

Valutazione degli effetti ecotossicologici di materiali legnosi modificati o trattati su specie bioindicatrici salmastre/marine attraverso l'uso di una batteria di biomarker

Versione: N. 1

WP di riferimento: 3

Partner Responsabile: LP

Autori: Tihana Marčeta, Nicoletta Nesto, Daniele Cassin, Andrea Pesce, Stefano Pasqual, Moschino Vanessa

Data: 31/07/2022

INDICE

ACRONIMI.....	1
SOMMARIO.....	2
1 INQUADRAMENTO DELLA PROBLEMATICHE ED OBIETTIVO DEL PROGETTO DURASOFT.....	2
1.1 Finalità delle attività svolte nell'ambito dell'ATT18.....	3
2 MATERIALI E METODI.....	3
2.1 Raccolta e trattamento degli organismi test.....	3
2.2 Determinazioni dei biomarkers e analisi chimiche.....	5
2.3 Analisi statistiche.....	6
3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	6
4 CONCLUSIONI.....	10
BIBLIOGRAFIA CITATA.....	10

ACRONIMI

AChE: acetilcolinesterasi
C: condizione sperimentale di controllo senza pannelli di legno
CAT: catalasi
d.l. =limite di rilevamento strumentale
FT: flipping test
GST: glutatione-s-transferasi
IC: indice di condizione
MN: micronuclei
MT: metallotioneine
NTC: condizione sperimentale di controllo con pannelli in legno non trattato
se: errore standard
sd: deviazione standard
S-Low: condizione sperimentale con pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0,033% di Cu
SOS: sopravvivenza in aria
UC5: condizione sperimentale con pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente l'1% di Cu

SOMMARIO

Il report descrive le attività condotte nell'ambito della ATT 18 finalizzata a valutare la compatibilità ambientale di pannelli in legno di conifera della specie *Picea abies* trattati con due diverse concentrazioni di Silvanolin, un impregnante a base di rame, per aumentarne la durabilità in ambiente marino e salmastro. A tal fine è stata condotta una sperimentazione di laboratorio utilizzando due specie di invertebrati marini: il bivalve *Mytilus galloprovincialis* e un gasteropode *Steromphala albida*. Questi organismi bioindicatori sono stati mantenuti per 4 settimane in vasche acquario in regime semistatico alle seguenti condizioni sperimentali: controllo (senza pannelli di legno), NTC (pannelli di legno non trattati), S-Low (pannelli di legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0,033% di Cu) e UC5 (pannelli di legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente l'1% di Cu). Nelle vasche con pannelli in legno il rapporto superficie pannello/volume d'acqua finale è stato di 0,018. Dopo 2, 8, 18 e 25 giorni, sono stati raccolti campioni d'acqua per analizzare l'eventuale rilascio di rame e di altri metalli nel tempo. Al termine dell'esposizione, la presenza di stress ossidativo è stata valutata attraverso la determinazione dell'attività degli enzimi catalasi e glutatione-s-transferasi, la risposta all'esposizione ai metalli attraverso i livelli di metallotioneine e gli effetti neurotossici attraverso la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi. Nei mitili sono stati valutati anche gli eventuali effetti genotossici tramite il test dei micronuclei. Le risposte fisiologiche sono state determinate nei mitili mediante il test della sopravvivenza in aria, mentre nei gasteropodi è invece stato analizzato un endpoint comportamentale mediante la determinazione del flipping test. La condizione UC5 ha mostrato la più alta tossicità e sia nei mitili che nei gasteropodi e la mortalità in entrambe le specie ha raggiunto valori del 100% pochi giorni dopo l'inizio dell'esperimento. Al contrario, i risultati di tutte le analisi dei biomarker condotte nelle due specie indicatrici hanno consentito di escludere la presenza di effetti tossici imputabili alle condizioni NTC e S-Low. L'effetto tossico osservato in UC5 è coerente con la concentrazione di rame misurata nell'acqua che è risultata superiore a 200 e 400 ppb rispettivamente dopo 2 e 8 giorni di esposizione, mentre era inferiore a 50 ppb durante tutto l'esperimento nelle altre condizioni testate.

1 INQUADRAMENTO DELLA PROBLEMATICHE E DEL PROGETTO DURASOFT

Nel comprensorio alpino-marittimo dell'alto Adriatico il legno è ampiamente utilizzato nelle attività agropastorali e in quelle legate alla pesca, non solo in strutture abitative tradizionali ma anche alle infrastrutture lignee complementari quali moli, pali di segnalazione e ormeggio, recinzioni e camminamenti che possono anche avere un notevole valore storico e socio-ecologico (Lo Monaco et al. 2018). Tuttavia, il legno è un materiale particolarmente soggetto a decomposizione dovuta a vari fattori biotici (funghi, insetti, termiti) e abiotici (temperatura e umidità), soprattutto se esposto al contatto diretto con il suolo o con l'acqua (Marais et al. 2022). Il legno di conifere, storicamente il più utilizzato in questa zona, è meno durevole rispetto a quello ricavato dalle latifoglie. Quando questo legno tenero viene utilizzato per l'edilizia, è pertanto necessario migliorarne la resistenza

e la durata per rendere meno onerosa la manutenzione ed aumentare la sicurezza delle costruzioni. A questo scopo vengono abitualmente addizionati nella formulazione dei preservanti per il legno dei conservanti chimici quali i composti a base di rame. Questo metallo, però, non è in grado di fissarsi direttamente al legno, e pertanto è necessario l'uso di altri fissativi per prevenire i processi di lisciviazione. L'aggiunta di cromo è ampiamente utilizzata ed efficace per fissare i sali metallici solubili all'interno del legno. Tuttavia, a causa della sua cancerogenicità, la maggior parte dei paesi europei vieta o limita l'uso del cromo nei preservanti del legno. Pertanto, vi è una grande richiesta di sviluppare composti alternativi ecologicamente accettabili ed efficaci per la fissazione del rame nell'agente impregnante soprattutto per quei legni a contatto con il terreno, con acqua dolce oppure permanentemente esposti all'acqua salata. Attraverso il progetto DuraSoft, finanziato dal Programma Interreg Italia - Slovenia, sono stati testati sia l'efficacia che la sostenibilità ambientale di alcuni trattamenti sviluppati dai partner che intendono aumentare la durabilità di materiali e manufatti di specie di conifere.

1.1 Finalità delle attività svolte nell'ambito dell'ATT18

Nell'ambito delle attività progettuali, la ATT 18 è stata finalizzata ad investigare i potenziali effetti ecotossicologici di materiali lignei trattati con diverse tipologie di impregnanti a base di rame quando mantenuti in ambiente marino attraverso l'applicazione di una batteria di biomarker. In particolare, possibili effetti tossici dei trattamenti applicati a campioni di *Picea abies* sono stati valutati su organismi bioindicatori della colonna d'acqua, quali bivalvi e gasteropodi, tipici di ambienti marini e salmastri (*Mytilus galloprovincialis* e *Steromphala albida*). Gli organismi di entrambe le specie sono stati esposti in condizioni controllate di laboratorio a campioni di legno trattati con due concentrazioni di Silvanolin, un preservante a base di rame, contenente etanolamina e acido carbossilico come composti di fissazione. Lo stato di salute di questi organismi biomonitor è stato valutato mediante determinazione di una batteria di biomarker di tipo biochimico, cellulare e fisiologico e comportamentale specificatamente scelta al fine di evidenziare condizioni di stress generico o ascrivibile alla presenza di particolari classi di inquinanti. I dati biologici sono stati altresì valutati anche alla luce della concentrazione di rame e di altri metalli determinati nell'acqua delle vasche sperimentali al fine di valutare l'eventuale presenza di fenomeni di lisciviazione.

2 MATERIALI E METODI

Le attività sperimentali relative alla ATT 18 sono state condotte nella stanza acquari e nel laboratorio di ecotossicologia dell'Istituto di Scienze Marine a Venezia.

2.1 Raccolta e trattamento degli organismi test

Circa 400 esemplari adulti del bivalve *M. galloprovincialis* e del gasteropode *S. albida* sono stati raccolti nella zona costiera veneta nel maggio 2021. Dopo un periodo di acclimatamento di due settimane, gli organismi sono stati distribuiti ed esposti per 4

settimane a quattro condizioni sperimentali: C controllo (senza pannelli di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), S-Low (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin al 0,033% di Cu) e UC5 (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin all' 1% di Cu). Per ciascuna condizione sperimentale sono state allestite tre vasche (i.e. repliche). In ciascuna vasca sperimentale contenente 46 litri di acqua di mare filtrata è stato inserito un pannello di legno (dimensioni 40.0 X7.5 X2.5 cm) in modo da ottenere un rapporto superficie/volume di 0.018. Data l'assenza di protocolli specifici, la scelta di utilizzare questo rapporto superficie volume è stata determinata sulla base alla capienza delle vasche acquario dell'istituto e dei risultati preliminari ottenuti dal Partner P4 (Università Ca' Foscari di Venezia) nei test di tossicità acuta aventi come endpoint la capacità di sopravvivenza del crostaceo *Acartia (Acanthacartia) tonsa* a lisciviati ottenuti utilizzando un rapporto di 0.6 e successive diluizioni. In particolare, il rapporto superficie/volume di 0.018 corrispondeva indicativamente alla concentrazione del loro lisciviato diluito al 3.2% che non aveva determinato mortalità nei campioni esposti al trattamento NTC, mentre era risultato tossico (mortalità 100%) per quelli esposti a UC5. Questo rapporto rappresentava quindi un bilanciamento tra una situazione di non-effetto ed una di effetto da indagare anche mediante applicazione della batteria di biomarker in organismi più complessi. Ogni pannello di legno è stato trattenuto sul fondo dell'acquario da due ciottoli precedentemente lavati con acqua distillata. In un set di 3 vasche, utilizzato come controllo, non è stato aggiunto alcun pannello. All'interno di ogni vasca sono stati inseriti 30 mitili e 21 gasteropodi (Fig. 1-2).

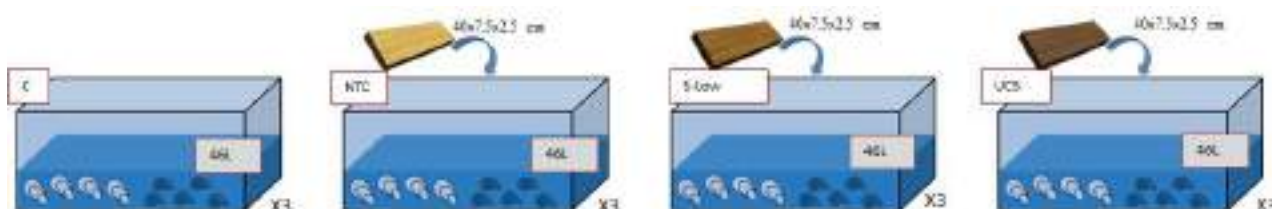


Fig. 1 - Schema delle condizioni sperimentali testate



Fig. 2 - Esperimento in corso nella sala acquari dell'Istituto di Scienze Marine (CNR-ISMAR) Venezia

Bivalvi e gasteropodi sono stati forniti di ossigenazione e nutriti ogni due giorni rispettivamente con il mangime Perla Larva Proactiv (®Hendrix) e macroalghe (*Ulva* sp. e *Dictyopteris* sp.). Un quarto d'acqua è stato rinnovato ogni due giorni, in particolare il giorno successivo alla somministrazione di cibo per evitare l'aumento dei nitrati. Campioni d'acqua sono stati raccolti durante i cambi per effettuare le analisi chimiche. Durante l'esperimento e il periodo di acclimatazione gli animali sono stati mantenuti alla temperatura di 20 ± 0.5 °C e salinità 32 ± 1 .

2.2 Determinazione dei biomarker e analisi chimiche

Gli eventuali effetti tossici dei diversi trattamenti dei pannelli di legno sono stati determinati nei negli organismi bioindicatori attraverso una batteria di indici di stress o biomarker, valutata a livello biochimico, cellulare, fisiologico e comportamentale. A livello biochimico le risposte biologiche sono state valutate in termini di attività di alcuni enzimi antiossidanti, quali catalasi (CAT) e glutatione-s-transferasi (GST) coinvolti nella eliminazione dei radicali liberi, e di attività dell'acetilcolinesterasi (AChE), coinvolta nella trasmissione degli impulsi nervosi. Inoltre è stato analizzato il contenuto di metallotioneine (MT), proteine coinvolte nei processi di detossificazione dei metalli. A livello cellulare i potenziali effetti genotossici dei trattamenti sono stati indagati attraverso la quantificazione dei micronuclei negli emociti dei mitili. Per una valutazione complessiva dello stato fisiologico degli organismi è stato determinato l'indice di condizione che fornisce indicazioni della massa corporea degli organismi in rapporto alla conchiglia, la capacità di resistenza all'aria nei mitili e la capacità di ribaltamento nei gasteropodi. In *M. galloprovincialis* l'attività degli biomarker biochimici quali l'attività degli enzimi catalasi (CAT) e glutatione-s-transferasi (GST) nonché il livello di metallotioneine (MT) sono stati determinati nella ghiandola digestiva, mentre l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) è stata determinata nelle branchie. In *S. albidus* gli stessi biomarker sono stati determinati sull'intero tessuto molle.

In entrambe le specie bioindicatrici l'attività della CAT è stata analizzata secondo Claiborne (1985), per GST è stato seguito il metodo Habig e Jacoby (1981), le MT sono state determinate secondo Kimura et al. (1979) e Viarengo et al. (1997) e l'attività della AChE è stata valutata secondo Ellmann et al. (1961). Tutte le determinazioni biochimiche sono state riferite al contenuto proteico totale misurato secondo il metodo di Bradford (1976). Ciascuna determinazione è stata eseguita su 3 pool (9 pool per condizione sperimentale) composti da almeno 3 organismi. In *M. galloprovincialis* l'indice di condizione [$IC = (\text{peso secco del tessuto molle} / \text{peso secco della conchiglia}) * 100$] e la presenza di micronuclei [$MN = (\text{numero emociti con micronucleo} / \text{totale emociti}) * 1000$] sono stati valutati su 3 animali di ciascuna vasca (9 organismi per condizione sperimentale) secondo Crosby e Gale (1990) e Bolognesi e Fenech (2012), rispettivamente. Per quanto riguarda i biomarker fisiologici, il tempo di sopravvivenza in aria (SOS espresso come LT50, che è il tempo richiesto affinché metà del campione muoia) è stato misurato nei mitili

secondo Eertman et al. (1993) su 10 animali da ogni vasca (30 organismi per condizione sperimentale). Nei gasteropodi è stato invece eseguito il flipping test (FT = tempo impiegato da ciascuna lumaca per tornare in posizione eretta) su 5 animali da ogni vasca (15 organismi per condizione sperimentale) secondo il metodo riportato Cabecinhas et al. (2015). Inoltre, durante le 4 settimane di esposizione, la mortalità è stata monitorata quotidianamente e gli organismi morti sono stati prontamente rimossi.

Per valutare il possibile rilascio di composti inorganici da parte dei pannelli di legno trattati, la concentrazione di una serie di metalli è stata determinata in campioni di acqua raccolti dopo 2, 8, 18 e 25 giorni mediante spettrometria di emissione atomica al plasma accoppiata induttivamente (ICP-AES) (USEPA 1994, Metodo 200.7).

2.3 Analisi statistiche

Per tutti i parametri considerati, le eventuali differenze significative tra le condizioni sperimentali sono state valutate mediante un modello misto lineare con la vasca come effetto casuale e seguite dalla correzione post-hoc di Tukey utilizzando il programma R (R Core Team 2020, Austria). Solo per la SOS, i dati sono stati analizzati secondo Kaplan e Meier (Kaplan e Meier, 1958) utilizzando il software STATISTICA (versione 10, StatSoft Inc.). Le curve di sopravvivenza in aria di ciascun trattamento sono state confrontate applicando il test di Gehan e Wilcoxon (Gehan, 1965). Per tutte le analisi statistiche la soglia di significatività è stata fissata a $p < 0,05$.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati dell'analisi dei biomarker determinati in *M. galloprovincialis* sono riportati in tabella 1. I livelli di significatività osservati nei confronti statistici effettuati per ciascun parametro nelle tre condizioni sperimentali sono riportate in tabella 2.

I campioni di mitili esposti ai pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC5 hanno raggiunto livelli di mortalità del 100% dopo 8 giorni dall'inizio dell'esposizione e pertanto non è stato possibile procedere con la determinazione di nessun biomarker. Gli organismi esposti ai pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin S-Low nonché tutti i controlli, ossia sia gli organismi esposti ai pannelli non trattati (NTC) e quelli non esposti ad alcun pannello (C), sono sopravvissuti con percentuali del 100% per tutta la durata dell'esperimento.

Dal punto di vista fisiologico, l'indice di condizione (IC) fornisce indicazioni sulla quantità della massa corporea rispetto alla conchiglia, dando quindi un'indicazione complessiva dello stato di benessere dei bivalvi in quanto rappresenta una sintesi dei processi metabolici che più contribuiscono a definire l'attività fisiologica dell'animale (quali per esempio crescita, riproduzione e escrezione).

Tabella 1 - Biomarker determinati in campioni di *M. galloprovincialis* esposti a varie condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), S-Low (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin al 0,033% di Cu) e UC5 (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin all' 1% di Cu).

<i>M. galloprovincialis</i>	C		NTC		S-Low		UC5	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
mortalità (%)	0		0		0		100	
SOS LT ₅₀ (giorni)	14		15		15			
IC ((peso secco parte molle / peso secco conchiglia)*100)	12,25	0,51	13,27	1,99	14,75	0,65		
MN (‰)	0,94	0.21*	1,11	0.08*	1,17	0.15*		
AChE (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	40,42	4,41	41,74	5,64	39,00	8,02		
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	145,30	54,02	117,46	25,69	120,82	16,68		
GST (nmoli CDNB min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	98,45	29,70	100,97	47,51	95,74	26,27		
MT (nmoli mg ⁻¹ prot)	2,54	0,71	2,84	0,42	2,89	0,33		

sd= deviazione standard; *= se, errore standard

Tabella 2 - I livelli di significatività osservati nei confronti statistici effettuati per ciascun parametro tra i campioni di mitili esposti alle seguenti condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), S-low (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin al 0,033% diCu).

<i>p</i>	IC	MN	AChE	CAT	GST	MT	SOS
C vs NTC	0,6466	0,841	0,772	0,353	0,963	0,531	0,030
C vs S-Low	0,0749	0,735	0,743	0,447	0,957	0,427	0,090
NTC vs S-Low	0,4021	0,981	0,331	0,985	0,851	0,984	0,700

Negli esperimenti di esposizione questo indice ha mostrato valori statisticamente simili tra i controlli e gli organismi esposti alle condizioni sperimentali NTC e S-Low. Il parametro SOS, test che sfrutta la naturale capacità dei bivalvi di sopravvivere a periodi di esposizione all'aria con tempi di sopravvivenza più lunghi in condizioni fisiologiche ottimali, ha invece evidenziato un valore significativamente inferiore nei controlli rispetto ai campioni esposti a NTC. Questo dato non è stato tuttavia considerato indicativo della presenza di uno stato di stress degli organismi nelle vasche di controllo in quanto in tutti gli altri parametri misurati non sono mai emersi segnali in tal senso.

La presenza di effetti genotossici, ricercata attraverso la valutazione dei micronuclei che si formano per effetto di errori occorsi durante i processi di riproduzione cellulare, è stata esclusa in quanto il numero di micronuclei contati all'interno degli emociti dei mitili è risultato simile tra i vari campioni e in linea con i valori segnalati da Brunetti et al. (1992) per esemplari della stessa specie campionati in Mare Adriatico settentrionale.

Tra i biomarker biochimici, l'inibizione dell'attività dell'enzima AChE è un parametro che può essere considerato indicativo dell'esposizione di contaminanti organici quali gli organofosforici e carbammati. Questo enzima è implicato nella corretta trasmissione dei segnali elettrici a livello delle membrane sinaptiche che permette la regolazione delle attività motorie dell'organismo.

I valori osservati nei mitili esposti alle varie condizioni sperimentali sono risultati simili tra loro, escludendo in tal modo la presenza di un effetto neurotossico dei pannelli non trattati e in quelli trattati con S-Low.

Le metallotioneine sono un gruppo di proteine a basso peso molecolare ricche di cisteina che giocano un ruolo molto importante nei meccanismi di detossificazione dei metalli e pertanto la loro produzione può venire indotta dalla presenza di metalli pesanti. Anche in questo caso i livelli di MT sono risultati simili tra controlli e trattati escludendo la possibilità che la concentrazione di metalli nell'acqua possa aver raggiunto durante l'esperimento livelli in grado di indurre la significativa produzione di queste particolari proteine.

L'attività antiossidante della CAT ha mostrato valori leggermente ridotti nei trattamenti NTC e S-Low mentre l'attività GST è risultata simile tra controlli e trattati. Nonostante la presenza di queste lievi variazioni, complessivamente non sono state osservate differenze significative tra i trattamenti nelle risposte antiossidanti.

I risultati dell'analisi dei biomarker determinati in *S. albidus* sono riportati in tabella 3. I livelli di significatività osservati nei confronti statistici effettuati per ciascun parametro nelle tre condizioni sperimentali sono riportate in tabella 4.

Tabella 3 – Biomarker determinati in campioni di *S. albidus* esposti a varie condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), S-Low (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin al 0,033% di Cu) e UC5 (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin all' 1% di Cu).

<i>Steromphala albidus</i>	C		NTC		S-Low		UC5	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
mortalità (%)	0,41	0,03	0,76	0,74	1,11	0,66	100	
AChE (mmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	1,09	0,14	0,96	0,20	1,22	0,50		
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	175,40	29,77	157,64	29,27	138,78	21,22		
GST (nmoli CDNB min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	89,27	36,73	97,20	42,58	123,84	65,10		
MT (nmoli mg ⁻¹ prot)	4,63	0,16	4,81	0,12	4,91	0,66		
FT (sec)	410,30	81,52	183,30	62,27	321,07	259,31		

sd= deviazione standard

Tabella 4 - I livelli di significatività osservati nei confronti statistici effettuati per ciascun parametro tra i campioni di gasteropodi esposti alle seguenti condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), S-Low (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin al 0,033% di Cu).

<i>p</i>	mortalità	AChE	CAT	GST	MT	FT
C vs NTC	0,810	0,739	0,911	0,8807	0,892	0,117
C vs S-Low	0,275	0,757	0,675	0,0913	0,322	0,700
NTC vs S-low	0,801	0,355	0,901	0,2402	0,549	0,447

Analogamente a quanto già descritto per i mitili, anche i campioni di gasteropodi esposti ai pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC5 hanno raggiunto una mortalità del 100 % entro 2 giorni dall'inizio dell'esperimento e quindi anche in questo caso non è stato possibile procedere con l'analisi dei biomarker.

Gli organismi esposti alle condizioni sperimentali di controllo, NTC e S-Low hanno invece mostrato valori di sopravvivenza alla fine delle 4 settimane simili tra loro e comunque superiori al 98.89%.

Tutti i biomarker biochimici determinati nei gasteropodi non hanno evidenziato differenze significative tra campioni di controllo (C e NTC) e quello trattato con la formulazione S-low, confermando anche per la specie indicatrice *S. albida* l'assenza di effetti sia sul sistema antiossidante che neurotossico, e l'assenza di induzione di metallotioneine da parte dei pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin S-low.

Anche dal punto di vista fisiologico, il test comportamentale (flipping test o test di ribaltamento), utilizzato per valutare la vitalità e le capacità motorie degli organismi, pur mostrando valori leggermente maggiori nel campione di controllo C rispetto a quelli esposti a pannelli NTC e S-Low, non è stato considerato indicativo di una condizione di stress in quanto tale parametro si è mostrato estremamente variabile tra gli individui e le differenze tra campioni non sono risultate statisticamente significative.

Le analisi dei metalli determinate nei campioni di acqua prelevati dopo 2, 8, 18 e 25 giorni dall'inizio dell'esperimento nelle 4 diverse condizioni sperimentali sono riportate in tabella 5.

Tab. 5 - Contenuto di metalli (ppb) in campioni di acqua prelevati periodicamente dalle vasche rappresentanti le diverse condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), S-Low (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin al 0,033% di Cu) e UC5 (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin all' 1% di Cu).

Campioni	Giorno	Hg ppb	Al ppb	Ba ppb	Cd ppb	Cr ppb	Cu ppb	Fe ppb	Mn ppb	Ni ppb	Pb ppb	Zn ppb
C	2	< d.l.	207	18	< d.l.	< d.l.	5	< d.l.	3	< d.l.	< d.l.	148
	8	< d.l.	195	21	< d.l.	< d.l.	8	< d.l.	4	< d.l.	< d.l.	109
	18	< d.l.	182	17	< d.l.	< d.l.	7	< d.l.	5	< d.l.	< d.l.	81
	25	< d.l.	224	17	< d.l.	< d.l.	6	< d.l.	11	< d.l.	< d.l.	71
NTC	2	< d.l.	200	23	< d.l.	< d.l.	8	< d.l.	22	< d.l.	< d.l.	144
	8	< d.l.	186	26	< d.l.	< d.l.	11	< d.l.	28	< d.l.	< d.l.	106
	18	< d.l.	104	20	< d.l.	< d.l.	7	< d.l.	8	< d.l.	< d.l.	67
	25	< d.l.	190	18	< d.l.	< d.l.	6	< d.l.	16	< d.l.	< d.l.	63
S-Low	2	< d.l.	253	25	< d.l.	< d.l.	34	< d.l.	6	< d.l.	< d.l.	151
	8	< d.l.	199	28	< d.l.	< d.l.	46	< d.l.	14	< d.l.	< d.l.	117
	18	< d.l.	100	22	< d.l.	< d.l.	40	< d.l.	9	< d.l.	< d.l.	73
	25	< d.l.	198	24	< d.l.	< d.l.	25	< d.l.	19	< d.l.	< d.l.	78
UC5	2	< d.l.	225	19	< d.l.	< d.l.	211	< d.l.	6	< d.l.	< d.l.	170
	8	< d.l.	240	23	< d.l.	< d.l.	437	< d.l.	12	< d.l.	< d.l.	160

d.l. = limite di rilevamento

In generale le concentrazioni di Hg, Cd, Cr, Fe, Ni e Pb sono risultate al di sotto del limite di rilevamento strumentale per tutte le vasche sperimentali, e quelle di Al, Ba, Mn e Zn sono risultate basse e costanti durante tutta la durata dell'esposizione. Per quanto riguarda le concentrazioni di Cu, queste sono risultate basse e costanti durante tutta la durata dell'esperimento sia nelle vasche dei controlli C che in quelle con i pannelli non trattati

(NTC). In particolare, i valori sono risultati variabili tra i 5-8 ppb nelle vasche C e 8-11 ppb nelle vasche NTC. La concentrazione di Cu nelle vasche contenenti pannelli trattati con la formulazione S-Low ha mostrato invece un valore di 34 ppb al 2° giorno dell'esperimento e ha raggiunto il valore più elevato all'8° giorno (46 ppb) per poi scendere a 25 ppb al 25° giorno.

La concentrazione di Cu nelle vasche contenenti i pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC5 è risultata di 211 ppb al 2° giorno dell'esperimento per arrivare a 437 ppb all'8° giorno. Questi dati evidenziando un progressivo rilascio di Cu dai pannelli trattati che si è progressivamente accumulato nell'acqua marina almeno fino all'ottavo giorno di esposizione. Tale fenomeno è risultato più evidente nelle vasche con pannelli trattati con formulazione di Silvanolin UC5 ma è risultato presente anche nelle vasche contenenti i pannelli trattati con Silvanolin S-Low. L'entità del rilascio nelle vasche contenenti Silvanolin UC5 ha di fatto determinato la totale moria degli organismi ivi mantenuti e quindi lo stop del test.

4 CONCLUSIONI

Nell'ambito delle attività sperimentali condotte per verificare la presenza di eventuali effetti tossici di due trattamenti a base di Cu a diversa concentrazione su pannelli di *Picea abies* esposti in un ambiente controllato di tipo marino, l'applicazione di una batteria di biomarker misurati su due specie di molluschi bioindicatori ha evidenziato che i pannelli trattati con una la formulazione di Silvanolin contenente Cu all'1% ha portato a una lisciviazione del rame (fino a 437 ppb) che ha causato la mortalità del 100% di tutti gli organismi esposti. I pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin contenente Cu allo 0,033% non hanno mostrato effetti ecotossicologici sulle due specie di invertebrati marini esposti in quanto i valori dei biomarker misurati sono risultati confrontabili con quelli ottenuti per gli organismi esposti alle condizioni di controllo (senza pannelli) o con pannelli naturali non trattati.

BIBLIOGRAFIA CITATA

Bolognesi, C, Fenech, M (2012): Mussel micronucleus cytome assay. Nature Protocols, 7, 1125-1137.

Bradford, MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

Cabecinhas, AS, et al., (2015): Sensitivity of the sea snail *Gibbula umbilicalis* to mercury exposure-linking endpoints from different biological organization levels. Chemosphere, 119, 490-497.

Claiborne, A (1985): Catalase activity. In: Greenwald, R. A. (ed.) Handbook of methods of oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 283-284.

Crosby, MP, Gale, LD (1990): A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. Journal of Shellfish Research, 9(1), 233-237.

Dailiani S. (2010): Environmental impact of anthropogenic activities: the use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. In: Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact. Lauren E. McGevin (Ed), pp.1-30 Nova Science Publishers, Inc.

Eertman, RHM, Wagenvoort, AJ, Hummel, H, Small, AC (1993): "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 170, 179-195.

Ellman, GL, Courtney, KO, Andres, V, Featherstone, RM (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7, 88-95.

Gehan, EA (1965): A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. Biometrika, 52, 203-223.

Habig, WH, Jakoby, WB (1981): Assays for differentiation of glutathione S-transferases. Methods in Enzymology, 77, 398-405.

Kaplan, EL, Meier, P (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of the American Statistical Association, 53, 457-481.

Kimura, M, Otaki, N, Imano, M (1979): Rabbit liver metallothionein tentative amino acid sequence of metallothionein B. In Kagi J.H.R. e Norberg M. (eds). Metallothionein Experientia Supplementum, 24: 163-168.

Lo Monaco, A, Balletti, F, Pelosi, C (2018): Wood in cultural heritage properties and conservation of historical wooden artefacts. European Journal of Science and Theology, 14(2), 161-171.

Marais, BN, Brischke, C, Miltz, H (2022): Wood durability in terrestrial and aquatic environments - A review of biotic and abiotic influence factors. Wood Material Science & Engineering, 17(2), 82-105.

R Core Team, (2020): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>.

USEPA (Environment Protection Agency of United State of America). Method 200.7, Determination of Metals and Trace Elements in water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, 1994B.

Viarengo, A, Ponzano, E, Dondero, F, Fabbri, R (1997): A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84.

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.

Ocena ekotoksikoloških učinkov spremenjenih ali obdelanih lesenih materialov na vrste bioindikatorjev brakične/slane vode z uporabo skupine biomarkerjev

Različica: ŠT. 1

Povezan DS: 3

Odgovorni partner: VP

Avtorji: Tihana Marčeta, Nicoletta Nesto, Daniele Cassin, Andrea Pesce,
Stefano Pasqual, Moschino Vanessa

Datum: 31. 07. 2022

OKRAJŠAVE.....	1
POVZETEK.....	2
1 OPREDELITEV PROBLEMATIKE IN PROJEKTA DURASOFT.....	2
1.1 Cilj aktivnosti, izvedenih v sklopu AKT18.....	3
2 MATERIALI IN METODE.....	3
2.1 Zbiranje in obdelava testnih organizmov.....	3
2.2 Opredelitev biomarkerjev in kemijske analize.....	5
2.3 Statistične analize.....	6
3 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	6
4 ZAKLJUČKI.....	9
NAVEDENI VIRI.....	10

OKRAJŠAVE

AChE: acetilholinesteraza

C: kontrolni testni pogoj brez lesenih plošč

CAT: katalaza

d.l. = meja zaznavnosti

FT: flipping test - test prevračanja

GST: glutation S-transferaze

IC: kazalnik stanja

MN: mikrojedra

MT: metalotionein

NTC: kontrolni testni pogoj s prisotnostjo neobdelanih lesenih plošč

se: standardna napaka

sd: standardni odklon

S-Low: testni pogoj s prisotnostjo lesenih plošč, zaščitenih z 0,033 % Cu raztopino Silvanolin

SOS: preživetje na zraku

UC5: testni pogoj s prisotnostjo lesenih plošč, zaščitenih z 1 % Cu raztopino Silvanolin

POVZETEK

Poročilo opisuje aktivnosti, izvedene v sklopu AKT 18 z namenom ocenjevanja okoljske kompatibilnosti lesenih plošč vrste *Picea abies*, ki so bile obdelane z dvema različnima koncentracijama impregnacijskega sredstva na osnovi bakra Silvanolin, za povečanje njihove obstojnosti v morskem in brakičnem okolju. V ta namen je bilo opravljeno laboratorijsko preizkušanje z dvema vrstama morskih nevretenčarjev: to sta sicer školjka *Mytilus galloprovincialis* in polž *Steromphala albida*. Oba bioindikatorska organizma smo 4 tedne pustili v testnih bazenih v polstatičnih pogojih: kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (nezaščitene lesene plošče), S-Low (lesene plošče, zaščitene z 0,033-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin) in UC5 (lesene plošče, zaščitene z 1-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin). V bazenih z lesenimi ploščami je bilo razmerje površina plošče/količina vode enako 0,018. Vzorce vode smo odvzeli po 2, 8, 18 in 25 dneh, da bi analizirali morebitne izpuste bakra in drugih kovin. Po preteku obdobja izpostavljenosti smo prisotnost oksidativnega stresa ocenili tako, da smo izmerili aktivnost encimov katalaze in glutation-s-transferaze, odziv na izpostavljenost kovinam z merjenjem ravni vsebnosti metalotioneina in nevrotoksične učinke s proučitvijo aktivnosti acetilkolinesteraze. Pri školjkah smo z izvedbo testa mikro jeder ovrednotili tudi morebitne genotoksične učinke. Fiziološki odziv smo pri školjkah proučili s testom sposobnosti preživetja na zraku, pri polžih pa smo ocenili vedenjsko končno točko z izvedbo testa prevračanja (Flipping test). Pogoj UC3 se je izkazal za najbolj toksičnega; tako pri polžih kot pri školjkah je bila sicer zabeležena 100 % smrtnost po nekaj dnevih izpostavljenosti. Na podlagi rezultatov vseh analiz biomarkerjev, opravljenih na obeh vrstah kazalnikov, pa je bilo mogoče izključiti prisotnost toksičnih učinkov, ki bi jih lahko pripisali pogojema NTC in S-low. Zabeležen strupeni učinek pri pogojju UC5 je v skladu z izmerjeno koncentracijo bakra v vodi, ki je po 2 in 8 dneh izpostavljenosti presegla vrednosti 200 in 400 ppb, pri vseh drugih testnih pogojih pa je bila koncentracija v času trajanja preiskave nižja od 50 ppb.

1 OPREDELITEV PROBLEMATIKE IN PROJEKTA DURASOFT

Na alpsko-morskem območju severnega Jadrana se les obsežno uporablja v kmetijsko-pašniških in ribolovnih aktivnostih, tako za tradicionalne hiše kot za pomožne lesene objekte, kot so pomoli, privezi, piloti in ograje, ki lahko imajo tudi velik zgodovinski in družbeno-ekološki pomen (Lo Monaco et al. 2018). Kljub temu je les občutljiv material, močno podvržen različnim dejavnikom biotskega (glivice, žuželke, termiti) in abiotskega (temperatura, vlaga) razkroja, še posebej v primeru, ko je v neposrednem stiku z zemljo in vodo (Marasi et al. 2022). Les iglavcev, ki je na predmetnem območju zgodovinsko najbolj uporabljena vrsta lesa, je manj obstojen v primerjavi z lesom listavcev. V primeru uporabe tega mehkega lesa v gradnji, je treba izboljšati njegovo odpornost in trajnost, s čimer se zmanjšujejo stroški vzdrževanja in izboljšuje varnost lesene strukture. V ta namen se formulaciji zaščitnih sredstev lesa pogosto dodajajo kemični konzervansi, kot so spojine na osnovi bakra. Ker se baker ne veže neposredno v les, je za preprečevanje njegovega izpiranja treba uporabiti druga fiksirna sredstva. Pogosto uporabljen dodatek

kroma sicer prispeva k učinkoviti vezavi topnih kovinskih soli v les, vendar je večina evropskih držav zaradi njegove rakotvorne lastnosti prepovedala ali omejila njegovo uporabo v zaščitnih sredstvih za les. Zaradi navedenega se ugotavlja veliko povpraševanje po razvoju alternativnih, okoljsko sprejemljivih in učinkovitih spojin za vezanje bakra v impregnacijsko sredstvo, predvsem pri uporabi vrst lesa, ki so v stiku z zemljo ali vodo oz. so trajno izpostavljeni slani vodi. V sklopu projekta DuraSoft, financiranega iz Programa sodelovanja Interreg Italija-Slovenija, smo preizkusili učinkovitost in okoljsko vzdržnost nekaterih zaščitnih obdelav, ki so jih partnerji razvili za povečanje obstojnosti materialov in konstrukcij, izdelanih z vrstami iglavcev.

1.1 Cilj aktivnosti, izvedenih v sklopu AKT18

V sklopu projektih aktivnosti je bila AKT18 namenjena proučevanju potencialnih ekotoksikoloških učinkov lesenih materialov, uporabljenih v morskem okolju, ki so zaščiteni z različnimi vrstami impregnacijskih sredstev na osnovi bakra, z uporabo skupine biomarkerjev. Natančneje so bili morebitni strupeni učinki zaščitnih obdelav, nanosenih na vzorce vrste *Picea abies*, ocenjeni na bioindikatorske vodne organizme, kot so školjke in polži, tipični za morsko in brakično okolje (*Mytilus galloprovincialis* in *Sterromphala albidula*). Organizme obeh vrst smo pod kontroliranimi laboratorijskimi pogoji izpostavili vzorcem lesa, obdelanimi z dvema koncentracijama impregnacijskega sredstva Silvanolin na osnovi bakra, ki kot vezni spojini vsebuje etanolamin in karboksilno kislino. Zdravstveno stanje teh biorganizmov - biomonitorjev smo ocenili z naborom biokemijskih, celičnih, fizioloških in vedenjskih biomarkerjev, ki so bili posebej izbrani z namenom ugotavljanja stresnih pogojev, tako splošne kot specifične narave, zaradi prisotnosti posebnih skupin onesnažil. Biološke podatke smo ocenili tudi glede na koncentracijo bakra in drugih kovin, ugotovljenih v vodi testnih bazenov, da bi tako proučili morebiten pojav izpiranja.

2 MATERIALI IN METODE

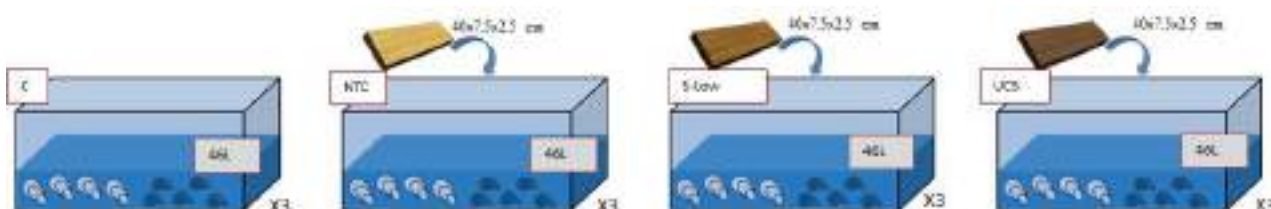
Preizkušanja v sklopu AKT 18 smo opravili v sobi akvarijev in v ekotoksikološkem laboratoriju Inštituta za morske znanosti v Benetkah.

2.1 Zbiranje in obdelava testnih organizmov

Maja 2021 smo na beneškem obalnem območju nabrali približno 400 odraslih osebkov školjke *M. galloprovincialis* in polža *S. albidula*. Po preteku dvotedenskega prilagoditvenega obdobja so bili organizmi razporejeni in 4 tedne izpostavljeni štirim testnim pogojem: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), S-Low (lesene plošče, zaščitene z 0,003-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin) in UC5 (lesene plošče, zaščitene z 1-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin). Za vsak testni pogoj so bile pripravljene tri posode (t.j. ponovitve). V vsako testno posodo, ki vsebuje 46 litrov filtrirane morske vode, je bila nameščena lesena plošča (velikosti 40,0 X 7,5 X 2,5 cm) tako, da je razmerje površina/prostornina znašalo 0,018. Ker ne obstajajo specifični protokoli, smo to razmerje površina/prostornina določili glede na prostornino akvarijev v inštitutu in rezultate

predhodnih testov akutne strupenosti, ki jih je opravil partner P4 (Univerza Ca' Foscari v Benetkah); slednji so služili kot končna točka pri oceni sposobnosti preživetja rakca *Acartia (Acanthacartia) tonsa* na izpirke, nastale pri razmerju 0,6 in nadaljnjih razredčenjih. Razmerje površina/prostornina 0,018 je bilo namreč enako koncentraciji izpirka, razredčenega v razmerju 3,2 %, ki ni povzročil smrtnosti vzorcev, izpostavljenih zaščitni obdelavi NTC, izkazal pa se je za toksičnega (100 % smrtnost) pri vzorcih, izpostavljenih pogoju UC5. To razmerje je tako predstavljalo neke vrste uravnoteženosti med stanjem učinka in neučinka, ki ga je bilo treba proučiti tudi z uporabo skupine biomarkerjev na bolj kompleksnih organizmih.

Vsako leseno ploščo sta na dnu akvarija obdržala dva kamenčka, ki sta bila predhodno očiščena z destilirano vodo. V tri posode, ki so služile v kontrolne namene, ni bila nameščena nobena plošča. V vsako posodo smo položili približno 30 školjk in 21 polžev (sliki 1-2).



Slika 1 - Postopek proučevanja testnih pogojev



Slika 2 - Preizkušanje v akvarijski sobi pri Inštitutu za morske znanosti (CNR-ISMAR) v Benetkah

Školjke in polže smo oskrbeli s kisikom in hranili vsaki drugi dan s krmo Perla Larva Proactiv (@Hendrix) in makroalgami (*Ulva* sp. in *Dictyopteris* sp.). Četrtno vode smo zamenjali vsaki drugi dan, predvsem dan po krmljenju, da bi preprečili povišanje vsebnosti nitratov. Med zamenjavo vode smo odvzeli vodne vzorce za kemijsko analizo. Med testiranjem in v času privajanja živali na okolje sta bili temperatura vode $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ in slanost 32 ± 1 .

2.2 Opredelitev biomarkerjev in kemijske analize

Pri bioindikatorskih organizmih smo morebitne strupene učinke različnih zaščitnih obdelav lesenih plošč ocenili z uporabo skupine biokemijskih, celičnih, fizioloških in vedenjskih kazalcev stresa oz. biomarkerjev. Na biokemijski ravni je bil biološki odziv ocenjen glede na delovanje nekaterih antioksidatnih encimov, kot sta na primer katalaza (CAT) in glutation-s-transferaza (GST), ki sodelujeta pri izločanju prostih radikalov, in acetilholinesteraze (AChE), sodeluje pri prenosu živčnih signalov. Prav tako je bila ocenjena vsebnost beljakovin metalotionein (MT), ki sodelujejo pri detoksifikaciji kovin. Na celični ravni pa smo morebitne genotoksične učinke obdelav proučili z merjenjem količine mikrojedr v hemocitih školjk. Da bi ocenili splošno fiziološko stanje organizmov, smo določili kazalnik stanja, ki podaja podatke o telesni masi organizmov v primerjavi z lupino, odpornost školjk na zrak ter polževo sposobnost prevračanja. Pri *M. galloprovincialis* smo delovanje biokemijskega biomarkerja, kot sta dejavnost encimov katalaze (CAT) in glutation-s-transferaze (GST) ter raven metalotioneina (MT) ugotovili pri prebavni žlezi, dejavnost acetilkolinesteraze (AChE) pa v škrgah. Pri *S. albidus* smo enake biomarkerje opredelili na celotnem mehkem tkivu.

Pri obeh vrstah bioindikatorjev je bila aktivnost CAT ocenjena po Clairbonu (1985), aktivnost GST po Habigovi in Jacobyjevi metodi (1981), MT je bila ovrednotena po Kimuri in sod. (1979) ter Viarengi in sod. (1997), aktivnost AChE pa po Ellmannu in sod. (1961). Vse biokemijske meritve so se nanašale na vsebnost skupnih beljakovin, izmerjeno po Bradfordu (1976). Vsako merjenje je bilo izvedeno na 3 skupkih (9 skupkov za vsak testni pogoj), od tega vsak skupek sestavljajo vsaj 3 organizmi. Pri vrsti *M. galloprovincialis* sta bila kazalnik stanja [$IC = (\text{suha teža mehkega tkiva} / \text{suha teža lupine}) * 100$] in prisotnost mikrojedr [$MN = (\text{število hemocitov z mikrojedrom} / \text{skupaj hemociti}) * 1000$] ocenjena na 3 živali za vsako posodo (9 organizmov za testni pogoj) po Crosbyju in Galu (1990) ter Bolognesiju in Fenechu (2012). Kar zadeva fiziološke biomarkerje, je bil čas preživetja školjk na zraku (SOS izražen kot LT50; to je potreben čas, da pogine polovica vzorcev) izmerjen po Eertmanu in sod. (1993) na 10 živali na vsako posodo (30 organizmov za posamezni testni pogoj). Pri polžih smo opravili test prevračanja (FT = potreben čas, da se polž obrne v stoječi položaj) na 5 živali na vsako posodo (15 organizmov za posamezni testni pogoj) po metodi, opisani v publikaciji Cabecinhas in sod. (2015). Med 4-tedenskim testiranjem smo tudi dnevno spremljali umrljivost, umrle organizme pa nemudoma odstranili iz posode.

Morebitno sproščanje anorganskih spojin z obdelanih lesenih plošč smo analizirali na podlagi koncentracije kovin, ki je bila izmerjena v vodnih vzorcih, odvzetih po 2, 8, 18 in 25 dneh, po postopku atomske emisijske spektroskopije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES) (USEPA 1994, Metoda 200.7).

2.3 Statistične analize

Za vse obravnavane parametre smo morebitne izrazite variance med testnimi pogoji ocenili z linearnim mešanim modelom, pri čemer ima posoda naključni učinek, in jih nato dopolnilno popravili po Tukeyjevi metodi z uporabo programa R (R Core Team 2020, Avstrija). Samo za SOS smo podatke proučili po Kaplan-Meierovi metodi (Kaplan in Meier, 1958) s programsko opremo STATISTICA (verzija 10, StatSoft Inc.). Krivulje preživetja na zraku posameznih zaščitnih postopkov smo primerjali s Gehan-Wilcoxonovim testom (Gehan, 1965). Pri vseh statističnih analizah je bil prag pomembnosti enak $p < 0,05$.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V preglednici 1 so prikazani rezultati analize biomarkerjev, opredeljenih pri vrsti *M. galloprovincialis*. V preglednici 2 so prikazane ravni pomembnosti, ki so bile ugotovljene s statističnimi primerjavami za vsak parameter pri treh testnih pogojih.

Pri školjkah, ki so bile izpostavljene ploščam, zaščitenim s Silvanolinom UC5, je bila 8 dni po začetku preizkušanja zabeležena 100 % stopnja umrljivosti, zato za ta vzorec ni bilo mogoče opredeliti nobenega biomarkerja. Organizmi, izpostavljeni ploščam, obdelanim s Silvanolinom S-Low, ter vsi kontrolni organizmi - to so organizmi, izpostavljeni neobdelanim ploščam (NTC), in tisti, pri katerih ni bilo nobene plošče (C) - so 100 % preživeli celoten čas preizkusa.

S fiziološkega vidika kazalnik stanja (IC) postreže s količinski podatki telesne mase glede na lupino, na podlagi katerih poda splošno zdravstveno stanje školjk, saj prikazuje splošno sliko presnovnih procesov, ki največ prispevajo k fiziološki aktivnosti živali (to je rast, razmnoževanje in odvajanje).

Preglednica 1 - Opredeljeni biomarkerji v vzorcih vrste *M. galloprovincialis*, ki so bili izpostavljeni različnim testnim pogojem: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), S-Low (lesene plošče, zaščitene z 0,003-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin) in UC5 (lesene plošče, zaščitene z 1-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin).

<i>M. galloprovincialis</i>	C		NTC		S-Low		UC5	
	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd
smrtnost (%)	0		0		0		100	
SOS LT ₅₀ (dni)	14		15		15			
IC ((suha teža mehkega dela / suha teža lupine)*100)	12,25	0,51	13,27	1,99	14,75	0,65		
MN (‰)	0,94	0,21*	1,11	0,08	1,17	0,15*		
AChE (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	40,42	4,41	41,74	5,64	39,00	8,02	16,6	
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	145,30	54,02	117,46	25,69	120,82	8		

GST (nmoli CDNB min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	98,45	29,70	100,97	47,51	95,74	26,27
MT (nmoli mg ⁻¹ prot)	2,54	0,71	2,84	0,42	2,89	0,33

sd= standardni odklon; *= v primeru standardne napake

Preglednica 2 - Ugotovljene ravni pomembnosti pri statističnih primerjavah med vzorci školjk, ki so bile izpostavljene naslednjim testnim pogojem, po posameznem parametru: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče) S-Low (lesene plošče, zaščitene z 0,033-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin).

<i>p</i>	IC	MN	AChE	CAT	GST	MT	SOS
C vs NTC	0,6466	0,841	0,772	0,353	0,963	0,531	0,030
C vs S-Low	0,0749	0,735	0,743	0,447	0,957	0,427	0,090
NTC vs S-Low	0,4021	0,981	0,331	0,985	0,851	0,984	0,700

Pri preizkusih izpostavljenosti so bile za ta kazalnik beležene vrednosti statistično podobne med kontrolnimi organizmi in tistimi, izpostavljenimi testnima pogojema NTC in S-Low. Parameter SOS - test raziskuje naravno sposobnost školjk za preživetje na zraku z daljšimi obdobji preživetja v ugodnih fizioloških razmerah - pa je izpostavil občutno nižjo vrednost pri kontrolnih vzorcih v primerjavi z vzorci, izpostavljenimi pogoju NTC. Ta podatek sicer ne kaže na prisotnost stresnega stanja pri organizmih v kontrolnih posodah, saj vsi preostali izmerjeni parametri ne pokažejo tovrstne slike.

Izključili smo prisotnost genotoksičnih učinkov - ta je bila proučena z oceno mikrojedер, ki nastanejo zaradi napak pri postopkih celičnega razmnoževanja -, ker je bilo število prešteti mikrojedер v hemocitih školjk podobno pri različnih vzorcih in je bilo v skladu z vrednostmi, opredeljenimi v publikaciji Brunetti in sod. (1992) za vzorce iste vrste, odvzete na območju severnega Jadrana.

Kar zadeva biokemijske biomarkerje, inhibicija aktivnosti AChE encima predstavlja indikativen parameter izpostavljenosti organskim onesnažilom, ko so organofosforne spojine in karbamati. Ta encim namreč sodeluje v pravilnem prenosu električnih signalov v sinaptičnih membranah, kar prispeva k uravnavanju motoričnih aktivnosti samega organizma.

Vrednosti, izmerjene pri školjkah, vzpostavljenih različnim testnim pogojem, so si bile med seboj podobne, kar izključuje prisotnost nevrotoksičnih učinkov tako neobdelanih plošč kakor tistih, zaščitnih s S-Low zaščitnim sredstvom.

Metalotioneini so skupina nizkomolekularnih beljakovin, bogatih s cisteinom, ki igrajo ključno vlogo pri detoksifikaciji kovin; proizvodnja teh beljakovin lahko sicer nastane ob prisotnosti težkih kovin. Tudi v tem primeru so si bile ravni MT pri kontrolnih in obdelanih vzorcih med seboj podobne, kar izključuje možnost, da je koncentracija kovin v vodi med preizkušanjem dosegla takšne vrednosti, ki bi lahko povzročile znatno tvorbo teh posebnih beljakovin.

Antioksidativno delovanje CAT encima je beležilo rahlo nižje vrednosti pri zaščitnih obdelavah NTC in S-Low, medtem ko delovanje GST encima je bilo podobno med kontrolnimi in obdelanimi vzorci. Kljub temi manjšimi razlikami, med različnimi obdelavami niso bila v glavnem ugotovljena večja odstopanja glede antioksidativnih odzivov.

V preglednici 3 so prikazani rezultati analize biomarkerjev, opredeljenih pri vrsti *S. albida*. V preglednici 4 so prikazane ravni pomembnosti, ki so bile ugotovljene s statističnimi primerjavami za vsak parameter pri treh testnih pogojih.

Preglednica 3 – Opredeljeni biomarkerji v vzorcih *S. albida*, ki so bili izpostavljeni različnim testnim pogojem: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), S-Low (lesene plošče, zaščitene z 0,003-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin) in UC5 (lesene plošče, zaščitene z 1-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin).

<i>Steromphala albida</i>	C		NTC		S-Low		UC5	
	povpreč je	sd	povpreč je	sd	povpreč je	sd	povpreč je	sd
smrtnost (%)	0,41	0,03	0,76	0,74	1,11	0,66	100	
AChE (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	1,09	0,14	0,96	0,20	1,22	0,50		
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	175,40	29,77	157,64	29,27	138,78	21,22		
GST (nmoli CDNB min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	89,27	36,73	97,20	42,58	123,84	65,10		
MT (nmoli mg ⁻¹ prot)	4,63	0,16	4,81	0,12	4,91	0,66		
FT (sec)	410,30	81,52	183,30	62,27	321,07	259,31		

sd= standardni odklon

Preglednica 4 - Ugotovljene ravni pomembnosti pri statističnih primerjavah med vzorci polžev, ki so bili izpostavljeni naslednjim testnim pogojem, po posameznem parametru: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče) S-Low (lesene plošče, zaščitene z 0,033-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin).

<i>p</i>	smrtnost	AChE	CAT	GST	MT	FT
C vs NTC	0,810	0,739	0,911	0,8807	0,892	0,117
C vs S-Low	0,275	0,757	0,675	0,0913	0,322	0,700
NTC vs S-low	0,801	0,355	0,901	0,2402	0,549	0,447

Podobno kot pri školjkah, je bila tudi pri polžih, ki so bili izpostavljeni ploščam, zaščitnim s Silvanolinom UC5, 2 dni po začetku preizkušanja zabeležena 100 % stopnja umrljivosti, zato niti v tem primeru ni bilo mogoče nadaljevati preiskave z drugimi biomarkerji.

Organizmi, izpostavljeni kontrolnim pogojem, NTC in S-Low testnim pogojem, pa so izkazali po 4 tednih precej med seboj podobne vrednosti preživetja, ki so bile vsekakor nad 98,89 %. Noben biokemijski biomarker, opredeljen pri polžih, ni beležil večjih razlik med kontrolnima (C in NTC) vzorcema in tistim, obdelanim z raztopino S-Low, kar tudi za indikatorsko vrsto *S. albina* potrjuje odsotnost antioksidativnih in nevrotoksikoloških učinkov, kakor tudi indukcije metalotioneina na ploščah, obdelanih s Silvanolinom S-Low.

S fiziološkega vidika niti vedenjski test (flipping test oz. test prevračanja), ki je bil opravljen za oceno vitalnosti in motoričnih sposobnosti organizmov, ni pokazal prisotnosti stresnega stanja, čeprav je pri kontrolnem vzorcu beležil rahlo višje vrednosti od tistih, izmerjenih pri vzorcih, izpostavljenih ploščam NTC in S-Low, saj se je ta parameter izkazal za precej spremenljivega med osebki, razlike med vzorci pa niso bile statistično izrazite.

V preglednici 5 so prikazane analize kovin, opravljene na vzorcih vode, odvzete iz posod z različnimi testnimi pogoji 2, 8, 18 in 25 dni po začetku preizkušanja.

Preglednica 5 - Vsebnost kovin (ppb) v vzorcih vode, redno odvzete iz posod z različnimi testnimi pogoji: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), S-Low (lesene plošče, zaščitene z 0,003-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin) in UC5 (lesene plošče, zaščitene z 1-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin).

Vzorci	Dan	Hg	Al	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
		ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb
C	2	< d.l.	207	18	< d.l.	< d.l.	5	< d.l.	3	< d.l.	< d.l.	148
	8	< d.l.	195	21	< d.l.	< d.l.	8	< d.l.	4	< d.l.	< d.l.	109
	18	< d.l.	182	17	< d.l.	< d.l.	7	< d.l.	5	< d.l.	< d.l.	81
	25	< d.l.	224	17	< d.l.	< d.l.	6	< d.l.	11	< d.l.	< d.l.	71
NTC	2	< d.l.	200	23	< d.l.	< d.l.	8	< d.l.	22	< d.l.	< d.l.	144
	8	< d.l.	186	26	< d.l.	< d.l.	11	< d.l.	28	< d.l.	< d.l.	106
	18	< d.l.	104	20	< d.l.	< d.l.	7	< d.l.	8	< d.l.	< d.l.	67
	25	< d.l.	190	18	< d.l.	< d.l.	6	< d.l.	16	< d.l.	< d.l.	63
S-Low	2	< d.l.	253	25	< d.l.	< d.l.	34	< d.l.	6	< d.l.	< d.l.	151
	8	< d.l.	199	28	< d.l.	< d.l.	46	< d.l.	14	< d.l.	< d.l.	117
	18	< d.l.	100	22	< d.l.	< d.l.	40	< d.l.	9	< d.l.	< d.l.	73
	25	< d.l.	198	24	< d.l.	< d.l.	25	< d.l.	19	< d.l.	< d.l.	78
UC5	2	< d.l.	225	19	< d.l.	< d.l.	211	< d.l.	6	< d.l.	< d.l.	170
	8	< d.l.	240	23	< d.l.	< d.l.	437	< d.l.	12	< d.l.	< d.l.	160

d.l. = meja zaznavnosti

Na splošno je bilo ugotovljeno, da so bile koncentracije Hg, Cd, Fe, Ni in Pb v vseh testnih posodah pod mejo zaznavnosti, koncentracije Al, Ba, Mn in Zn pa so bile izredno nizke in stalne v času izpostavljenosti. Koncentracije Cu so bile nizke in stalne v celotnem obdobju preizkušanja tako v kontrolnih posodah C kot v posodah z neobdelanimi ploščami (NTC). Izmerjene vrednosti so v C posodah varirale od 5 do 8 ppb, v NTC posodah pa od 8 do 11 ppb. Koncentracija Cu v posodah s ploščami, obdelanimi z raztopino S-Low, je po preteku 2 dni dosegla 34 ppb, na 8. dan se je zvišala do najvišje vrednosti (46 ppb), nato pa se je postopno znižala na 25 ppb po 25 dneh. Koncentracija Cu v posodah s ploščami, obdelanimi s Silvanolinom UC5, je po preteku 2 dni beležila vrednost 211 ppb, ki se je na 8. dni zvišala na 437 ppb. Ti podatki kažejo na postopno sproščanje CU z obdelanih plošč; baker se je tako postopno nabiral v vodi vsaj do osmega dne. Ta pojav, ki je bil izrazitejši v posodah s ploščami, obdelanimi s Silvanolinom UC5, je bil ugotovljen tudi pri posodah s ploščami, obdelanimi s Silvanolinom S-Low. Obseg sproščanja v posodah s ploščami, obdelanimi s Silvanolinom UC5, je sicer povzročil popolno izumrtje izpostavljenih organizmov, zaradi česar smo morali prekiniti test.

4 ZAKLJUČKI

V sklopu opravljenih preizkušanj za preverjanje prisotnosti morebitnih strupenih učinkov dveh postopkov obdelave na osnovi bakra v različni koncentraciji plošč *Picea abies*, ki so bile nameščene v kontrolirano morsko okolje, so meritve z biomarkerji na dve bioindikatorski vrsti školjk pokazale, da je na ploščah, obdelanih s Silvanolinom z 1 % Cu

koncentracijo, prišlo do izpiranja bakra (do 437 ppb), kar je posledično povzročilo 100 % smrtnost vseh osebkov. Plošče, obdelane s Silvanolinom s 0,033 % Cu, niso imele ekotoksičnih učinkov na obe vrsti morskih nevretenčarjev, ker so bile izmerjene vrednosti biomarkerjev enake tistim, ugotovljenim pri organizmih, izpostavljenih kontrolnim pogojem (brez plošč) oz. neobdelanim naravnim ploščam.

NAVEDENI VIRI

Bolognesi, C, Fenech, M (2012): Mussel micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 7, 1125-1137.

Bradford, MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Cabecinhas, AS, et al., (2015): Sensitivity of the sea snail *Gibbula umbilicalis* to mercury exposure-linking endpoints from different biological organization levels. *Chemosphere*, 119, 490-497.

Claiborne, A (1985): Catalase activity. In: Greenwald, R. A. (ed.) *Handbook of methods of oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 283-284.

Crosby, MP, Gale, LD (1990): A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research*, 9(1), 233-237.

Dailiani S. (2010): Environmental impact of anthropogenic activities: the use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. In: *Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact*. Lauren E. McGevin (Ed), pp.1-30 Nova Science Publishers, Inc.

Eertman, RHM, Wagenvoort, AJ, Hummel, H, Small, AC (1993): "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170, 179-195.

Ellman, GL, Courtney, KO, Andres, V, Featherstone, RM (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.

Gehan, EA (1965): A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. *Biometrika*, 52, 203-223.

Habig, WH, Jakoby, WB (1981): Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology*, 77, 398-405.

Kaplan, EL, Meier, P (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of the American Statistical Association, 53, 457-481.

Kimura, M, Otaki, N, Imano, M (1979): Rabbit liver metallothionein tentative amino acid sequence of metallothionein B. In Kagi J.H.R. e Norberg M. (eds). Metallothionein Experientia Supplementum, 24: 163-168.

Lo Monaco, A, Balletti, F, Pelosi, C (2018): Wood in cultural heritage properties and conservation of historical wooden artefacts. European Journal of Science and Theology, 14(2), 161-171.

Marais, BN, Brischke, C, Miltz, H (2022): Wood durability in terrestrial and aquatic environments - A review of biotic and abiotic influence factors. Wood Material Science & Engineering, 17(2), 82-105.

R Core Team, (2020): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>.

USEPA (Environment Protection Agency of United State of America). Method 200.7, Determination of Metals and Trace Elements in water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, 1994B.

Viarengo, A, Ponzano, E, Dondero, F, Fabbri, R (1997): A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Marine Environmental Research, 44, 69-84.

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.