

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

Versione: N. 1

WP di riferimento: 3

Partner Responsabile: LP

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

Data: 31/07/2022

SOMMARIO.....	2
1 INQUADRAMENTO DELLA PROBLEMATICHE E DEL PROGETTO DURASOFT.....	2
1.1 Finalità delle attività svolte nell'ambito dell'ATT19.....	3
2 MATERIALI E METODI.....	4
2.1 Raccolta e trattamento degli organismi test.....	4
2.2 Determinazioni dei biomarker e analisi chimiche.....	5
2.3 Analisi statistiche.....	7
3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	7
4 CONCLUSIONI.....	11
BIBLIOGRAFIA CITATA.....	12

ACRONIMI

AChE: acetilcolinesterasi

C: condizione sperimentale di controllo senza pannelli di legno

CAT: catalasi

UC3: condizione sperimentale con pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0.25% di Cu

DIN = Azoto inorganico disciolto (N-NH₃ + N-NO₂ + N-NO₃)

d.l : limite di rilevamento strumentale

GST: glutatione-s-transferasi

IC: indice di condizione

MT: metallotioneine

NTC: condizione sperimentale di controllo con pannelli in legno non trattato

se: errore standard

sd: deviazione standard

SOS: sopravvivenza in aria

TM: condizione sperimentale con pannelli in legno modificati termicamente

SOMMARIO

Il report descrive le attività condotte nell'ambito della ATT 19 finalizzata a valutare la compatibilità ambientale di pannelli in legno di conifera della specie *Picea abies* trattati termicamente e con un impregnante a base di rame (Silvanolin) per aumentarne la durabilità in ambiente dulciacquicolo. A tal fine è stata condotta una sperimentazione di laboratorio utilizzando due specie di invertebrati tipici degli ambienti di acqua dolce: il bivalve *Dreissena polymorpha* e il gasteropode *Theodoxus fluviatilis*. Questi organismi bioindicatori sono stati mantenuti per 4 settimane in vasche sperimentali in condizioni semistatiche di: controllo (senza pannelli di legno), NTC (pannelli di legno non trattati), TM (pannelli di legno termicamente modificati) e UC3 (pannelli di legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0,25% di Cu). Nelle vasche con pannelli in legno il rapporto superficie pannello/volume d'acqua finale è stato di 0,018. Dopo 2, 10, 17 e 27 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 metallothioneine e la presenza di effetti neurotossici attraverso la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi. Le risposte fisiologiche sono state valutate nei mitili mediante la capacità di sopravvivenza all'aria e l'indice di condizione. Inoltre, giornalmente è stata determinata la mortalità in vasca in entrambe le specie. La condizione UC3 ha mostrato la più alta tossicità che nei gasteropodi ha determinato una mortalità del 100% dopo due giorni dall'inizio dell'esposizione, mentre per i mitili la mortalità alla fine delle 4 settimane di esposizione è arrivata all'83%. Gli organismi esposti ai pannelli termicamente modificati, nonché tutti i controlli (organismi esposti ai pannelli non trattati e quelli non esposti ad alcun pannello) sono sopravvissuti per tutta la durata dell'esperimento con percentuali comprese tra il 82 e il 90.5% per i mitili e tra il 43.1 ed il 68% per i gasteropodi. I risultati delle analisi dei biomarker condotte nei mitili suggeriscono di poter escludere la presenza di particolari effetti tossici imputabili alle condizioni NTC e TM. Le risposte biologiche determinate nei gasteropodi tuttavia hanno evidenziato un quadro piuttosto complesso ma che non appare legato alla presenza di composti inorganici rilasciati nell'acqua dai pannelli. I pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC3 hanno determinato la mortalità totale dei gasteropodi e danni a livello fisiologico e a carico del sistema antiossidante dei mitili che hanno altresì mostrato una significativa induzione delle metallothioneine. Tali risposte sono coerenti con la concentrazione di rame misurata nell'acqua che è risultata superiore 200 ppb dopo 10 giorni di esposizione, mentre era inferiore a 8 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 quelle legate alla pesca. Strutture abitative tradizionali insieme alle infrastrutture lignee complementari quali moli, pali di segnalazione e ormeggio ma anche recinzioni, camminamenti sono ampiamente utilizzati e possiedono un

notevole valore storico e socio-ecologico (Lo Monaco et al. 2018). Tuttavia, il legno è un materiale particolarmente soggetto all'azione di vari fattori di decomposizione 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 e aumentare la sicurezza delle costruzioni in legno. A questo scopo vengono abitualmente utilizzati nella formulazione dei preservanti del legno dei conservanti chimici quali i composti a base di rame. Il rame, però, non è in grado di fissarsi direttamente al legno, e pertanto è necessario impiegare 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 intende vietare o limitare 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 il cui uso prevede il contatto con il terreno o con acqua dolce oppure permanentemente esposto 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 tradizionali di conifere.

1.1 Finalità delle attività svolte nell'ambito dell'ATT 19

Nell'ambito delle attività progettuali, la ATT19 è stata finalizzata ad investigare i potenziali effetti ecotossicologici di materiali lignei trattati termicamente o con un impregnante a base di rame (con etanolamina e acido carbossilico come composti di fissazione) quanto vengono esposti in ambiente dulciacquicolo attraverso l'applicazione di una batteria di biomarker. In particolare, la compatibilità ambientale dei trattamenti applicati a campioni di *Picea abies* è stata valutata su organismi bioindicatori, quali bivalvi e gasteropodi, tipici di ambienti dulciacquicoli (*Dreissena polymorpha* e *Theodoxus fluviatilis*) (Faria et al., 2009, Bighiu et al, 2017). Organismi di entrambe le specie sono stati esposti in condizioni controllate di laboratorio a campioni di legno sottoposti alle due tipologie di trattamento (termico e chimico). Lo stato di salute di questi organismi biomonitor è stata valutata mediante determinazione di una batteria di biomarker di tipo biochimico e fisiologico, 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 Cu e di altri metalli riscontrata nell'acqua delle vasche sperimentali al fine di verificare eventuali fenomeni di lisciviazione.

2 MATERIALI E METODI

Le attività sperimentali relative alla ATT 19 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 3000 esemplari adulti del bivalve *D. polymorpha* e del gasteropode *T. fluviatilis* sono stati raccolti rispettivamente nelle zone del Lago di Garda e in quelle lungo il fiume Sile ad ottobre 2021 (Fig. 1).

Dopo un periodo di acclimatamento di circa due settimane, gli organismi sono stati distribuiti ed esposti a quattro condizioni sperimentali: C controllo (senza pannelli di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), TM (pannelli in legno termicamente modificati) e UC3 (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0,25% di Cu) per la durata di 4 settimane. Per ciascuna condizione sperimentale sono state allestite tre vasche (i.e. repliche).



Fig. 1 - Campionamento dei gasteropodi lungo il fiume Sile

In ciascuna vasca sperimentale contenente 46 litri di acqua dolce 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, lo stesso rapporto utilizzato per gli esperimenti condotti nell'ambito della ATT18. Data l'assenza di protocolli specifici, la scelta di utilizzare questo specifico rapporto superficie/volume è stata determinata sulla base della capacità 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*, come già descritto nel report relativo alla ATT18. 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 circa 200 mitili e 250 gasteropodi (Fig. 2-3).

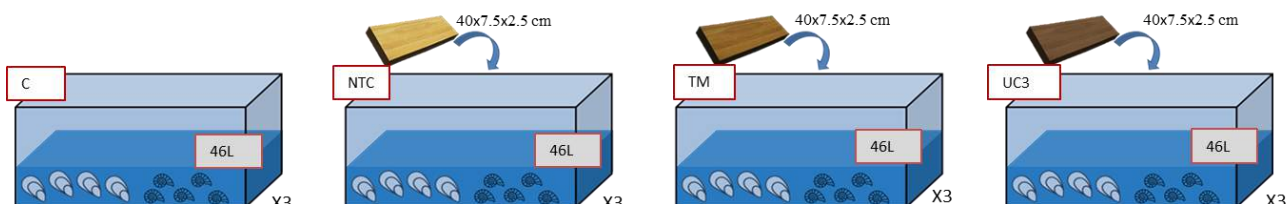


Fig. 2 - Schema delle condizioni sperimentali testate



Fig. 3 - 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 macrofite acquatiche raccolte lungo i margini del fiume Sile. 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 d'acqua per effettuare le analisi chimiche. Durante l'esperimento e il periodo di acclimatazione gli animali sono stati mantenuti alla temperatura di $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

2.2 Determinazione dei biomarker e analisi chimiche

Gli eventuali effetti tossici dei diversi trattamenti dei pannelli di legno sono stati valutati nelle due specie di organismi bioindicatori attraverso la determinazione di una batteria di

indici di stress o biomarker, applicati a livello biochimico e fisiologico. 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 dell'acetilcolinesterasi (AChE) coinvolta nella trasmissione degli impulsi nervosi. Inoltre è stata valutata la quantità di metallotioneine (MT) proteine coinvolte nei processi di detossificazione dei metalli. Per valutare complessivamente lo stato fisiologico degli organismi, nei mitili è stato determinato l'indice di condizione che fornisce indicazioni sulla massa corporea degli organismi e la capacità di resistenza all'aria. Inoltre, in entrambe le specie è stata valutata quotidianamente la mortalità in vasca. Data la dimensione molto piccola degli individui appartenenti alle due specie di molluschi utilizzate, i biomarker biochimici sono stati determinati sull'intero tessuto molle. In entrambe le specie bioindicatrici l'attività della CAT è stata analizzata secondo Wojtal-Frankiewicz et al. (2014), 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 di AChE è stata valutata secondo Binelli et al. (2005). Tutte le determinazioni biochimiche sono state riferite al contenuto proteico totale misurato secondo il metodo di Bradford (1976). Ciascuna determinazione è stata eseguita su 2-3 pool per vasca sperimentale, ciascun pool composto da almeno 5-10 organismi a seconda della specie.

In *D. polymorpha* l'indice di condizione [IC = (peso secco del tessuto molle/peso secco della conchiglia) * 100] è stato valutato su 4 animali di ciascuna vasca (12 organismi per condizione sperimentale) secondo Crosby e Gale (1990). 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). Inoltre durante le 4 settimane di esperimento, la mortalità è stata monitorata quotidianamente e gli organismi morti sono stati prontamente rimossi.

Per valutare la quantità di nutrienti presenti nelle vasche sperimentali sono state determinate le concentrazioni di N-NH₃, N-NO₂, N-NO₃, DIN e P-PO₄ in campioni di acqua raccolti alla fine dell'esperimento. Le analisi dei nutrienti sono state eseguite utilizzando l'analizzatore EasyChem Plus, costruito dalla ditta SYSTE A S.p.A., e seguendo le metodiche riportate in Grasshoff et al. (1983).

Per valutare il possibile rilascio di composti inorganici da parte dei pannelli di legno trattati, la concentrazione di rame e di altri metalli è stata determinata mediante spettrometria di emissione atomica al plasma accoppiata induttivamente (ICP-AES) (USEPA 1994, Metodo 200.7) in campioni di acqua raccolti dopo 2, 10, 17 e 27 giorni.

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 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 di ciascun trattamento sono stati confrontati 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 *D. polymorpha* 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 UC3 hanno raggiunto livelli di mortalità superiori all'80% alla fine delle 4 settimane, valori che sono risultati significativamente superiori a quelli raggiunti dagli organismi esposti alle altre tre condizioni sperimentali (C, NTC e TM). I livelli di mortalità registrati negli organismi esposti alla condizione di controllo (C), ai pannelli non trattati (NTC) ed ai pannelli termicamente modificati (TM) sono risultati invece simili tra loro e compresi tra 9,50% - 18%.

Tabella 1 - Biomarker determinati in campioni di *D. polymorpha* esposti a varie condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), TM (pannelli in legno termicamente modificati) e UC3 (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0,25% di Cu).

<i>D. polymorpha</i>	C		NTC		TM		UC3	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
mortalità (%)	11,83	3,33	18,00	1,00	9,50	2,29	83,17	17,96
SOS LT ₅₀ (giorni)	4		4		4		15	
IC ((peso secco parte molle / peso secco conchiglia)*100)	2,42	0,50	2,20	0,58	2,27	0,81	1,60	0,50
AChE (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	29,32	5,00	34,11	7,17	37,91	4,19	31,40	2,13
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	109,34	8,86	120,34	15,18	129,04	7,82	127,88	14,03
GST (nmoli CDNB min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	262,63	29,63	209,44	24,17	205,09	13,40	88,03	40,99
MT (nmoli mg ⁻¹ prot)	4,81	0,71	5,11	0,64	4,61	1,25	6,89	1,05

sd= deviazione 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), TM (pannelli in legno termicamente modificati), UC3 (pannelli di legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0,25% di Cu)

<i>p</i>	mortalità	IC	SOS	AChE	CAT	GST	MT
C vs NTC	0,845	0,812	0,745	0,241	0,705	0,181	0,953
C vs TM	0,99	0,937	0,039	0,005	0,219	0,128	0,984
C vs UC3	<1e-04	0,004	0.0001	0,940	0,694	<0.001	0,044
NTC vs TM	0,671	0,989	0,018	0,448	0,830	0,998	0,815
NTC vs UC3	<1e-04	0,042	<1e-04	0,877	0,971	0,028	0,110
TT vs UC3	<1e-04	0,016	0,015	0,275	1,000	0,037	0,021

Le analisi dei biomarker hanno evidenziato dal punto di vista fisiologico la presenza di uno stato di stress maggiore a carico dei campioni esposti ai pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC3. La SOS, che fornisce indicazioni sulla capacità di sopravvivenza dell'organismo all'aria, ha evidenziato valori significativamente inferiori (apparentemente indicativi di una peggiore condizione fisiologica) dei campioni di controllo e in quelli esposti a pannelli NTC e TM rispetto a quelli esposti a UC3. 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 nei mitili non sono mai emersi segnali in tal senso. L'indice di condizione (IC), che fornisce indicazioni sulla quantità della massa corporea rispetto alla conchiglia e che viene abitualmente utilizzato per dare un'indicazione generale sullo stato di salute dell'organismo, ha mostrato valori significativamente inferiori negli organismi esposti alla condizione UC3 rispetto ai valori registrati in tutti gli altri campioni. Tra i biomarker biochimici, un'inibizione significativa dell'attività dell'enzima AChE, implicato nella corretta trasmissione dei segnali elettrici a livello delle membrane sinaptiche ed abitualmente considerato un parametro indicativo dell'esposizione di contaminanti organici (quali gli organofosforici ed carbammati), non è stata riscontrata nel campione esposto a UC3 rispetto ai controlli, come pure nei campione esposto a pannelli TM rispetto ai controlli. Anzi in questo ultimo caso, i valori dell'attività enzimatica sono addirittura risultati significativamente superiori nel campione TM rispetto al campione di controllo, suggerendo l'assenza di un effetto neurotossico dei due trattamenti (chimico e fisico) negli organismi modello.

L'attività antiossidante della CAT è risultata simile tra controlli e trattati mentre quella della GST è apparsa significativamente ridotta nei campioni esposti ai pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC3 rispetto a quella registrata negli organismi esposti alle altre tre condizioni sperimentali.

La concentrazione nei tessuti di metallotioneine, gruppo di proteine a basso peso molecolare e ricche di residui di cisteina, implicate nei meccanismi di detossificazione dai metalli, è risultata simile nei campioni di controllo ed in quelli esposti ai pannelli NTC e TM. Il livello di queste proteine è risultato invece significativamente più elevato nel campione esposto ai pannelli UC3 rispetto sia al campione di controllo che a quello esposto ai pannelli TM, suggerendo la presenza di fenomeni di induzione di queste particolari proteine a seguito dell'esposizione a pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC3.

I risultati dell'analisi dei biomarker determinati in *T. fluviatilis* 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 *T. fluviatilis*. esposti a varie condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), TT (pannelli in legno termicamente modificati) e UC3 (pannelli in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0.25% di Cu).

<i>Theodoxus sp</i>	C		NTC		TM		UC3	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
mortalità (%)	56,90	6,91	42,20	4,45	32,04	6,32	100	
AChE (mmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	577,42	105,23	489,12	29,81	406,66	28,36		
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	442,92	82,27	293,57	140,93	377,75	175,86		
GST (nmoli CDNB min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	428,65	69,86	531,12	69,38	454,70	81,51		
MT (nmoli mg ⁻¹ prot)	3,95	0,21	4,71	0,86	6,35	0,39		

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), TM (pannelli in legno termicamente modificati).

<i>p</i>	mortality	AChE	CAT	GST	MT
C vs NTC	< 0,001	0,001	<0,001	0,065	0,098
C vs TM	< 0,001	< 1e-04	0,044	0,836	<0,001
NTC vs TM	0,010	0,001	0,006	0,216	<0,001

I gasteropodi esposti ai pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC3 hanno raggiunto una mortalità del 100 % entro 2 giorni dall'inizio dell'esperimento e per questo campione non è stato quindi possibile procedere con l'analisi di altri biomarker.

Gli organismi esposti alle condizioni sperimentali di controllo, NTC e TM hanno invece mostrato valori di sopravvivenza piuttosto variabili e significativamente diversi tra loro. In particolare il campione di controllo ha mostrato alla fine delle 4 settimane di esposizione livelli di sopravvivenza più bassi (43,1%) sia rispetto ai campioni esposti ai pannelli NTC (57,8%) e TM (67,96%).

L'attività degli enzimi AChE e CAT sono risultati significativamente inibiti nei campioni esposti ai pannelli NTC e TM rispetto ai controlli mentre quella dell'enzima GST non ha evidenziato differenze significative tra le tre condizioni sperimentali.

La concentrazione di metallotioneine (MT) è risultata significativamente diversa nelle tre condizioni sperimentali, mostrando valori più elevati nel campione esposto a pannelli TM rispetto a quello esposto a pannelli NTC che a sua volta è risultato più elevato rispetto ai campioni di controllo.

Complessivamente l'analisi dei risultati ottenuti dai diversi biomarker ha evidenziato una situazione particolarmente complessa e di difficile interpretazione per questa specie in quanto, a fronte di un indiscusso effetto tossico del trattamento UC3, sia il trattamento TM che NTC hanno determinato l'insorgenza di alcuni segnali di stress di tipo ossidativo e neurotossico negli organismi. Inoltre, il trattamento TM ha determinato anche una maggiore induzione di MT indicative di uno stress derivante dalla presenza di metalli. Tuttavia, i dati di mortalità suggeriscono la presenza di una condizione fisiologica non ottimale anche negli organismi di controllo probabilmente legata alla condizione di mantenimento in vasca di questa specie o alla presenza di altri composti di origine naturale provenienti dal legno che sono risultati tossici per questa specie particolarmente sensibile.

Al fine di valutare se lo stato trofico dell'acqua contenuta nelle vasche sperimentali aveva in qualche modo influenzato le risposte biologiche degli organismi biomonitor sono state analizzate le concentrazioni di alcuni nutrienti. Lo stato trofico dell'acqua contenuta nelle varie vasche alla fine dell'esperimento è risultata complessivamente simile in tutte le condizioni sperimentali (Tab. 5) escludendo in tal modo la possibilità che gli organismi si fossero alimentati in maniera diversificata a seconda delle vasche o che fossero subentrati problemi di alterate concentrazioni di ammoniaca, nitrati e nitriti nelle diverse condizioni sperimentali che avessero potuto impattare la fitness degli organismi.

Tab. 5 - Concentrazione di nutrienti (μM) in campioni di acqua prelevati a fine esperimento dalle vasche rappresentanti le diverse condizioni sperimentali: C (senza pannello di legno), NTC (pannelli in legno non trattato), Cul (pannelli in legno trattati con soluzione al 0,033% Cu) e Cull (pannelli in legno trattati con soluzione all' 1% Cu).

	N-NH3		N-NO2		N-NO3		DIN*		P-PO4	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
C	4,1	3,4	29,5	8,8	651,4	62,1	684,9	62,0	8,8	1,36
NTC	2,0	0,9	23,9	15,9	622,2	22,4	648,0	37,9	7,2	1,59
TM	3,2	1,2	60,7	6,1	592,7	33,4	656,5	28,3	8,1	0,704
UC3	1,7	0,9	40,4	44,5	622,5	49,2	664,5	29,5	6,8	0,99

sd= deviazione standard

* DIN = Azoto inorganico disciolto (N-NH3 + N-NO2 + N-NO3)

Le analisi dei metalli determinate nei campioni di acqua prelevati dopo 2, 10, 17 e 27 giorni dall'inizio dell'esperimento nelle 4 diverse condizioni sperimentali sono riportate in tabella 6. In generale le concentrazioni di Hg, Cd, Fe e Ni sono risultate al di sotto del limite di rilevamento strumentale in tutte le vasche sperimentali, e quelle di Al, Ba, Cr, Mn, Pb e Zn sono risultate molto 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) e in quelli termicamente modificati (TM). In particolare, i valori sono risultati variabili tra i 3-7 ppb nelle vasche C, 3-8 ppb nelle vasche NTC e 4-5 ppb nelle vasche TM. La concentrazione di Cu nelle vasche contenenti i pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC3 ha mostrato invece un valore di 156 ppb al 2° giorno dell'esperimento e ha raggiunto il valore più elevato al 10° giorno (203 ppb) per poi scendere progressivamente fino a 129 ppb al 27° giorno.

Questi dati evidenziando un progressivo rilascio di Cu dai pannelli trattati con la formulazione UC3 che si è progressivamente accumulato nell'acqua almeno fino al decimo giorno per poi iniziare a scendere. L'entità del rilascio nelle vasche contenenti i pannelli trattati con la formulazione di Silvanolin UC3 ha di fatto determinato la totale moria dei gasteropodi e la presenza di alcuni segnali di stress nei mitili.

Tab. 6 - 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), Cul (pannelli in legno trattati con soluzione al 0,033% Cu) e Cull (pannelli in legno trattati con soluzione all' 1% 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.	78	37	< d.l.	1	3	6	0	< d.l.	3	8
	10	< d.l.	28	41	< d.l.	1	7	< d.l.	1	< d.l.	4	7
	17	< d.l.	30	43	< d.l.	1	6	< d.l.	1	< d.l.	2	8
	27	< d.l.	135	47	< d.l.	1	6	17	1	< d.l.	4	15
NTC	2	< d.l.	17	26	< d.l.	1	3	< d.l.	2	< d.l.	3	6
	10	< d.l.	23	38	< d.l.	1	8	< d.l.	1	< d.l.	4	6
	17	< d.l.	23	39	< d.l.	1	7	< d.l.	1	< d.l.	2	7
	27	< d.l.	32	47	< d.l.	1	4	4	2	1	3	12
TT	2	< d.l.	30	34	< d.l.	1	5	< d.l.	2	< d.l.	4	5
	10	< d.l.	27	33	< d.l.	1	4	1	2	< d.l.	4	6
	17	< d.l.	28	41	< d.l.	1	5	2	1	< d.l.	3	14
	27	< d.l.	34	44	< d.l.	1	5	2	1	< d.l.	2	8
Culll	2	< d.l.	24	36	< d.l.	1	156	< d.l.	12	< d.l.	3	8
	10	< d.l.	45	44	< d.l.	1	203	5	9	1	4	15
	17	< d.l.	37	43	< d.l.	1	173	1	7	< d.l.	3	14
	27	< d.l.	33	44	< d.l.	2	129	3	4	< d.l.	3	10

d.l.= limite di rilevamento

4 CONCLUSIONI

Nell'ambito delle attività sperimentali condotte per verificare la presenza di eventuali effetti tossici del trattamento termico e di quello a base di Silvanolin contenente Cu allo 0.25% su pannelli di *Picea abies* esposti in un ambiente controllato di tipo dulciacquicolo, l'applicazione di una batteria di biomarker misurati su due specie di molluschi bioindicatori (*D. polymorpha* e *T. fluviatilis*) ha evidenziato che i pannelli trattati con una la formulazione di Silvanolin contenente Cu allo 0,25% ha portato ad una lisciviazione del rame (fino a 203 ppb) che a sua volta ha causato la mortalità del 100% dei gasteropodi e determinato segnali di stress fisiologici e a carico del sistema antiossidante dei mitili. I mitili hanno altresì mostrato una significativa induzione di metallotioneine, proteine implicate nei meccanismi di detossificazione dai metalli. I pannelli termicamente modificati (TM), come pure i pannelli naturali non trattati (NTC) non hanno determinato

effetti ecotossicologici nei mitili mentre nei gasteropodi sono emersi alcuni segnali di stress di tipo ossidativo e neurotossico nonché una induzione di metallothioneine negli organismi esposti ai pannelli TM. Tuttavia, dal momento che le analisi chimiche effettuate su campioni di acqua non hanno sostanzialmente evidenziato la presenza di metalli nelle vasche contenenti i pannelli NTC e TM, i segnali di stress registrati nei gasteropodi devono probabilmente essere imputati alla presenza nelle vasche di altri composti naturali provenienti dal legno che possono essere risultati tossici per questa specie molto sensibile.

BIBLIOGRAFIA CITATA

Bighiu, M.A., Gorokhova, E., Almroth, B.C., Wiklund, A.K.E. (2017): Metal contamination in harbours impacts life-history traits and metallothionein levels in snails. PLoS ONE 12(7): e0180157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180157>.

Binelli, A, Ricciardi F, Riva, C, Provini, An (2005). Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. Chemosphere, 61, 1074-1082.

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.

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.

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.

Faria M., Carrasco L., Diez S., Riva M.C., Bayona J.M., Barata C., (2009): Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 149 281-288.

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

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds) (1983): Methods of Seawater Analysis. Second, Revised and Extended Edition. Wiley-VCH Verlag, pp. 419.

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.

Wojtal-Frankiewicz, A, Bernasińska, J, Frankiewicz, P, Gwoździński, K, Jurczak, T (2014): Response of *Daphnia*'s antioxidant system to spatial heterogeneity in cyanobacteria concentrations in a lowland reservoir. *PLOSOne*, 9(11): e112597. doi:10.1371/journal.pone.0112597.

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 sladkovodne bioindikatorske vrste z uporabo skupine biomarkerjev

Različica: ŠT. 1

Povezan DS: 3

Odgovorni partner: VP

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

Datum: 31. 07. 2022

1.1 Cilj aktivnosti, izvedenih v sklopu AKT19.....	3
2 MATERIALI IN METODE.....	3
2.1 Zbiranje in obdelava testnih organizmov.....	4
2.2 Opredelitev biomarkerjev in kemijske analize.....	5
2.3 Statistične analize.....	7
3 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	7
4 ZAKLJUČKI.....	11
NAVEDENI VIRI.....	12

OKRAJŠAVE

AChE: acetilholinesteraza

C: kontrolni testni pogoj brez lesenih plošč

CAT: katalaza

UC3: testni pogoj s prisotnostjo lesenih plošč, zaščitenih s 0,25 Cu raztopino Silvanolin

DIN = raztopljen anorganski dušik (N-NH₃ + N-NO₂ + N-NO₃)

d.l: meja zaznavnosti

GST: glutation S-transferaze

IC: kazalnik stanja

MT: metalotionein

NTC: kontrolni testni pogoj s prisotnostjo nezaščitenih lesenih plošč

se: standardna napaka

sd: standardni odklon

SOS: preživetje na zraku

TM: testni pogoj s prisotnostjo termično modificiranih lesenih plošč

POVZETEK

Poročilo opisuje aktivnosti, izvedene v sklopu AKT 19 z namenom ocenjevanja okoljske kompatibilnosti lesenih plošč vrste *Picea abies*, ki so bile termično modificirane in zaščitene z impregnacijskim sredstvom na osnovi bakra (Silvanolin) za povečanje njihove obstojnosti v sladkovodnem okolju. V ta namen je bilo opravljeno laboratorijsko preizkušanje z dvema vrstama nevretenčarjev, ki sta za sladkovodno okolje značilna; to sta sicer školjka *Dreissena polymorpha* in polž *Theodoxus fluviatilis*. Bioindikatorske organizme smo 4 tedne pustili v testnih bazenih v polstatičnih pogojih: kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (nezaščitene lesene plošče), TM (termično modificirane lesene plošče) in UC3 (lesene plošče, zaščitene z 0,25-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, 10, 17 in 27 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 prisotnost nevrotoksičnih učinkov z proučitvijo aktivnosti acetilkolinesteraze. Pri školjkah smo fiziološke odzive ocenili glede njihove sposobnosti za preživetje na zraku in kazalnika stanja. Dnevno smo tudi proučili stopnjo smrtnosti obeh vrst v bazenu. Pogoj UC3 se je izkazal za najbolj toksičnega; pri polžih je bila sicer zabeležena 100 % smrtnost po dveh dneh izpostavljenosti, pri školjkah pa je smrtnost po 4 dneh izpostavljenosti znašala 83 %. Organizmi, izpostavljeni termično modificiranim ploščam, in vsi kontrolni organizmi (organizmi, izpostavljeni neobdelanim ploščam, in tisti, ki niso bili izpostavljeni ploščam) so preživeli celoten čas preizkusa, natančneje školjka med 82 in 90,5 % ter polži med 43,1 in 68 %. Na podlagi rezultatov analiz biomarkerjev na školjkah je pri pogojih NTC in TM mogoče izključiti prisotnost posebno toksičnih učinkov. Biološki odzivi polžev so namreč pokazali dokaj zapleteno sliko, ki verjetno ni vezana na prisotnost anorganskih spojin, ki so se s plošč sproščale v vodo. Plošče, obdelane s Silvanolinom UC3, so povzročile smrt vseh polžev, pri školjkah pa so privedle do fizioloških poškodb, poškodb antioksidativnega obrambnega sistema, kakor tudi do izrazitih indukcij metalotioneina. Navedeni odzivi so v skladu z izmerjeno koncentracijo bakra v vodi, ki je po 10 dneh izpostavljenosti preseгла vrednosti 200 ppb, pri vseh drugih testnih pogojih pa je bila koncentracija v času trajanja preiskave nižja od 8 ppb.

1 OPREDELITEV PROBLEMATIKE IN PROJEKTA DURASOFT

Na alpsko-morskem območju severnega Jadrana se les obsežno uporablja v kmetijsko-pašniških in ribolovnih aktivnostih. Velik zgodovinski in družbeno-ekološki pomen imajo tradicionalne hiše ter pomožni leseni objekti, kot so pomoli, privezi, piloti in ograje (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. Pri formulaciji zaščitnih sredstev lesa se tako pogosto uporabljajo 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. Zaradi njegove rakotvorne lastnosti je večina evropskih držav prepovedala ali omejila uporabo kroma 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 s klasičnimi vrstami iglavcev.

1.1 Cilj aktivnosti, izvedenih v sklopu AKT 19

V sklopu projektih aktivnosti je bila AKT19 namenjena proučevanju potencialnih ekotoksikoloških učinkov lesenih materialov, ki so termično modificirani ali zaščiteni s sredstvom na osnovi bakra (z etanolaminom in karboksilno kislino kot veznima spojinama) in izpostavljeni sladkovodnemu okolju, z uporabo skupine biomarkerjev. Natančneje je bila okoljska združljivost zaščitnih obdelav, nanesenih na vzorce vrste *Picea abies*, ocenjena na bioindikatorske organizme, tipične za sladkovodno okolje, kot so školjke in polži (*Dreissena polymorpha* in *Theodoxus fluviatilis*) (Faria et al., 2009, Bighiu et al, 2017). Organizme obeh vrst smo izpostavili vzorcem lesa, obdelanimi z dvema zaščitnima postopkoma (termični in kemični), pod kontroliranimi laboratorijskimi pogoji. Zdravstveno stanje teh biorganizmov - biomonitorjev smo ocenili z naborom biokemijskih in fizioloških 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 vsebnost Cu in drugih kovin, prisotnih v vodi testnih bazenov, da bi tako preverili morebiten pojav izpiranja.

2 MATERIALI IN METODE

Preizkušanja v sklopu AKT 19 smo opravili v sobi akvarijev in v ekotoksikološkem laboratoriju Inštituta za morske znanosti v Benetkah.

2.1 Zbiranje in obdelava testnih organizmov

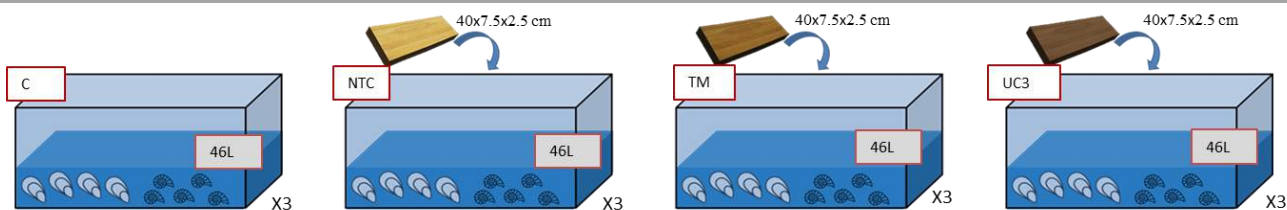
Oktobra 2021 smo na območjih Gardskega jezera in reke Sile nabrali približno 300 odraslih osebkov školjke *D. polymorpha* in polža *T. fluviatilis* (Slika 1).

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), TM (toplotno modificirane lesene plošče) in UC3 (lesene plošče, zaščitene z 0,25-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin). Za vsak testni pogoj so bile pripravljene tri posode (t.j. ponovitve).



Slika 1 - Vzorčenje polžev vzdolž reke Sile

V vsako testno posodo, ki vsebuje 46 litrov sladke 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; enako razmerje smo uporabili tudi pri preizkusih, opravljenih v sklopu AKT18. Ker ne obstajajo specifični protokoli, smo to razmerje površina/prostornina določili glede na prostornino akvarijev v inštitutu in rezultatov 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*, kot smo že opisali v poročilu o AKT18. 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 200 školjk in 250 polžev (sliki 2-3).



Slika 2 - Postopek proučevanja testnih pogojev



Slika 3 - 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 vodnimi makrofiti, nabrani na bregovih reke Sile. 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 je bila temperatura vode $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

2.2 Opredelitev biomarkerjev in kemijske analize

Pri obeh vrstah bioindikatorskih organizmov smo morebitne strupene učinke različnih zaščit lesenih plošč ocenili z uporabo skupine biokemijskih in fizioloških kazalcev stresa oz. biomarkerjev. Na biokemijski ravni je bil biološki odziv ocenjen glede na delovanje nekaterih antioksidantnih 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 količina beljakovin metalotionein (MT), ki sodelujejo pri detoksifikaciji kovin. Da bi ocenili splošno

fiziološko stanje organizmov, smo pri školjkah določili kazalnik stanja, ki podaja podatke o telesni masi samih organizmov, in njihovi odpornosti na zrak. Pri obeh vrstah smo tudi dnevno spremljali stanje umrljivosti v posodi. Ker so osebkii obeh proučevanih vrst školjk izredno majhni, smo biokemijske biomarkerje merili na celotnem mehkem tkivu. Pri obeh vrstah bioindikatorjev je bila aktivnost CAT ocenjena po postopku Wojtal-Frankiewicz in sod. (2014), 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 Binelliju in sod. (2005). Vse biokemijske meritve so se nanašale na vsebnost skupnih beljakovin, izmerjeno po Bradfordu (1976). Vsako merjenje je bilo izvedeno na 2-3 skupkih pri vsaki testni posodi, od tega vsak skupek sestavlja 5-10 organizmov po posamezni vrsti.

Pri vrsti *D. polymorpha* je bil kazalnik stanja $[IC = (\text{suha teža mehkega tkiva/suha teža lupine}) * 100]$ ocenjen na 4 živali za vsako posodo (12 organizmov za testni pogoj) po Crosbyju in Galu (1990). Čas preživetja školjk na zraku (SOS izražen kot LT50; to je potreben čas, da pogine polovica vzorcev) je bil izmerjen po Eertmanu in sod. (1993) na 10 živali na vsako posodo (30 organizmov za posamezni testni pogoj). Med 4-tedenskim testiranjem smo tudi dnevno spremljali umrljivost, umrle organizme pa nemudoma odstranili iz posode.

Količino hranil, prisotnih v testnih posodah, smo ovrednotili z merjenjem koncentracije N-NH₃, N-NO₂, N-NO₃, DIN in P-PO₄ v vzorcih vode, odvzetih ob zaključku preizkusa. Hranila so bila analizirana z napravo EasyChem Plus, ki jo izdelalo podjetje SYSTE A S.p.A., po metodi, opisani v publikaciji Grasshoff in sod. (1983).

Morebitno sproščanje anorganskih spojin z obdelane lesene plošče smo analizirali na podlagi koncentracije bakra in drugih kovin, ki je bila izmerjena v vodnih vzorcih, odvzetih po 2, 10, 17 in 27 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 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 *D. polymorpha*. V preglednici 2 so prikazane ravni pomembnosti, ki so bile ugotovljene s statističnimi primerjavami za vsak parameter pri treh testnih pogojih.

Po preteku 4 tednov je bila smrtnost pri vzorcih školjk, ki so bile izpostavljene ploščam, zaščitnim s Silvanolinom UC3, večja kot 80 %; ta vrednost je znatno višja od tistih, ki so bile beležene pri organizmih, izpostavljenih preostalim trem testnim pogojem (C, NTC in TM). Stopnje umrljivosti pri organizmih, ki so bili izpostavljeni kontrolnemu pogoju (C), neobdelanim ploščam (NTC) in termično modificiranim ploščam, so si med seboj podobne in variirajo od 9,50 % do 18 %.

Preglednica 1 - opredeljeni biomarkerji v vzorcih *D. polymorpha*, ki so bili izpostavljeni različnim testnim pogojem: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), TM (toplotno modificirane lesene plošče) in UC3 (lesene plošče, zaščitene z 0,25-odstotno bakrovo raztopino Silvanolin).

<i>D. polymorpha</i>	C		NTC		TM		UC3	
	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd
smrtnost (%)	11,83	3,33	18,00	1,00	9,50	2,29	83,17	17,96
SOS LT ₅₀ (dni)	4		4		4		15	
IC ((suha teža mehkega dela / suha teža lupine)*100)	2,42	0,50	2,20	0,58	2,27	0,81	1,60	0,50
AChE (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	29,32	5,00	34,11	7,17	37,91	4,19	31,40	2,13
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	109,34	8,86	120,34	15,18	129,04	7,82	127,88	14,03
GST (nmoli CDBN min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	262,63	29,63	209,44	24,17	205,09	13,40	88,03	40,99
MT (nmoli mg ⁻¹ prot)	4,81	0,71	5,11	0,64	4,61	1,25	6,89	1,05

sd= standardni odklon

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), TM (toplotno modificirane lesene plošče) in UC3 (lesene plošče, zaščitene z 0,25- odstotno bakrovo raztopino Silvanolin

<i>p</i>	smrtnost	IC	SOS	AChE	CAT	GST	MT
C vs NTC	0,845	0,812	0,745	0,241	0,705	0,181	0,953
C vs TM	0,99	0,937	0,039	0,005	0,219	0,128	0,984
C vs UC3	<1e-04	0,004	0,0001	0,940	0,694	<0.001	0,044
NTC vs TM	0,671	0,989	0,018	0,448	0,830	0,998	0,815
NTC vs UC3	<1e-04	0,042	<1e-04	0,877	0,971	0,028	0,110
TT vs UC3	<1e-04	0,016	0,015	0,275	1,000	0,037	0,021

Iz analiz biomarkerjev je bilo s fiziološkega vidika ugotovljeno stanje večjega stresa pri vzorcih, izpostavljenih ploščam, zaščitenim s Silvanolinom UC3. Kazalnik SOS, ki postreže z informacijami o sposobnosti organizma za preživetje na zraku, pa je izpostavil občutno nižje vrednosti (slednje baje nakazujejo slabše fiziološko stanje) pri kontrolnih vzorcih ter tistih, izpostavljenih ploščama NTC in TM v primerjavi z vzorci, izpostavljenimi pogoju C3. Ta podatek sicer ne kaže na prisotnost stresnega stanja pri organizmih v kontrolnih posodah, saj vsi preostali izmerjeni parametri pri školjkah ne pokažejo tovrstne slike. Kazalec stanja (IC), ki izraža količino telesne mase školjke in se običajno uporablja za označevanje splošnega zdravstvenega stanja organizma, je pri organizmih, izpostavljenih pogoju UC3, zabeležil občutno nižje vrednosti v primerjavi s tistimi, izmerjenimi pri vseh preostalih vzorcih. Kar zadeva biokemijske biomarkerje, v vzorcu, izpostavljenem pogoju UC3, in tistem, izpostavljenem ploščam TM, ni bilo v primerjavi s kontrolnimi vzorci ugotovljeno znatno zaviranje aktivnosti AChE encima, ki sodeluje v pravilnem prenosu električnih signalov v sinaptičnih membranah in je običajno uporabljen kot indikativen parameter izpostavljenosti organskim onesnažilom (kot so organofosforne spojine in karbamati). V primeru vzorca, izpostavljenega pogoju UC3, so bile vrednosti encimskega delovanja namreč znatno višje od tistih, beleženih pri kontrolnem vzorcu, kar kaže na odsotnost nevrotoksičnih učinkov obeh zaščitnih postopkov (kemijskega in fizičnega) pri vzorčnih organizmih.

Antioksidativno delovanje CAT je bilo podobno tako pri kontrolnih kot obdelanih vzorcih, delovanje GST pa je bilo občutno nižje pri vzorcih, izpostavljenih ploščam, zaščitenim s Silvanolinom UC3, v primerjavi z delovanjem, ugotovljenim pri organizmih, izpostavljenih preostalim trem testnim pogojem.

Koncentracija metalotioneinov - skupina nizkomolekularnih beljakovin, bogatih s cisteinom, ki sodelujejo pri detoksifikaciji kovin - v tkivih je bila tako pri kontrolnih vzorcih kot pri vzorcih, izpostavljenih ploščam NTC in TM, podobna. Pri vzorcu, izpostavljenem ploščam UC3, je bila ugotovljena znatno višja raven zgoraj navedenih beljakovin v primerjavi s kontrolnim vzorcem, kakor tudi z vzorcem, izpostavljenem ploščam TM. Navedena ugotovitev kaže sicer na morebitno prisotnost indukcije teh posebnih beljakovin, ki bi nastala v primeru izpostavljenosti ploščam, obdelanim s Silvanolinom UC3.

V preglednici 3 so prikazani rezultati analize biomarkerjev, opredeljenih pri vrsti *T. fluviatilis*. 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 *T. fluviatilis*, ki so bili izpostavljeni različnim testnim pogojem: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), TT (toplotno modificirane lesene plošče) in UC3 (lesene plošče, zaščitene z 0,25- odstotno bakrovo raztopino Silvanolin).

<i>Theodoxus sp</i>	C		NTC		TM		UC3	
	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd
smrtnost (%)	56,90	6,91	42,20	4,45	32,04	6,32	100	
AChE (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	577,42	105,23	489,12	29,81	406,66	28,36		
CAT (nmoli min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	442,92	82,27	293,57	140,93	377,75	175,86		
GST (nmoli CDNB min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	428,65	69,86	531,12	69,38	454,70	81,51		

MT (nmoli mg⁻¹ prot) 3,95 0,21 4,71 0,86 6,35 0,39

 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), TT (toplotno modificirane lesene plošče).

<i>p</i>	smrtnost	AChE	CAT	GST	MT
C vs NTC	< 0.001	0,001	<0.001	0,065	0,098
C vs TM	< 0.001	<1e-04	0,044	0,836	<0.001
NTC vs TM	0,010	0,001	0,006	0,216	<0.001

Pri polžih, ki so bili izpostavljeni ploščam, zaščitenim s Silvanolinom UC3, je bila 2 dni po začetku preizkušanja zabeležena 100 % stopnja umrljivosti, zato za ta vzorec ni bilo mogoče nadaljevati preiskave z drugimi biomarkerji.

Organizmi, izpostavljeni kontrolnim pogojem, NTC in TM testnim pogojem, pa so izkazali dokaj spremenljive vrednosti preživetja, ki so se med seboj močno razlikovale. Kontrolni vzorec je namreč po 4 tednih izpostavljenosti registriral nižjo raven preživetja (43,1%) v primerjavi z vzorci, izpostavljenimi pogojema NTC (57,8%) in TM (67,96%).

Delovanje encimov AChE in CAT je bilo občutno ihibirano pri vzorcih, izpostavljenih ploščam NTC in TM, v primerjavi s kontrolnimi vzorci, medtem ko delovanje GST encima ni pokazalo večjih razlik med tremi testnimi pogoji.

Koncentracija metalotioneina (MT) se je pri treh testnih pogojih močno razlikovala in je dosegla višje vrednosti pri vzorcu, izpostavljenem TM ploščam, kot pri tistem, izpostavljenem NTC ploščam; slednji pa je beležil višjo vrednost od kontrolnega vzorca.

Ocena rezultatov, pridobljenih z različnimi biomarkerji, je za to vrsto pokazala dokaj zapleteno in težko razumljivo sliko, ker sta poleg neizpodbitnega strupenega učinka obdelave UC3 zaščitni obdelavi TM in NTC povzročili pojav nekaterih znakov oksidativnega in nevrotoksikološkega stresa pri testnih organizmih. TM zaščita je tudi privedla do indukcije MT, kar kaže na stres ob prisotnosti kovin. Podatki o umrljivosti pa nakažejo prisotnost neugodnega fiziološkega stanja tudi pri kontrolnih organizmih, kar gre verjetno pripisati prebivanju vrste v posodah ali prisotnosti drugih naravnih spojin v lesu, ki so se za to izredno občutljivo vrsto izkazale kot strupene.

Da bi ocenili, v kolikšni meri je trofično stanje vode, vsebovane v testnih posodah, vplivalo na biološki odziv biomonitorjskih organizmov, smo analizirali koncentracijo drugih hranil. Na koncu preizkušanja je bilo trofično stanje vode, vsebovane v posameznih posodah, na splošno podobno v vseh testnih pogojih (Pregl. 5), kar izključi možnost, da so se organizmi hranili različno v raznih posodah ali da so nastale težave, povezane s spremembo koncentracije amonijaka, nitratov in nitritov v raznih testnih pogojih, ki bi lahko vplivale na telesno zdržljivost organizmov.

Preglednica 5 - Koncentracija hranil (µM) v vzorcih vode, odvzete iz posod z različnimi testnimi pogoji po zaključku preizkušanja: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), Cul (lesene plošče, zaščitene z 0,003 % Cu raztopino) in Cull (lesene plošče, zaščitene z 1 % Cu raztopino).

N-NH3 N-NO2 N-NO3 DIN* P-PO4

	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd
C	4,1	3,4	29,5	8,8	651,4	62,1	684,9	62,0	8,8	1,36
NTC	2,0	0,9	23,9	15,9	622,2	22,4	648,0	37,9	7,2	1,59
TM	3,2	1,2	60,7	6,1	592,7	33,4	656,5	28,3	8,1	0,704
UC3	1,7	0,9	40,4	44,5	622,5	49,2	664,5	29,5	6,8	0,99

sd= standardni odklon

* DIN = raztopljen anorganski dušik (N-NH3 + N-NO2 + N-NO3)

V preglednici 6 so prikazane analize kovin, opravljene na vzorcih vode, odvzete iz posod z različnimi testnimi pogoji 2, 10, 17 in 27 dni po začetku preizkušanja. Na splošno je bilo ugotovljeno, da so bile koncentracije Hg, Cd, Fe in Ni v vseh testnih posodah pod mejo zaznavnosti, koncentracije Al, Ba, Cr, Mn, Pb 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 (NTC) in termično modificiranimi ploščami (TM). Izmerjene vrednosti so v C posodah variirale od 3 do 7 ppb, v NTC posodah od 3 do 8 ppb in v TM posodah od 4 do 5 ppb. Koncentracija Cu v posodah s ploščami, obdelanimi s Silvanolinom UC3, je po preteku 2 dni dosegla 156 ppb, 10. dan se je zvišala do najvišje vrednosti 203 ppb, nato pa se je postopno znižala na 129 ppb po 27 dneh.

Iz teh podatkov se ugotavlja postopno sproščanje CU s plošč, obdelanih z raztopino UC3; baker se je tako postopno nabiral v vodi vsaj do desetega dne, nato so vrednosti začele upadati. Obseg sproščanja v posodah s ploščami, obdelanimi UC3, je povzročil popolno izumrtje polžev in je privedel do pojava raznih znakov stresa pri školjkah.

Preglednica 6 - Vsebnost kovin (ppb) v vzorcih vode, redno odvzete iz posod z različnimi testnimi pogoji: C kontrolni (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), Cul (lesene plošče, zaščitene z 0,003 % Cu raztopino) in Cull (lesene plošče, zaščitene z 1 % Cu raztopino).

Vzorci	Dan	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.	78	37	< d.l.	1	3	6	0	< d.l.	3	8
	10	< d.l.	28	41	< d.l.	1	7	< d.l.	1	< d.l.	4	7
	17	< d.l.	30	43	< d.l.	1	6	< d.l.	1	< d.l.	2	8
	27	< d.l.	135	47	< d.l.	1	6	17	1	< d.l.	4	15
NTC	2	< d.l.	17	26	< d.l.	1	3	< d.l.	2	< d.l.	3	6
	10	< d.l.	23	38	< d.l.	1	8	< d.l.	1	< d.l.	4	6
	17	< d.l.	23	39	< d.l.	1	7	< d.l.	1	< d.l.	2	7
	27	< d.l.	32	47	< d.l.	1	4	4	2	1	3	12
TT	2	< d.l.	30	34	< d.l.	1	5	< d.l.	2	< d.l.	4	5
	10	< d.l.	27	33	< d.l.	1	4	1	2	< d.l.	4	6
	17	< d.l.	28	41	< d.l.	1	5	2	1	< d.l.	3	14
	27	< d.l.	34	44	< d.l.	1	5	2	1	< d.l.	2	8
Culll	2	< d.l.	24	36	< d.l.	1	156	< d.l.	12	< d.l.	3	8
	10	< d.l.	45	44	< d.l.	1	203	5	9	1	4	15
	17	< d.l.	37	43	< d.l.	1	173	1	7	< d.l.	3	14
	27	< d.l.	33	44	< d.l.	2	129	3	4	< d.l.	3	10

d.l.= meja zaznavnosti

4 ZAKLJUČKI

V sklopu opravljenih preizkušanj za preverjanje prisotnosti morebitnega strupenega učinka termične obdelave in zaščite s Silvanolinom s 0,25 % Cu koncentracijo plošč *Picea abies*, ki so bile nameščene v kontrolirano sladkovodno okolje, so meritve z biomarkerji na dveh bioindikatorskih vrstah školjk (*D. polymorpha* in *T. fluviatilis*) pokazale, da je na ploščah, obdelanih s Silvanolinom s 0,25 % Cu koncentracijo, prišlo do izpiranja bakra (do 203 ppb), kar je posledično povzročilo 100 % smrtnost polžev in pojav znakov fiziološkega stresa na antioksidativnem sistemu školjk. Pri školjkah je bila ugotovljena tudi izrazita indukcija metalotioneinov; to so beljakovine, ki sodelujejo pri odstranjevanju kovin. Termično obdelane plošče (TM) in neobdelane plošče (NTC) niso imele ekotoksikoloških učinkov na školjke, pri polžih pa je bilo ugotovljenih nekaj znakov oksidativnega in nevrotoksičnega stresa ter indukcija metalotioneina v organizmih, izpostavljenih ploščam TM. Ker kemijske analize vodnih vzorcev v glavnem niso pokazale prisotnosti kovin v posodah s ploščami NTC in TM, bi znake stresa pri polžih lahko pripisali prisotnosti drugih naravnih komponent iz lesa, ki so se za to izredno občutljivo vrsto izkazale za strupene.

NAVEDENI VIRI

Bighiu, M.A., Gorokhova, E., Almroth, B.C., Wiklund, A.K.E. (2017): Metal contamination in harbours impacts life-history traits and metallothionein levels in snails. PLoS ONE 12(7): e0180157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180157>.

Binelli, A, Ricciardi F, Riva, C, Provini, An (2005). Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. Chemosphere, 61, 1074-1082.

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.

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.

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.

Faria M., Carrasco L., Diez S., Riva M.C., Bayona J.M., Barata C., (2009): Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149 281-288.

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

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds) (1983): *Methods of Seawater Analysis*. Second, Revised and Extended Edition. Wiley-VCH Verlag, pp. 419.

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.

Wojtal-Frankiewicz, A, Bernasińska, J, Frankiewicz, P, Gwoździński, K, Jurczak, T (2014): Response of *Daphnia*'s antioxidant system to spatial heterogeneity in cyanobacteria concentrations in a lowland reservoir. *PLOSOne*, 9(11): e112597. doi:10.1371/journal.pone.0112597.

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.