

Valutazione della compatibilità ambientale dei trattamenti del legno basata sull'integrazione di risposte ecotossicologiche a diversi livelli di complessità

Versione: N. 1

WP di riferimento: 3.3

Partner Responsabile: UNIVE

Autori: Nesto Nicoletta, Marčeta Tihana, Moschino Vanessa, Cibic Tamara, Picone Marco, Volpi Ghirardini Annamaria

Data: 31/07/2022

INDICE

ACRONIMI.....	1
SOMMARIO.....	2
1 INQUADRAMENTO DELLA PROBLEMATICHE ED OBIETTIVI.....	3
2 INQUADRAMENTO NORMATIVO.....	4
3 VALUTAZIONI ECOTOSSICOLOGICHE EFFETTUATE SU PANNELLI DI LEGNO SOTTOPOSTI A TRATTAMENTI TERMICI O IMPREGNANTI CHIMICI.....	17
3.1 Attività svolte dal partner UNIVE	17
3.2 Attività svolte dal partner CNR-ISMAR	19
3.3 Attività svolte dal partner OGS.....	21
4 DISCUSSIONE.....	22
5 CONCLUSIONI / SUGGERIMENTI.....	24
BIBLIOGRAFIA CITATA.....	25

ACRONIMI

C: condizione sperimentale di controllo senza campioni di legno
NTC: condizione sperimentale di controllo con campioni in legno non trattato
S-Low: condizione sperimentale con campioni in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0,033% di Cu
S-MAR: condizione sperimentale con campioni in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0.25% di Cu
S-UC3: condizione sperimentale con campioni in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente lo 0.25% di Cu
S-UC5: condizione sperimentale con campioni in legno trattati con soluzione di Silvanolin contenente l'1% di Cu
TM: condizione sperimentale con campioni in legno modificati termicamente

SOMMARIO

La strategia sperimentale adottata in questo studio si basa su diversi livelli di complessità biologica ed è finalizzata a guidare il processo di valutazione del grado di accettabilità degli effetti dei trattamenti (sia di tipo fisico che chimico) del legno quando i materiali trattati vengono posti in ambiente acquatico (sia di tipo marino che dulciacquicolo). In particolare, sono stati misurati gli effetti che questi trattamenti possono avere su organismi animali e vegetali legati al rilascio di sostanze potenzialmente tossiche presenti sia negli impregnanti chimici proposti (e.g, rame, ammine) sia naturalmente presenti nel legno di conifera (e.g. terpeni, polifenoli, lignina). Con questo scopo sono state messe a sistema le esperienze maturate nell'ecotossicologia acquatica dai partner italiani, già proficuamente adottate nella valutazione dei legni protetti in laguna di Venezia nell'ottica di una armonizzazione transfrontaliera. Il Partner UNIVE ha svolto test di ecotossicità acuti, subcronici e cronici in laboratorio su organismi appartenenti a diversi phylum e diversa strategia trofica usando una batteria di saggi già ampiamente testati in laguna di Venezia con l'aggiunta di una nuova batteria per le acque dolci. Il Partner CNR-ISMAR ha allestito esperimenti di esposizione in laboratorio e valutato le alterazioni metaboliche, cellulari e fisiologiche su invertebrati marini e di acqua dolce quali molluschi bivalvi e gasteropodi seguendo l'approccio dei biomarker. Infine il partner OGS ha valutato in microcosmo le modificazioni indotte sulla struttura delle comunità planctoniche naturalmente presenti nell'acqua ed i possibili effetti inibitori prodotti dai materiali di legno trattati o modificati sulla formazione del biofilm microbico.

Le indagini ecotossicologiche condotte utilizzando diversi organismi modello che sono stati esposti ai campioni di legno trattati con varie formulazioni dell'impregnante Silvanolin e/o sottoposte a modificazioni termiche hanno evidenziato che il trattamento termico TM e quello con la formulazione S-Low non causano effetti tossici né se i materiali vengono esposti in acqua di mare né se vengono esposti in acqua dolce. Il trattamento chimico sia nella formulazione S-UC5 che S-MAR non risulta compatibile con l'ambiente marino in quanto determina effetti tossici quando i campioni vengono esposti in acqua salata. Anche il trattamento chimico nella sua formulazione S-UC3 non risulta compatibile con l'ambiente dulciacquicolo in quanto determina effetti tossici quando i campioni vengono esposti in acqua dolce. In entrambi i casi risultano pertanto essere necessarie ulteriori modifiche nei protocolli di impregnazione per rimuovere la porzione di impregnante chimico che facilmente viene rilasciata prima del posizionamento dei materiali trattati in ambiente acquatico.

Sulla base dei dati ottenuti dalle analisi chimiche che hanno evidenziato un rilascio di Cu nelle vasche sperimentali solamente nella prima parte degli esperimenti di esposizione, si suggerisce di migliorare la fase di risciacquo/maturazione in acqua dei materiali trattati prima della loro posa in opera per minimizzare gli effetti negativi. Dai test condotti dal Partner UNIVE una maturazione in acqua sia salata che dolce di 30 giorni produce gli esiti migliori in tutte le fasi di valutazione.

In questo studio il principale aspetto innovativo è stato l'impiego di un approccio alla sostenibilità e compatibilità ambientale dei legni trattati valutando il possibile impatto sulla componente biologica degli ecosistemi acquatici tramite un approccio ecotossicologico integrato. Questo tipo di valutazione ha certamente rappresentato un aspetto innovativo e non ancora sufficientemente applicato e normato a livello europeo in relazione alla prevenzione degli impatti sull'ambiente e, di riflesso, sulla qualità della vita di chi lo popola. Il presente studio può pertanto costituire un esempio procedurale nella valutazione delle performances ambientali dei materiali.

1 INQUADRAMENTO DELLA PROBLEMATICAZIONE ED OBIETTIVI

In ecotossicologia è ormai accettato il principio che la potenziale tossicità di una sostanza e / o materiale (naturale e/o sintetico) possa essere accertata solo utilizzando una batteria di saggi ecotossicologici, poiché nessun singolo modello sperimentale è in grado di garantire in assoluto, da solo, la rappresentatività dei risultati per tutte le possibili tipologie di matrici e/o sostanze. L'ecotossicologia, infatti, studia gli effetti di elementi e/o sostanze chimiche su individui, popolazioni, comunità ed ecosistemi, proponendosi anche lo sviluppo di metodi e la loro applicazione per risolvere problemi specifici. Nonostante nel corso degli ultimi decenni siano stati apportati alcuni cambiamenti all'impostazione generale, i due approcci che hanno universalmente continuato a costituire la base di riferimento per la valutazione della potenziale tossicità in ambiente di un composto o sostanza sono la chimica e l'ecotossicologia, attraverso l'applicazione dei suoi due pilastri, saggi (o test) di tossicità e i biomarker. A queste valutazioni si aggiungono quelle ottenute attraverso lo studio dei mesocosmi, utilizzati principalmente come strumenti di ricerca per la valutazione del destino e degli effetti delle sostanze chimiche xenobiotiche a livello di popolazione e comunità. Le informazioni ottenute attraverso queste valutazioni possono essere integrate tra di loro, come linee di evidenza dell'effetto della contaminazione sugli organismi.

Nei saggi di tossicità, organismi appartenenti a specie ben caratterizzate e definite (specie test) sono esposti a diverse concentrazioni di sostanze chimiche potenzialmente tossiche o a matrici ambientali abiotiche (quali acqua, sedimenti e/o elutriati) per periodi definiti di tempo (ore o giorni), al termine dei quali si misurano vari end-point quali ad esempio la mortalità, la crescita, la fertilità dei gameti, alterazioni nelle fasi di sviluppo embrionale (Regoli, 2001). La conduzione simultanea di più saggi di tossicità che comprendono test condotti su organismi appartenenti a differenti livelli trofici è considerato il metodo più efficace per definire la tossicità di una sostanza o matrice ambientale (Blaise e Gagné, 2009). I saggi di tossicità rappresentano un metodo essenziale per la misura del danno biologico; attualmente molti saggi sono altamente standardizzati e varie normative prevedono che la valutazione della qualità ambientale si basi non solo sulle analisi chimiche e fisiche delle acque, ma anche sulla risposta di prove mirate a valutare la potenziale tossicità degli inquinanti pericolosi.

I biomarker sono definiti quale un'alterazione di tipo biochimico, cellulare, fisiologico o comportamentale che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o effetto ad uno

o più composti inquinanti. L'utilizzo di biomarker permette di diagnosticare, attraverso lo studio di risposte immediate, il tipo e/o i tipi di contaminanti ai quali l'organismo bioindicatore è esposto ed i livelli di esposizione; successivamente, in funzione degli effetti misurati ai vari livelli di complessità strutturale, consente di pronosticare il verificarsi di effetti negativi a lungo termine anche su scala ecologica. L'utilizzo di una batteria di biomarker, che prevede l'impiego di più biomarker misurati simultaneamente a diversi livelli di organizzazione biologica, permette di aumentare la capacità interpretativa di studi condotti in laboratorio o in campo, e capire meglio le relazioni fisiologiche e molecolari che possono esistere tra le differenti risposte biologiche (Blaise e Gagné, 2009).

In ecotossicologia, i mesocosmi sono definiti come ecosistemi esterni semi-controllati (per esempio stagni e corsi d'acqua sperimentali) le cui caratteristiche chimico-fisiche sono note e controllate (Boyle and Fairchild, 1997). I mesocosmi sono sistemi sperimentali che permettono di svolgere studi in situ sull'ecosistema acquatico, a scala intermedia tra i microcosmi realizzati in laboratorio e la complessità del mondo reale, e che combinano il realismo ecologico con un facile accesso a numerosi endpoint di tipo chimico -fisico, biologico ed ecotossicologico. I mesocosmi acquatici fanno parte di un continuum di approcci e strumenti sperimentali, che va dai test di tossicità in laboratorio su singole specie alla determinazione di biomarker su specie bioindicatrici, e sono attualmente utilizzati in ecologia ed ecotossicologia nel processo di valutazione del rischio ecologico (Caquet, 2013).

Nell'ambito del Progetto Durasoft è stato applicato un approccio ecotossicologico gerarchico ed integrato per valutare gli effetti biologici di diversi trattamenti applicati a campioni (provini e pannelli) di legno quando questi vengono posti in ambiente acquatico (marino e dulciacquicolo). In particolare, una batteria di saggi di tossicità (acuti, subcronici e cronici) è stata usata come metodo di screening per valutare la tossicità dei trattamenti del legno e le concentrazioni di effetto (UNIVE) rispettivamente per l'ambiente marino e d'acqua dolce. Sulla base di questi risultati, sono stati selezionati i trattamenti e il rapporto superficie pannello/volume d'acqua finale da utilizzare negli esperimenti di esposizione volti a valutarne gli effetti attraverso l'applicazione di una batteria di biomarker su organismi bioindicatori di acqua dolce e salata (ISMAR-CNR). Le valutazioni a livello di mesocosmo, infine, hanno avuto lo scopo di analizzare gli effetti a livello di popolazione e comunità planctoniche in situ (OGS).

2 INQUADRAMENTO NORMATIVO

La protezione di strutture lignee permanenti, soprattutto in acqua marina, è stata da sempre oggetto di particolare attenzione al fine di prevenire l'attacco da parte di organismi xilofagi. Le tecniche di trattamento che si sono succedute nel corso del tempo hanno riguardato l'impiego di preservanti particolarmente efficaci, ma anche tossici e dannosi per l'ambiente, come ad esempio il creosoto, ora riconosciuto anche come cancerogeno. In conformità a quanto stabilito dalla classificazione sul pericolo biologico dello *European Committee for Standardisation* (CEN 2013), i principali utilizzi del legno trattato (*i.e.* termine utilizzato per indicare qualunque tipologia di trattamento fisico o chimico) sono identificabili e categorizzabili nelle cosiddette **classi di pericolo**.

In tale sistema per pericolo biologico si intende però non il pericolo derivante dal rilascio di sostanze chimiche da parte del materiale con conseguenti possibili effetti avversi nei confronti del biota e dell’ecosistema più in generale, ma come **possibile degradazione biologica** del materiale oggetto di indagine indotto da una popolazione di organismi o da consorzi di organismi specifici. Di conseguenza, il pericolo a cui si fa riferimento in questo sistema non è quello ambientale ma quello associato all’attacco di xilofagi in grado di alterare le caratteristiche delle strutture realizzate in legno.

A questo riguardo, da un punto di vista pratico il termine “classe di pericolo” è più efficacemente e adeguatamente sostituibile con quello di “classe d’uso“ (OECD, 1999) (Tabella 1). L’identificazione del pericolo (“uso”) rappresenta pertanto il principale criterio che si dovrebbe adottare per la scelta delle migliori specie per la fornitura della materia prima legno, per l’utilizzo di eventuali trattamenti che ne prolunghino la durata nelle condizioni di utilizzo e delle migliori metodologie per operare i trattamenti medesimi al fine di ottenere il miglior livello possibile di protezione della struttura individuata contestualizzata alla sua collocazione e uso finale.

Tabella 1 - Classi d’uso con alcuni scenari rappresentativi (OECD, 1999).

Class	Description	Scenarios proposed	Primary receiving environmental compartment
1	Situation in which wood or wood-based product is under cover, fully protected from the weather and not exposed to wetting	<i>no scenario</i>	Indoor/outdoor air <i>(emissions to outdoor air are considered negligible)</i>
2	Situation in which wood or wood-based product is under cover, fully protected from the weather but where high environmental humidity can lead to occasional but not persistent wetting	<i>no scenario</i>	
3	Situation in which wood or wood-based product is not covered and not in contact with the ground. It is either continually exposed to the weather or is protected from the weather but subject to frequent wetting	a. fence b. noise barrier c. house d. bridge	soil
4	Situation in which wood or wood-based product is in permanent contact with the ground or fresh water and thus is permanently exposed to wetting, divided into:		
4a	Wood in contact with the ground	a. transmission pole b. fence post	soil
4b	Wood in contact with fresh water	a. jetty in lake [#] b. sheet piling in waterway	freshwater
5	Situation in which wood or wood-based product is permanently exposed to salt water	harbour wharf	seawater

**It has to be noted that the above water part of jetties and wharf can be made of Use Class 3 wood, whereas the submerged part belongs to Use Class 4 and 5 respectively. For reasons of simplicity, the jetty and wharf scenarios are described under Use Class 4b and 5 respectively.*

In questo contesto le principali norme emesse a livello europeo e recepite in Italia come norme UNI EN che regolamentano l’impiego di materiali legnosi in ambiente sono riportate di seguito (in ordine temporale di emissione).

UNI EN 212: 2004: “Preservanti del legno - Guida generale per il campionamento e la preparazione dei preservanti e del legno trattato per analisi”. La norma costituisce una

guida relativa ai procedimenti generali da seguire per il campionamento e la preparazione dei preservanti del legno per la loro analisi.

UNI EN 351-1: 2008: *“Durabilità del legno e dei prodotti a base di legno - Legno massiccio trattato con i preservanti - Parte 1: Classificazione di penetrazione e ritenzione del preservante”*. La norma stabilisce una classificazione del legno trattato con preservanti in termini di penetrazione del preservante e fornisce una guida alla classificazione in funzione della ritenzione.

UNI EN 335: 2013 - *“Durabilità del legno e dei prodotti a base di legno - Classi di utilizzo: definizioni, applicazione al legno massiccio e prodotti a base di legno”* Questa norma definisce cinque classi di utilizzo che rappresentano diverse situazioni a cui può essere esposto il legno. Questo standard indica anche quali agenti biologici sono rilevanti per ogni situazione. Queste classi non danno informazioni sulle prestazioni del prodotto e non forniscono indicazioni sulla durabilità del legno. In particolare: la Classe di rischio 4 (situazione in cui il legno o il prodotto di legno si trova a contatto con il terreno o con acqua dolce ed è, pertanto, permanentemente esposto all’umidificazione) e la Classe di rischio 5 (situazione in cui il legno o il prodotto di legno risulta permanentemente esposto all’acqua salata). Il principio guida è il seguente: “Tanto più il rischio è alto, tanto maggiore è la necessità di aumentare la naturale resistenza del legno con dei trattamenti di impregnazione.”

UNI EN 599-1: 2014 - *“Durabilità del legno e dei prodotti a base di legno - Efficacia dei preservanti del legno, utilizzati a scopo preventivo, determinata mediante prove biologiche - Parte 1: Specifiche secondo le classi di utilizzo”* recepisce la EN 599-1:2009+A1:2013. La norma specifica, per ognuna delle 5 classi di utilizzo definite nella UNI EN 335-1, quali sono le prove biologiche richieste per valutare l’efficacia dei preservanti del legno applicati al trattamento preventivo per il legno massiccio unitamente alle prove di invecchiamento minimo richieste per la rispettiva classe di utilizzo.

UNI EN 73:2020: *“Durabilità del legno e dei prodotti a base di legno - Invecchiamento accelerato del legno trattato prima della prova biologica - Procedura di invecchiamento per evaporazione”*. Questa norma serve a valutare l’efficacia dei preservanti del legno nel tempo, dato che esso può essere sottoposto a condizioni che possono causare la volatilizzazione e la rimozione del preservante del legno, riducendone così l’efficacia. Questo documento fornisce un metodo di laboratorio per l’invecchiamento dei campioni da sottoporre a test biologici. La procedura di invecchiamento prevista è per evaporazione, applicabile a provini di legno e prodotti a base di legno che verranno successivamente sottoposti a test biologici. Il metodo può essere utilizzato anche per il pre-condizionamento di legno grezzo, legno modificato e pannelli a base di legno, indipendentemente dal fatto che abbiano ricevuto o meno un trattamento con preservanti.

UNI EN 84:2020: *“Durabilità del legno e dei prodotti a base di legno - Invecchiamento accelerato del legno trattato prima delle prove biologiche - Procedimento di dilavamento”*. In questo documento è specificato qual è il metodo di lisciviazione applicabile a provini di legno che successivamente verranno sottoposti a prove biologiche. Potrebbe essere applicato a) al pre-condizionamento dei provini prima che siano sottoposti a prova biologica e b) alla valutazione di perdita di efficacia quando si confrontano le prestazioni di un test biologico su provini sottoposti a lisciviazione con altri che non hanno subito lo stesso processo. Il metodo descritto in questa norma può essere utilizzato per il pre-condizionamento di legno non trattato, legno modificato e pannelli di legno, indipendentemente dal fatto che abbiano ricevuto un trattamento conservante. Il principio alla base di questa norma è che i provini di legno sono “impregnati con acqua sotto vuoto”, e in seguito sono immersi in acqua per un determinato periodo prima di essere sottoposti a prove biologiche contro funghi e insetti.

UNI EN 113-1:2021: *“Durabilità del legno e dei prodotti a base di legno - Metodo di prova contro i funghi basidiomiceti che distruggono il legno - Parte 1: Valutazione dell'efficacia biocida dei preservanti del legno”*. Questo documento specifica un metodo per determinare l'efficacia dei preservanti, applicati al legno tramite trattamento di penetrazione, contro l'attacco di basidiomiceti. Il metodo è applicabile ai prodotti formulati o ai loro principi attivi. I campioni di prova di una specie legnosa sensibile ai basidiomiceti vengono impregnati con concentrazioni crescenti di soluzioni di preservante del legno e i campioni di prova del legno di riferimento sono esposti all'attacco di colture pure di basidiomiceti. Dopo un periodo di incubazione prescritto in condizioni definite, la perdita percentuale in massa secca dei provini viene utilizzata per stabilire l'efficacia biocida del prodotto in esame.

Nessuna di queste norme fa esplicito riferimento alla **pericolosità ambientale di eventuali preservanti** impiegati nei trattamenti fatto salvo la seguente EN ISO 15181-1: 2007 focalizzata sul rilascio di biocidi

EN ISO 15181-1: 2007: *“Paints and varnishes - Determination of release rate of biocides from antifouling paints - Part 1: General method for extraction of biocides”* è una norma in cui sono specificate quali sono le condizioni di laboratorio standard per estrarre i biocidi da vernici antivegetative tramite acqua di mare costruita artificialmente. Viene utilizzata insieme alle altre parti della norma ISO 15181 per determinare le quantità di biocidi specifici nell'estratto, ad esempio rame e/o alcuni biocidi organici, e per calcolarne il **tasso di rilascio** dalla vernice.

Riguardo la regolamentazione specifica per i materiali legnosi in relazione al pericolo e al rischio per l'ambiente (soprattutto acquatico) associato all'uso di trattamenti del legno emerge di fatto esserci un vuoto legislativo sia a livello europeo sia a livello nazionale (Italia).

Per contestualizzare la valutazione del **pericolo ambientale**, in assenza di normative specifiche è necessario dunque riferirsi a quelle che sono le normative e i regolamenti a

livello europeo che definiscono i **test ecotossicologici** obbligatori richiesti e ai quali i produttori dovrebbero sottoporsi per ottenere l'autorizzazione all'uso di un prodotto che possa dichiararsi rispettoso dell'ambiente.

Si sintetizzano pertanto di seguito le **principali normative ambientali e i regolamenti europei** riguardanti la valutazione della qualità delle acque e la compatibilità ambientale di prodotti/materiali che con le acque entrano in contatto, al fine di evidenziare come emerga oggi chiaramente il **ruolo centrale svolto dall'Ecotossicologia** nella valutazione del pericolo e del rischio di sostanze chimiche e prodotti.

2.1 Direttiva 2000/60/CE

La Direttiva Quadro sulle acque è la più importante legge in materia ambientale dell'Unione Europea. In sintesi gli scopi fondamentali della Direttiva, proposti all'art. 1, sono:

1. Proteggere e migliorare la qualità degli ecosistemi acquatici;
2. Promuovere un uso sostenibile dell'acqua basato su una gestione dell'acqua a lungo termine;
3. Garantire la disponibilità di una giusta quantità di acqua quando e dove essa è necessaria.

Si può notare come gli obiettivi principali della Direttiva si inseriscano nel quadro più ampio della politica ambientale della Comunità, che deve contribuire a perseguire salvaguardia, tutela e miglioramento della qualità ambientale.

In relazione a ciò l'utilizzazione accorta e razionale delle risorse naturali deve essere fondata sui principi della precauzione e dell'azione preventiva, sul principio della riduzione, soprattutto alla fonte, dei danni causati all'ambiente, e sul principio del "chi inquina paga".

La strategia per combattere l'inquinamento idrico, descritta all'art. 16, prevede la graduale riduzione delle emissioni di sostanze pericolose nelle acque per raggiungere l'obiettivo finale di eliminare le sostanze pericolose prioritarie (elencate nell'Allegato X) e avvicinare progressivamente ai valori del fondo naturale le concentrazioni di sostanze presenti in natura in ambiente marino.

Secondo tale Direttiva, i **saggi di tossicità** sono strumenti utili per definire l'elenco delle sostanze chimiche e la relativa valutazione del rischio per i principali inquinanti dell'ambiente acquatico.

Tra gli allegati è rilevante prendere visione dell'Allegato V che chiarisce che agli Stati membri è suggerita una procedura per la definizione degli standard di qualità chimica, che dovrebbero essere identificati per l'acqua, i sedimenti o il biota. I **saggi di tossicità dovrebbero essere utilizzati per definire gli standard per la protezione degli organismi acquatici di una vasta gamma di inquinanti** (elencati nei punti da 1 a 9 dell'Allegato VIII della Direttiva).

In particolare al punto 1.2.6, sono chiarite le procedure per la fissazione degli standard di qualità ambientale per l'acqua, i sedimenti e per il biota. Per ciascun inquinante *“ove possibile, dovrebbero essere ottenuti dati relativi agli effetti acuti e cronici per i taxa indicati che sono importanti per il tipo tipologia del corpo idrico in questione, nonché per gli altri taxa acquatici per i quali sono disponibili dei dati”*.

E' evidente che i dati relativi agli effetti acuti e cronici di cui sopra fanno riferimento, sebbene non sia esplicitato, alle **prove di tossicità**. Infatti, continua il testo, devono essere valutati i dati relativi all'“*insieme di base*” di taxa seguente:

- *Alghe e/o macrofite;*
- *Dafnia od organismi rappresentativi delle acque saline;*
- *Pesci.*

Per fissare la concentrazione massima media annuale di tali elementi in un corpo idrico, gli Stati membri determinano dei fattori di sicurezza appropriati per ciascun caso, secondo la natura e la qualità dei dati disponibili, come indicato nella tabella che è riportata di seguito (2).

Tabella 2 - Direttiva 2000/60/CE, Allegato V. Descrizione dei fattori di sicurezza utili per la fissazione degli standard di qualità ambientale.

Descrizione	Fattore di sicurezza
Almeno una L(E)C50 acuta per ognuno dei tre livelli trofici dell'insieme di base	1000
Una NOEC cronica (per pesci o dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline)	100
Due NOEC croniche per specie appartenenti a due livelli trofici (pesci e/o dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline e/o alghe)	50
NOEC croniche per almeno tre specie (di norma pesci, dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline e alghe) appartenenti a tre livelli trofici	10
Altri casi, compresi dati sul campo o ecosistemi modello, che permettono di calcolare e applicare fattori di sicurezza più precisi	Valutazione caso per caso

2.2 - Regolamento (CE) n.1907/2006 e Regolamento (CE) n. 440/2008

Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 Dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (Gazzetta ufficiale Europea L. 396 del 30/12/2006) completato dal Regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione del 30 maggio 2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 (Gazzetta ufficiale Europea L. 142 del 31/05/2008)

Il Regolamento CE n. 1907/2006 concernente la registrazione, la valutazione e l'autorizzazione delle sostanze chimiche, noto con l'acronimo **REACH** (Registration, Evaluation, Authorization of CHemicals) è entrato in vigore in data 01 Giugno 2007, modificando profondamente le regole preesistenti in materia.

REACH è un sistema teso a raccogliere tutte le informazioni sulle proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche delle sostanze chimiche nonché sui diversi utilizzi tali da comportare l'esposizione alle stesse dei lavoratori, dei consumatori e dell'ambiente.

Il testo sostituisce e sintetizza oltre 40 regolamenti e direttive che disciplinano a vari livelli le sostanze chimiche, e mira ad assicurare un maggiore livello di protezione della salute umana e dell'ambiente. Per raggiungere questi obiettivi è stato capovolto il principio della prova: prima le sostanze potevano essere utilizzate fino a quando non ne era dimostrata la nocività dalle autorità pubbliche, mentre ora spetta all'industria l'onere di provare che una sostanza chimica è innocua nell'ambito di determinati intervalli di concentrazione (principio di precauzione).

Il Regolamento REACH riguarda, a vario titolo, tutti i settori che utilizzano dei "chemicals": Produttori, Importatori, Formulatori e Utilizzatori a valle di sostanze e preparati chimici indipendentemente dal fatto che siano pericolosi o meno.

In relazione ai biocidi, il REACH si applica pienamente alle quantità di sostanze attive per gli usi "non-biocidi" e a tutti gli altri componenti non attivi presenti nel prodotto biocida. In particolare le sostanze attive impiegate esclusivamente in prodotti biocidi si considerano già registrate (art. 15.2) a condizione che siano inserite negli allegati I, IA o IB della Direttiva 98/08/CE o rientrino nel programma di revisione previsto per le sostanze attive già sul mercato al 14/05/2000 (Regolamento (CE) 1451/2007).

Tramite il Regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione, del 30 maggio 2008, sono istituiti i **metodi di prova da utilizzare per la determinazione delle proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche, che dovranno essere eseguiti in conformità con i principi della Buona pratica di laboratorio definita nella Direttiva 2004/10/CE (art.13- comma 4).**

Nell'Allegato II del Regolamento REACH, relativo alla guida per la compilazione della scheda di sicurezza, al punto 12.1 si specifica di "*Fornire i dati pertinenti disponibili sulla **tossicità acquatica acuta e cronica per i pesci, i crostacei, le alghe e altre piante acquatiche. Indicare anche, se disponibili, dati sulla tossicità per i microrganismi ed i macrorganismi del suolo e altri organismi di rilevanza ambientale, quali gli uccelli, le api e la flora. Se la sostanza o il preparato hanno effetti inibitori sull'attività dei microrganismi, menzionare l'eventuale impatto sugli impianti di trattamento delle acque reflue***". Negli Allegati VII, VIII, IX e X, riguardanti le prescrizioni in materia di informazioni standard per le sostanze fabbricate o importate in quantitativi pari o superiori a 1 tonnellata (Allegato VII), 10 tonnellate (Allegato VIII), 100 tonnellate (Allegato IX), 1000 (Allegato X) al punto 9 si trova una tabella che riporta i **saggi di tossicità richiesti per**

ciascuna categoria. Nella Tabella 3 sono stati riassunti in un unico quadro i saggi richiesti, diversi a seconda del quantitativo di materiale commercializzato.

E' possibile notare che con l'aumento del quantitativo della sostanza, parallelamente cresce il numero di prove da effettuare. Allo stesso modo **ai saggi di tossicità a breve termine si sostituiscono gradatamente saggi di tossicità a lungo termine** effettuati non solo su organismi acquatici, ma anche terrestri.

Tabella 3 - Quadro riassuntivo delle informazioni ecotossicologiche richieste in base al quantitativo commercializzato (Regolamento REACH).

INFORMAZIONI ECOTOSSICOLOGICHE	Allegato VII	Allegato VIII	Allegato IX	Allegato X
Test richiesti	Sostanze ≥ 1 t	Sostanze ≥ 10 t	Sostanze ≥ 100 t	Sostanze ≥ 1000 t
Tossicità acquatica	Tossicità a breve termine su invertebrati (<i>Daphnia</i>) Inibizione crescita algale	Tossicità a breve termine su pesci Studio di inibizione respiratoria su fanghi	Tossicità a lungo termine su invertebrati (<i>Daphnia</i>) Tossicità a lungo termine su pesci	-
Degradazione	Biodegradabilità	Degradazione abiotica	Simulazione degradazione nelle acque superficiali, nel suolo, nei sedimenti e identificazione dei prodotti di degradazione	Degradazione biotica
Destino e comportamento nell'ambiente	-	Studio di screening adsorbimento/desorbimento	Informazioni supplementari adsorbimento/desorbimento Bioaccumulo specie acquatiche (pesci)	Informazioni supplementari adsorbimento/desorbimento
Effetti sugli organismi del suolo	-	-	Tossicità a breve termine invertebrati Effetti su microrganismi Tossicità a breve termine piante	Tossicità a lungo termine invertebrati Tossicità a lungo termine sugli organismi che vivono nel sedimento Tossicità a lungo termine piante Tossicità a lungo termine o sulla riproduzione uccelli

Nel Regolamento che istituisce i metodi di prova (n. 440/2008/CE), sono proposte e descritte tutte le metodiche relative alle analisi chimico-fisiche, **tossicologiche ed ecotossicologiche** cui fa riferimento il Regolamento REACH.

Nella parte C dell'Allegato ai metodi, si descrivono 24 metodiche per la determinazione dell'ecotossicità. Ciascuna scheda è compilata riportando le seguenti informazioni sulla prova:

- **METODO:** definizione e unità, sostanze di riferimento, principio del metodo di saggio, criteri di qualità, descrizione del metodo di saggio, procedura;
- **DATI E VALUTAZIONE;**
- **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO** (rapporto di prova);
- **BIBLIOGRAFIA** con i riferimenti delle metodiche standard;
- **APPENDICI** contenenti informazioni aggiuntive come liste di organismi sui quali è possibile effettuare il test, condizioni di allevamento e mantenimento, ricette di soluzioni, esempi e schemi di valutazione.

Tra le metodiche previste vi sono il test di immobilizzazione (acuto) con *D. magna*, il test di riproduzione con *D. magna*, ed il saggio di inibizione della crescita algale, procedure utilizzate anche nell'ambito del progetto.

2.3 Regolamento 1272/2008/UE CLP

Il regolamento 1272/2008/UE CLP (Classification, Labelling and Packaging) è la norma comunitaria che introduce in Europa un sistema di classificazione relativo alla classificazione, etichettatura ed imballaggio delle sostanze chimiche (e delle loro miscele). Gli obiettivi del CLP sono:

- facilitare la libera circolazione, nell'Unione Europea, delle sostanze e delle miscele, garantendo un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente;
- determinare quali proprietà di una sostanza o di una miscela portino a classificarla come pericolosa
- comunicare i pericoli delle sostanze e delle miscele dal produttore al consumatore.

La classificazione del pericolo è un processo che coinvolge l'identificazione del pericolo chimico-fisico (PH), del pericolo per la salute umana (H) e del pericolo per l'ambiente (ENV) provocato da una sostanza o da una miscela, e la suddivisione in categorie che specificano la gravità del pericolo.

Secondo tale regolamento i fabbricanti, gli importatori o gli utilizzatori a valle di una sostanza o di una miscela sono tenuti a raccogliere e valutare tutte le informazioni esistenti disponibili relative alle proprietà pericolose. In altre parole si tratta di un'autoclassificazione del prodotto a carico diretto di produttore o importatore.

Per poter autoclassificare una sostanza o una miscela è necessario:

- raccogliere le informazioni disponibili in merito al potenziale pericolo associato ad una sostanza (o miscela)
- esaminare l'attendibilità delle informazioni e cogliere le più rilevanti; valutare le informazioni rispetto ai criteri di classificazione
- decidere se la sostanza (o miscela) possa essere classificata come pericolosa in relazione alle classi di pericolo descritte nell'allegato I del CLP ed il relativo grado di pericolo.

Il regolamento CLP normalmente non richiede nuove sperimentazioni per quanto riguarda i pericoli per l'ambiente (e per la salute umana) di sostanze o di miscele. Solo in caso non vi fossero dati disponibili, devono essere eseguite delle **prove ecotossicologiche** (e tossicologiche) che soddisfino le prescrizioni previste dal regolamento REACH, i principi OCSE di buona pratica di laboratorio (GLP) e tutti i metodi riconosciuti a livello internazionale, convalidati secondo le procedure internazionali, al fine di garantire che i dati siano attendibili e di qualità elevata.

Quanto ai pericoli per l'ambiente, i dati utilizzati per la classificazione acuta e cronica per l'ambiente acquatico si basano principalmente sull'individuazione di "end points" di pericolo tossici in **tre diversi livelli trofici acquatici** utilizzando protocolli di prova altamente standardizzati. Pesci, crostacei e alghe (o altre piante) vengono utilizzati come indicatori che rappresentano una gamma di specie e taxa all'interno di ciascun livello trofico. Le informazioni concernenti il destino ambientale (degradazione e bioaccumulo) di una sostanza o di una miscela vengono utilizzate in combinazione con i dati di tossicità per determinarne gli effetti a lungo termine.

2.4 REGOLAMENTO (UE) n. 528/2012 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 maggio 2012 relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi

Per quanto riguarda gli impregnanti per la conservazione del legno la normativa di riferimento a livello europeo è la normativa BIOCIDI (reg. UE n. 528/2012) riguardo l'immissione sul mercato e l'uso di biocidi e di materiali o di articoli trattati.

Il Regolamento UE sui biocidi n. 528/2012, che sostituisce la Direttiva Biocidi 98/8/CE (*Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 Febbraio 1998, relativa all'immissione sul mercato dei biocidi - Gazzetta Ufficiale Europea L. 123 del 24/04/1998*), riguarda l'immissione sul mercato e l'uso di biocidi e di materiali o di articoli trattati utilizzati per la tutela dell'uomo e degli animali, per combattere organismi nocivi, quali batteri o insetti, mediante l'azione di principi attivi contenuti nel prodotto biocida.

Il Regolamento disciplina:

- la creazione, a livello di Unione Europea, di un elenco di principi attivi utilizzabili nei biocidi;
- l'autorizzazione all'immissione sul mercato dei prodotti biocidi;
- il riconoscimento reciproco delle autorizzazioni all'interno dell'Unione;
- la messa a disposizione sul mercato e l'uso di biocidi all'interno di uno o più Stati membri o dell'Unione;

- l'immissione sul mercato di articoli trattati.

Tali compiti possono essere svolti dall'autorità competente degli Stati membri o dall'autorità centrale, **ECHA - European Chemicals Agency**.

Le informazioni di carattere ecotossicologico necessarie per sostenere l'approvazione di un principio attivo sono elencate nell'allegato II della Norma. Esse prevedono dei dati di informazione di base (Core Data Set-CDS) basati essenzialmente su **test di tossicità a breve termine** (Tabella 4) e un insieme di **informazioni supplementari** (Additional Data Set - ADS) che sono richieste qualora siano evidenziati dei possibili rischi per l'ecosistema acquatico in relazione all'uso del principio attivo o si preveda un'esposizione a lungo termine (Tabella 5).

I dati appartenenti al CDS sono considerati i dati fondamentali che dovrebbero, in linea di massima, essere forniti per tutti i principi attivi. In alcuni casi, tuttavia, le proprietà fisiche o chimiche della sostanza possono far sì che risulti impossibile o non necessario fornire dati specifici appartenenti al CDS.

Tabella 4 - Informazioni ecotossicologiche di base (core data set-CDS) necessarie per sostenere l'approvazione di un principio attivo ai sensi del REGOLAMENTO (UE) n. 528/2012.

9.	STUDI ECOTOSSICOLOGICI		
9.1.	<p>Sono richieste informazioni sull'ecotossicità del biocida tali da consentire l'assunzione di una decisione in merito alla classificazione del prodotto.</p> <p>— Se sono disponibili dati validi su ciascuno dei componenti della miscela e non si prevedono effetti sinergici tra i componenti, la classificazione della miscela può essere effettuata conformemente alle disposizioni della direttiva 1999/45/CE, del regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP).</p> <p>— Se non sono disponibili dati validi sui componenti o se si possono prevedere effetti sinergici, può essere necessaria la sperimentazione dei componenti e/o del biocida stesso.</p>		
9.2.	<p>Studi ecotossicologici supplementari</p> <p>Studi supplementari scelti tra i risultati di cui all'allegato II, sezione 9 per componenti rilevanti del biocida o per il biocida stesso possono essere richiesti se i dati sul principio attivo non sono in grado di fornire sufficienti informazioni e se vi sono indicazioni di rischio a motivo di specifiche proprietà del biocida.</p>		
9.3.	Effetti su altri organismi specifici non bersaglio (flora e fauna) ritenuti a rischio	ADS	I dati relativi alla valutazione dei rischi per i mammiferi selvatici si ottengono dalle analisi tossicologiche sui mammiferi.
9.4.	Se il biocida si presenta sotto forma di esche o di granuli, possono essere richiesti i seguenti studi:		
9.4.1.	Test eseguiti sotto controllo ufficiale per valutare i rischi per organismi non bersaglio in condizioni d'uso reali		
9.4.2.	Studi sulla tollerabilità per ingestione del biocida da parte di organismi non bersaglio ritenuti a rischio		
9.5.	Effetto ecologico secondario, ad esempio se viene trattata un'ampia percentuale di un tipo specifico di habitat.	ADS	

Tabella 5 - Informazioni ecotossicologiche supplementari (additional data set-ADS) necessarie per sostenere l'approvazione di un principio attivo ai sensi del REGOLAMENTO (UE) n. 528/2012.

Colonna 1 Informazioni richieste	Colonna 2 Tutti i dati sono CDS salvo se indicati come ADS	Colonna 3 Norme specifiche per l'adeguamento delle informazioni standard per quanto riguarda alcuni dei requisiti in materia di informazione che potrebbero richiedere il ricorso a sperimentazioni sui vertebrati
9.1.6. Ulteriori studi di tossicità sugli organismi acquatici Se i risultati degli studi ecotossicologici, degli studi sul destino e comportamento e/o l'uso previsto/gli usi previsti del principio attivo evidenziano un rischio per l'ambiente acquatico, o se è prevista un'esposizione a lungo termine, si effettuano uno o più dei test descritti nella presente sezione	ADS	
9.1.6.1. Test della tossicità a lungo termine sui pesci: a) test di tossicità sui pesci nelle prime fasi di vita (FELS) b) test di tossicità a breve termine sui pesci nelle fasi di embrione e di avannotto c) test di crescita del novellame d) test sull'intero ciclo di vita dei pesci	ADS	
9.1.6.2. Test della tossicità a lungo termine sugli invertebrati: a) studio sulla crescita e la riproduzione della Daphnia b) crescita e riproduzione di altre specie (ad esempio misidacei) c) sviluppo e comparsa di altre specie (ad esempio chironomus)	ADS	
9.1.7. Bioaccumulo in una specie acquatica idonea	ADS	
9.1.8. Effetti su altri organismi specifici non bersaglio (flora e fauna) ritenuti a rischio	ADS	
9.1.9. Studi sugli organismi nei sedimenti	ADS	
9.1.10. Effetti sulle macrofite acquatiche	ADS	

Alla norma fa seguito il documento guida per la sua applicazione prodotto dall'ECHA *Guidance on information requirements* (ECHA, 2013).

Nell'allegato V sono riportati i tipi di biocidi e i preservanti del legno considerati facenti parte del **gruppo 2: preservanti**.

Pertanto, questa norma disciplina la tipologia di biocida utilizzato in questo studio ma non fa riferimento all'applicazione sul legno, al tipo di lisciviazione da usare per i test e ai limiti di tossicità.

3 VALUTAZIONI ECOTOSSICOLOGICHE EFFETTUATE SU PANNELLI DI LEGNO SOTTOPOSTI A TRATTAMENTI TERMICI O IMPREGNANTI CHIMICI

La strategia sperimentale adottata in questo studio si basa su diversi livelli di complessità biologica ed è finalizzata a guidare il processo di valutazione del grado di accettabilità degli effetti dei trattamenti (sia di tipo fisico che chimico) applicati su provini e pannelli di legno quando questi vengono posti in ambiente acquatico (sia di tipo marino che dulciacquicolo). In particolare, sono stati misurati gli effetti che questi trattamenti possono avere su organismi animali e vegetali legati al rilascio di sostanze potenzialmente tossiche presenti negli impregnanti chimici proposti (e.g. rame, ammine) sia naturalmente presenti nel legno di conifera (e.g. terpeni, polifenoli, lignina). Con questo scopo sono state messe a sistema le esperienze maturate nell'ecotossicologia acquatica dai partner italiani, già proficuamente adottate nella valutazione dei legni protetti in laguna di Venezia nell'ottica di una armonizzazione transfrontaliera. Il Partner UNIVE ha svolto test di eco-tossicità acuti, subcronici e cronici in laboratorio su organismi appartenenti a diversi phylum e diversa strategia trofica usando una batteria di saggi già ampiamente testati in laguna di Venezia con l'aggiunta di una nuova batteria per le acque dolci. Il Partner CNR-ISMAR ha allestito esperimenti di esposizione in laboratorio e valutato le alterazioni metaboliche, cellulari e fisiologiche su invertebrati marini e di acqua dolce quali molluschi bivalvi e gasteropodi seguendo l'approccio dei biomarker. Infine il partner OGS ha valutato in microcosmo le modificazioni indotte sulla struttura delle comunità planctoniche naturalmente presenti nell'acqua ed i possibili effetti inibitori prodotti dai materiali di legno trattati o modificati sulla formazione del biofilm microbico.

3.1 Attività svolte dal partner UNIVE

Lo studio condotto dal Team Unive ha previsto, sia per l'ambiente marino sia per quello dulciacquicolo, l'impiego di un approccio sperimentale basato su una batteria di indicatori in grado di fornire valutazioni del pericolo per il biota a diversi livelli trofici e di complessità biologica di alcune tecniche usate per la protezione del legno. La valutazione della tossicità di lisciviati ottenuti a partire da provini di legno (trattato e non trattato) ha previsto l'adozione di una Integrated Testing Strategy (ITS), la cui struttura di tipo gerarchico permette la **valutazione dell'impatto ambientale** dei trattamenti che vengono impiegati per aumentare la durabilità del legno. In particolare, l'ITS si caratterizza per un aumento di sensibilità dei test ecotossicologici utilizzati nei tre livelli valutativi (TIER 1 - Test acuti; Tier 2 - Test sugli stadi più sensibili, Tier 3 - Test cronici) e valuta i possibili effetti e quanto questi siano "accettabili" su flora e fauna acquatica, permettendo così di identificare i trattamenti del legno ecocompatibili. L'indagine è stata condotta con lo scopo di comprendere come i tempi di maturazione

in acqua possano influenzare il processo di rilascio dal legno al fine di predisporre linee guida a supporto delle aziende per definire i **tempi di maturazione** necessari prima di impiegare un materiale in ambiente.

L'applicazione del percorso ITS per l'ambiente marino ha previsto il confronto tra provini di legno trattato con il corrispondente non trattato (NTC) ed ha focalizzato l'indagine su provini di *Picea abies* modificati termicamente (termically modified, TM) e trattati con Silvanolin al fine di un suo impiego in ambito marittimo (S-UC5), utilizzando diverse concentrazioni di Cu: S-UC5_(I), prima formulazione ad alta concentrazione di Cu, s-UC5_(II), seconda formulazione ad alta concentrazione di Cu (con trattamento per limitare il rilascio), S-UC5_(III), formulazione finale con concentrazione di Cu pari all'1%, S-MAR, formulazione ottenuta utilizzando una concentrazione di Cu dello 0.25% e successivamente trattando il legno con acido ossalico, S-Low, formulazione a bassa concentrazione di Cu, pari allo 0.033% nel trattamento. La prima applicazione dei test di TIER I su S-UC5_(I) e S-UC5_(II), ha evidenziato l'altissima tossicità di questi due prodotti e la necessità di rivedere la formulazione dei trattamenti finalizzati all'impiego in categoria UC5 al fine di trovare delle soluzioni meno impattanti sull'ambiente acquatico, in linea con gli obiettivi della strategia ITS. La sperimentazione definitiva sulle nuove formulazioni (S-UC5_(III), S-MAR e S-Low) ha evidenziato che, sulla base dei criteri adottati per la procedura di valutazione ITS predisposta per le acque salate, i trattamenti UC5_(III) e MAR non risultano compatibili per l'ambiente marino-costiero, a causa dell'elevata tossicità acuta generata (TIER 1), anche dopo maturazione in acqua salata di 30 giorni, nei confronti di tutti gli indicatori (S-UC5_(III)) o di almeno due indicatori (S-MAR). I risultati ottenuti al primo livello valutativo con TM e S-Low hanno invece reso questi trattamenti eleggibili per la valutazione di livello II (TIER II), dal momento che gli effetti acuti sono assenti o comunque confrontabili con gli effetti generati dal legno non trattato (NTC). Alla luce dei risultati ottenuti nel secondo step valutativo (TIER II), considerato che il criterio di superamento del TIER II prevedeva che almeno uno dei due test non producesse effetto negativo significativo rispetto a NTC, entrambi i trattamenti TM e S-Low sono risultati eleggibili per il passaggio al terzo step valutativo (TIER III). Considerati i risultati di quest'ultimo livello valutativo, i trattamenti TM e S-Low sono risultati complessivamente equivalenti, in termini di impatti sugli indicatori acquatici, al legno non trattato (NTC). Ai sensi della valutazione ITS proposta in questo progetto, quindi, i trattamenti TM e S-Low sono risultati accettabili per un impiego in ambiente marino/salmastro comportando la possibile insorgenza di effetti a lungo termine solo dopo esposizione a lungo termine in condizioni statiche o di scarso rinnovo. La sperimentazione condotta considerando i tre tempi di maturazione (0, 15 e 30gg) ha fatto emergere tuttavia chiaramente come sia necessario un periodo di maturazione di almeno 30 giorni prima dell'impiego del materiale (trattato e non trattato), per limitare gli impatti sull'ambiente marino-costiero.

L'applicazione del percorso ITS per l'ambiente dulciacquicolo ha previsto il confronto tra provini di legno trattato con il corrispondente non trattato (NTC) ed ha focalizzato l'indagine su provini di *Picea abies* modificati termicamente (TM) e provini trattati con Silvanolin al fine di un suo impiego outdoor senza contatto con il suolo (S-UC3) (concentrazione di Cu nel trattamento pari allo 0.25%).

L'applicazione dei test di TIER I ha evidenziato come sulla base dei criteri adottati per la procedura di valutazione ITS predisposta per le acque dolci solo TM abbia fornito effetti tossici paragonabili, se non addirittura inferiori, al legno non trattato (NTC). S-UC3 al contrario non risulta un trattamento compatibile per l'ambiente acquatico, a causa dell'elevata tossicità acuta generata su batteri, alghe e crostacei indipendentemente dal tempo di maturazione. I risultati ottenuti in questo primo livello di valutazione hanno evidenziato pertanto come solo TM sia risultato eleggibile per il secondo step valutativo. Alla luce dei risultati ottenuti nel TIER II è stato possibile considerare il trattamento TM idoneo anche per la valutazione di livello III. Tuttavia gli effetti generati anche dal lisciviato del provino non trattato (NTC) nel caso dell'endpoint rottura della capsula nel gasteropode *L. auricularia* hanno evidenziato la necessità di un periodo di maturazione superiore a 15 giorni per rimuovere gli effetti tossici del lisciviato sullo sviluppo larvale. Considerati i risultati complessivi dei test cronici su molluschi *L. auricularia* e crostacei *Daphnia magna* del Tier III, il trattamento TM risulta equivalente in termini di impatti su entrambi gli indicatori acquatici impiegati al legno non trattato (NTC). Emerge tuttavia chiaramente, in particolare dai risultati dei test sulla riproduzione in *D. magna*, come sia necessario un periodo di maturazione in acqua dolce di almeno 15 giorni prima dell'impiego del materiale, per limitare gli impatti sull'ambiente dulciacquicolo. Ai sensi della valutazione ITS proposta in questo progetto, quindi, il trattamento TM risulta ecocompatibile non comportando rischi aggiuntivi per l'ambiente, neanche dopo un'esposizione a lungo termine. Maggiori dettagli sul disegno sperimentale e sui risultati ottenuti sono disponibili nei report relativi alle ATT 14 e 15.

3.2 Attività svolte dal partner CNR-ISMAR

Nell'ambito delle attività finalizzate a valutare la compatibilità ambientale, sia in ambiente marino che dulciacquicolo, di trattamenti di tipo chimico o fisico applicati a pannelli di legno di conifera della specie *Picea abies*, il team CNR-ISMAR ha condotto due specifiche sperimentazioni in laboratorio utilizzando organismi bioindicatori che sono stati esposti ai pannelli diversamente trattati e sui quali è stata determinata una batteria di biomarkers. Con questo termine si identificano tutte quelle alterazioni di tipo biochimico, cellulare, fisiologico o comportamentale che possono essere misurate a livello di organismo a seguito della sua esposizione ad uno stress ambientale. Tali risposte biologiche determinate in organismi cosiddetti sentinella, permettono, attraverso la descrizione dello stato di benessere degli individui, di arrivare ad una valutazione integrata della qualità dell'ecosistema di cui gli stessi animali fanno parte. Per l'esperimento in acqua marina sono stati utilizzati come organismi bioindicatori i mitili della specie *Mytilus galloprovincialis* e i gasteropodi della specie *Steromphala albida*, mentre per l'esperimento in acqua dolce sono stati utilizzati i bivalvi della specie *Dreissena polymorpha* ed i gasteropodi della specie *Theodoxus fluviatilis*. In entrambe le sperimentazioni gli organismi bioindicatori sono stati mantenuti per 4 settimane in vasche acquario in regime semistatico alle seguenti condizioni sperimentali:

- Esperimento in acqua marina: 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)

- Esperimento in acqua dolce: 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 contenenti i pannelli in legno il rapporto superficie pannello/volume d'acqua finale è stato di 0,018. Durante l'esperimento sono stati settimanalmente raccolti campioni d'acqua da tutte le vasche al fine di verificare 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 bivalvi *M. galloprovincialis* 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 e l'indice di condizione, mentre nei gasteropodi *S. albida* è invece stato analizzato anche un endpoint comportamentale mediante la determinazione del flipping test.

I risultati ottenuti dall'esperimento di esposizione condotto in acqua di mare hanno evidenziato che i pannelli trattati con S-UC5 hanno mostrato la più alta tossicità 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 ai pannelli non trattati (NTC) o trattati con la formulazione di S-Low: L'effetto tossico osservato nella condizione sperimentale S-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.

I risultati ottenuti dall'esperimento condotto in acqua dolce hanno evidenziato che i pannelli trattati con Silvanolin UC3 hanno 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 TM, 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 hanno suggerito di poter escludere la presenza di particolari effetti tossici imputabili alle condizioni NTC e TM. Le risposte biologiche determinate nei gasteropodi tuttavia hanno evidenziato la presenza di alcuni segnali di stress che però non appaiono legati alla presenza di composti inorganici rilasciati nell'acqua dai pannelli. I pannelli trattati con la formulazione di S-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 metallotioneine. 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. Maggiori dettagli sul disegno sperimentale e sui risultati ottenuti sono disponibili nei report relativi alla ATT 18 e 19.

3.3 Attività svolte dal partner OGS

Il team di OGS ha condotto due sperimentazioni finalizzate a valutare:

- l'effetto tossico di materiali legnosi trattati con: 1. impregnanti di nuova generazione (Silvanolin UC5 e Silvanolin MAR; 2. prodotti già presenti sul mercato (CCB, rame-cromo-boro); 3. il legno termicamente modificato sulle comunità planctoniche naturali
- l'effetto inibitorio sullo sviluppo del biofilm microbico sulla superficie dei materiali legnosi diversamente trattati

Per valutare l'effetto tossico dei trattamenti sulle comunità planctoniche naturali è stata prelevata acqua lagunare a Grado e trasferita in 14 acquari, allestiti in una camera termostata e contenenti i provini di legno (*Abies alba*, abete bianco) diversamente trattati. L'esperimento è durato complessivamente 12 giorni, durante i quali sono stati monitorati diversi parametri (macronutrienti inorganici, carbonio organico disciolto, metalli pesanti, microrganismi fototrofi ed eterotrofi) all'inizio, dopo 3 giorni e alla fine dell'esperimento.

I risultati hanno evidenziato che i microrganismi fototrofi sono stati fortemente influenzati dal rilascio di sostanze dai provini di legno impregnati sia con Silvanolin (sia S-UC5 che S-MAR) che con CCB, le cui abbondanze sono diminuite dal primo tempo sperimentale, in alcuni casi fino alla loro scomparsa totale dopo solo 3 giorni. Al contrario, i microrganismi eterotrofi hanno preso rapidamente il sopravvento, dapprima i batteri eterotrofi e successivamente i nanoflagellati, entrambi maggiormente abbondanti negli acquari contenenti i legni trattati con gli impregnanti Silvanolin e CCB. Entrambi i trattamenti chimici hanno mostrato di indurre un effetto ecologico negativo sulle comunità planctoniche lagunari, più marcato nel Silvanolin rispetto al CCB.

Per valutare l'effetto inibitorio sullo sviluppo del biofilm microbico sulla superficie dei materiali legnosi diversamente trattati, provini di abete bianco e abete rosso opportunamente trattati sono stati immersi in due siti della laguna di Grado soggetti a diverso idrodinamismo e recuperati dopo 6, 20 e 40 giorni per testare gli effetti a breve, medio e lungo periodo sulla densità e composizione della comunità microalgale mediante diverse tecniche microscopiche. Inoltre, laddove presente, sono state stimate anche l'abbondanza e la composizione del primo stadio del macrofouling animale. I risultati hanno evidenziato l'importanza dell'idrodinamismo dell'area: il minor idrodinamismo ha accelerato il processo di colonizzazione sia del biofilm microalgale che del macrofouling animale, a prescindere dalla tipologia di trattamento applicato. In entrambe le aree, in condizioni idrodinamiche differenti, solo i trattamenti con Silvanolin hanno ostacolato l'attecchimento di diversi taxa animali portando ad un'esigua diversità animale; ciononostante, in condizioni di basso idrodinamismo, questo non ha impedito alle poche specie presenti di raggiungere una notevole abbondanza, fino ad un totale ricoprimento

dei provini. Inoltre, gli impregnanti testati hanno indotto una serie di modificazioni alla comunità microalgale; rispetto al controllo sono state osservate diatomee di dimensioni inferiori, con frustuli malformati e strategie di vita che permettono loro di contrastare l'effetto tossico indotto dalle sostanze contenute negli impregnanti.

Maggiori dettagli sul disegno sperimentale e sui risultati ottenuti sono disponibili nei report relativi alla ATT 16 e 17.

4 DISCUSSIONE

L'analisi integrata dei risultati ottenuti dalle sperimentazioni effettuate per valutare l'eventuale tossicità dei trattamenti applicati ai campioni (provini e pannelli) di legno quando questi vengono esposti all'acqua marina sono riassunti in tabella 6.

Tabella 6 - Valutazione ecotossicologica integrata dei trattamenti chimici e fisici applicati su campioni di legno esposti all'acqua marina. Legenda: Rosso=presenza effetti tossici; Verde: Assenza effetti tossici; n.d.=test non effettuati

Partner	Test	C	NTC	TM	S-Low	S-MAR	S-UC5	CCB
UNIVE	Tier1 - Tossicità acuta dei lisciviati al tempo 0 e dopo maturazione (15 e 30 giorni)							n.d.
	Tier2 - Tossicità su stadi larvali dei lisciviati dopo 30 giorni di maturazione					n.d.	n.d.	n.d.
	Tier3 - Tossicità cronica dei lisciviati dopo 30 giorni di maturazione					n.d.	n.d.	n.d.
CNR-ISMAR	Biomarkers determinati nei mitili			n.d.		n.d.		n.d.
	Biomarkers determinati nei gasteropodi			n.d.		n.d.		n.d.
OGS	Tossicità su comunità planctoniche naturali				n.d.			
	Inibizione dello sviluppo del biofilm microbico				n.d.			

Il TM non ha causato effetti tossici in nessuno degli organismi modello utilizzati nei test di tossicità acuta di primo livello e nemmeno in quelli di secondo e terzo livello che sono in grado di rilevare gli effetti dannosi rispettivamente sugli stadi larvali di molluschi e crostacei e sul ciclo vitale del crostaceo *Acartia tonsa*. A livello ecologico nessun segnale di stress è stato individuato all'interno della comunità planctonica esposta a tali campioni e non si sono verificati fenomeni di inibizione del biofilm microbico sulla loro superficie. Le risposte ottenute sono state generalmente confrontabili con quelle ottenute esponendo gli organismi test ai campioni non trattati (NTC), per i quali anche l'analisi dei biomarker su mitili e gasteropodi non avevano evidenziato segnali di disturbo.

Parimenti nessun particolare segnale di danno è stato rilevato dai test di tossicità effettuati sui campioni trattati con la formulazione di S-Low, ossia quella contenente rame alla concentrazione dello 0.033%. Questo risultato è stato confermato anche dall'analisi dei biomarker determinati sia nei mitili che nei gasteropodi che dalle analisi ecologiche effettuate sulla comunità planctonica e microbica.

I trattamenti dei campioni di legno con le formulazioni di S-UC5 e S-MAR, contenenti rame rispettivamente alla concentrazione del 1% e dello 0.25% hanno invece determinato fenomeni di tossicità acuta già nei test di primo livello e pertanto non sono risultati idonei per i test di secondo e terzo livello. Forti segnali di stress sono emersi anche dall'analisi dei biomarker determinati sui molluschi sia mitili che gasteropodi esposti a campioni trattati con S-UC5, mentre la formulazione S-MAR non è stata testata dal punto di vista dei biomarker. Anche le analisi effettuate sulla comunità planctonica e microbica hanno confermato la forte tossicità di entrambe le formulazioni come pure dell'impregnante CCB.

Gli effetti dannosi a carico degli organismi marini sono verosimilmente da imputare al rilascio di Cu contenuto nell'impregnante Silvanolin nell'acqua di mare che è risultato tossico per gli organismi test. In particolare, le analisi chimiche condotte dal team di ISMAR nell'acqua utilizzata per gli esperimenti di esposizione hanno evidenziato come la concentrazione di Cu nell'acqua delle vasche contenenti i campioni trattati con S-UC5 e S-Low erano più elevate rispetto a quelle contenenti i controlli non trattati. Tale concentrazione aumentava inoltre nella prima settimana di esperimento per poi diminuire nel corso delle restanti settimane. Anche le analisi chimiche condotte dal team OGS hanno confermato un rilascio di Cu nell'acqua contenuta nelle vasche sperimentali contenenti i campioni trattati con le formulazioni di S-UC5 e S-MAR.

L'analisi integrata dei risultati ottenuti dalle sperimentazioni effettuate per valutare l'eventuale tossicità dei trattamenti applicati ai campioni di legno quando questi vengono esposti all'acqua dolce sono riassunti in tabella 7.

I campioni TM non hanno determinato effetti dannosi agli organismi dulciacquicoli utilizzati nei test di tossicità di primo, secondo e terzo livello. Anche l'analisi dei biomarker determinati nei mitili hanno confermato l'assenza di effetti tossici per questa specie, mentre le risposte biologiche misurate nei gasteropodi hanno evidenziato la presenza di qualche segnale di stress. Tuttavia dal momento che le analisi chimiche effettuate su campioni di acqua non hanno sostanzialmente evidenziato la presenza di metalli nelle vasche contenenti i campioni NTC e TM, tali segnali di stress sono probabilmente da imputare alla presenza nelle vasche di altri composti naturali provenienti dal legno che sono risultati tossici per la specie di gasteropode utilizzata nell'esperimento.

I campioni trattati con S-UC3 contenente lo 0.25% di Cu hanno invece determinato l'insorgenza di effetti tossici sulle specie modello utilizzate già nei test di tossicità di primo livello per cui non si è proceduto a testarli nei test di secondo e terzo livello. Tale trattamento è risultato tossico anche dall'analisi dei biomarker condotte su mitili e gasteropodi.

Tabella 7 - Valutazione ecotossicologica integrata dei trattamenti chimici e fisici applicati su campioni di legno esposti all'acqua dolce. Legenda: Rosso=presenza effetti tossici; Arancione: debole presenza di effetti tossici; Verde: Assenza effetti tossici; n.d =test non effettuati

Partner	Test	C	NTC	TM	S-UC3
UNIVE	Tier1 - Tossicità acuta dei lisciviati al tempo 0 e dopo maturazione (15 e 30 giorni)	Verde	Verde	Verde	Rosso
	Tier2 - Tossicità su stadi larvali dei lisciviati dopo 30 giorni di maturazione	Verde	Verde	Verde	n.d
	Tier3 - Tossicità cronica dei lisciviati dopo 30 giorni di maturazione	Verde	Verde	Verde	n.d
CNR-ISMAR	Biomarkers determinati nei mitili	Verde	Verde	Verde	Rosso
	Biomarkers determinati nei gasteropodi	Verde	Arancione	Arancione	Rosso

Anche in questo caso gli effetti tossici determinati sugli organismi modello sono verosimilmente da imputare al rilascio anche in ambiente dulciacquicolo del rame contenuto nell'impregnante Silvanolin. Le analisi chimiche condotte dal team CNR-ISMAR hanno evidenziato infatti come le concentrazioni di rame nelle vasche contenenti i campioni trattati con S-UC3 fossero più elevate rispetto a quelle contenenti i campioni trattati termicamente oppure non trattati. Anche in questo caso è stato inoltre osservato un progressivo aumento della concentrazione in acqua del Cu durante la prima settimana per poi diminuire nel corso dell'esperimento.

5 CONCLUSIONI / SUGGERIMENTI

Le indagini ecotossicologiche condotte utilizzando diversi organismi modello che sono stati esposti ai campioni di legno trattati con varie formulazioni di impregnante chimico Silvanolin e/o sottoposte a modificazioni termiche hanno evidenziato che:

- il trattamento termico TM e quello con la formulazione S-Low non causano effetti tossici né se i campioni vengono esposti in acqua di mare né se vengono esposti in acqua dolce;
- il trattamento con Silvanolin sia nella formulazione UC5 che MAR determina effetti tossici quando i campioni vengono esposti in ambiente marino e pertanto ulteriori modifiche ai protocolli di impregnazione dei materiali sono necessari per rimuovere la porzione di impregnante che facilmente viene rilasciata prima del posizionamento dei materiali trattati in ambiente marino;
- Il trattamento con Silvanolin nella sua formulazione UC3 determina effetti tossici quando i campioni vengono esposti in ambiente dulciacquicolo e pertanto ulteriori

modifiche nei protocolli di impregnazione dei materiali sono necessari per rimuovere la porzione di impregnante che facilmente viene rilasciata prima del posizionamento dei materiali trattati in ambiente dulciacquicolo.

Sulla base dei dati ottenuti dalle analisi chimiche che hanno evidenziato un rilascio di Cu nelle vasche sperimentali solamente nella prima parte degli esperimenti di esposizione, si suggerisce di migliorare la fase di risciacquo/maturazione dei materiali trattati prima della loro posa in opera per minimizzare gli effetti negativi. Dai test condotti dal Partner UNIVE una maturazione in acqua di 30 giorni produce gli esiti migliori in tutte le fasi di valutazione.

In questo studio il principale aspetto innovativo è stato l'impiego di un'approccio alla sostenibilità e compatibilità ambientale dei legni trattati valutando il possibile impatto sulla componente biologica dell'ecosistema tramite un approccio ecotossicologico integrato. Sono stati analizzati materiali prodotti secondo i principali metodi di protezione ossia l'impregnazione e le modificazioni fisiche del legno. Questo tipo di valutazione ha certamente rappresentato un aspetto innovativo e non ancora sufficientemente applicato e normato a livello europeo in relazione alla prevenzione degli impatti sull'ambiente e, di riflesso, sulla qualità della vita di chi lo popola. Il presente studio può pertanto costituire un esempio procedurale nella valutazione delle performances ambientali dei materiali.

BIBLIOGRAFIA CITATA

Boyle T.P., Fairchild J.F., 1997. The role of mesocosm studies in ecological risk analysis. *Ecological Applications*, 7: 1099-1102.

Caquet, T. (2013). Aquatic Mesocosms in Ecotoxicology. In: Férard, JF., Blaise, C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2_10

C. Blaise and F. Gagné, 2009. Bioassays and biomarkers, two pillars of Ecotoxicology: past, present and prospective uses. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18: 135-139.

Regoli F., 2001. Monitoraggio della contaminazione chimica: ecotossicologia e biomarker. *Recupero ambientale*, a cura di R. Danovaro, UTET libreria, pp189-222.

CEN (2013). EN 335-1 -Classification of hazard classes. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.

ECHA, 2013. Guidance on information requirements. Guidance on regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products (BPR) Version 1.0 July 2013 ECHA-13-G-04-EN, ISBN 978-92-9244-014-5, pp. 225.

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

Hanno contribuito alle attività progettuali:

Daniele Cassin (CNR-ISMAR)
Francesco Acri (CNR-ISMAR)
Andrea Pesce (CNR-ISMAR)
Stefano Pasqual (CNR-ISMAR)
Irene Guarneri (CNR-ISMAR)

Marco Baccichet (UNIVE)
Marco Brino (UNIVE)
Gabriele Capodaglio (UNIVE)
Gabriele Giuseppe Distefano (UNIVE)
Chiara Licata (UNIVE)
Davide Marchetto (UNIVE)
Martina Russo (UNIVE)
Elisa Scalabrin (UNIVE)

Cecilia Balestra (OGS)
Federica Camisa (OGS)
Mauro Celussi (OGS)
Federica Cerino (OGS)
Edvino Cociancich (OGS)
Tommaso Diociaiuti (OGS)
Elena Di Poi (OGS)
Daniela Fornasaro (OGS)
Annalisa Franzo (OGS)
Martina Kralj (OGS)
Simonetta Lorenzon (OGS)
Federica Nasi (OGS)
Vanessa Natali (OGS)
Federica Relitti (OGS)
Gianluca Zazo (OGS)

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 okoljske združljivosti zaščitnih obdelav lesa z vključitvijo ekotoksikoloških odzivov pri različnih stopnjah obremenitve

Različica: št. 1

Referenčni DS: 3.3

Odgovorni partner: Univerza v Benetkah

Avtorji: Nesto Nicoletta, Marčeta Tihana, Moschino Vanessa, Cibic Tamara, Picone Marco, Volpi Ghirardini Annamaria

Datum: 31. 07. 2022

KAZALO

OKRAJŠAVE	1
POVZETEK.....	2
1 OPREDELITEV PROBLEMATIKE IN CILJEV.....	3
2 ZAKONSKA PODLAGA.....	4
3 EKOTOKSIKOLOŠKE OCENE NA LESNIH PLOŠČAH, KI SO BILE TERMIČNO OBDELANE ALI IMPREGNIRANE	15
3.1 Aktivnosti, ki jih je izvedel partner UNIVE	15
3.2 Aktivnosti, ki jih je izvedel partner CNR- ISMAR.....	17
3.3 Aktivnosti, ki jih je izvedel partner OGS.....	18
4 RAZPRAVA	19
5 ZAKLJUČKI/ PRIPOROČILA	22
NAVEDENI VIRI.....	22

OKRAJŠAVE

C: kontrolni testni pogoj brez lesenih plošč

NTC: kontrolni testni pogoj s prisotnostjo neobdelanih lesenih plošč

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

S- MAR: testni pogoj s prisotnostjo lesenih plošč, zaščitenih s 0,25 % Cu raztopino Silvanolin

S-UC3: testni pogoj s prisotnostjo lesenih plošč, zaščitenih z 0,25 % Cu raztopino Silvanolin

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

TM: testni pogoj s prisotnostjo termično modificiranih lesenih plošč

POVZETEK

Strategija preizkušanja, uporabljena v tej raziskavi, sloni na različnih stopnjah biološke obremenitve tako, da usmerja proces ocenjevanja sprejemljivosti učinkov zaščite lesa (tako fizikalne kot kemijske) v primerih, ko je lesni material izpostavljen vodnemu okolju (morskemu in sladkovodnemu okolju). Izmerili smo zlasti učinke, ki jih te obdelave lahko imajo na živalske in rastlinske organizme glede na sproščanje potencialno strupenih snovi, ki so prisotne v predlaganih impregnacijskih sredstvih (npr. baker, amin) in naravno prisotne v lesu iglavcev (npr. terpeni, polifenoli, lignin). V ta namen smo združili izkušnje, ki so jih italijanski partnerji pridobili na področju vodne ekotoksikologije in so jih že uspešno uporabili pri ocenjevanju obdelanega lesa v Beneški laguni z namenom njihovega čezmejnega usklajevanja. Partner UNIVE je opravil laboratorijske teste akutne, subkronične in kronične ekotoksičnosti na organizmih, ki pripadajo različnim debлом in imajo različne trofične strategije, z uporabo niza preskusov, ki so bili že temeljito preverjeni v Beneški laguni, ter novega niza testov za sladko vodo. Partner CNR-ISMAR je izvedel laboratorijske teste izpostavljenosti ter z uporabo biomarkerjev ocenil presnovne, celične in fiziološke spremembe pri morskih in sladkovodnih nevretenčarjev, kot so školjke in polži. Partner OGS pa je v mikrokozmosu proučil spremembe v sestavi planktonskih združb, ki so naravno prisotne v vodi, ter morebitne zaviralne učinke obdelanega ali modificiranega lesenega materiala na tvorbo mikrobnega biofilma.

Ekotoksikološke preiskave na različne modelne organizme, izpostavljene vzorcem lesa, ki so bili obdelani z različnimi formulacijami Silvanolina in/ali termično modificirani, so pokazale, da termična modifikacija TM in obdelava s formulacijo S-Low nimata strupenih učinkov, ko je material izpostavljen morski in sladki vodi. Kemijska obdelava s formulacijama S-UC5 in S-MAR se je izkazala za neustrezno za morsko okolje, saj povzroča strupene učinke v primeru izpostavljenosti vzorcev v morski vodi. Tudi zaščitna obdelava s formulacijo S-UC3 ni združljiva s sladkovodnim okoljem, ker ima strupene učinke na vzorce, izpostavljene sladki vodi. V obeh primerih je zato treba spremeniti protokole o impregnaciji, da se odpravi delež impregnacijskega sredstva, ki se zlahka sprosti pred postavitvijo obdelanega materiala v vodno okolje.

Na podlagi podatkov kemijskih analiz, ki so pokazale sproščanje Cu v testnih posodah le v prvem delu preizkušanja izpostavljenosti, priporočamo, da se pred postavitvijo zaščitnega materiala izboljša faza izpiranja/predhodne izpostavljenosti le-tega, da se tako čim bolj zmanjšajo negativni učinki. Testi, ki jih je opravil partner UNIVE, so pokazali, da 30-dnevna predhodna izpostavitvev tako v slani kot sladki vodi zagotavlja boljše rezultate v vseh fazah ocenjevanja.

Element inovativnosti te raziskave predstavlja uporaba pristopa k okoljski trajnosti in združljivosti obdelanega lesa pri oceni morebitnega vpliva na biološko komponento vodnih ekosistemov z uporabo celovitega ekotoksikološkega pristopa. Tovrstna ocena je nedvomno inovativna, vendar na evropski ravni ni še dovolj uporabljena in normirana v zvezi s preprečevanjem vplivov na okolje in, posredno, na kakovost življenja njegovih

prebivalcev. Na podlagi navedenega lahko ta študija predstavlja primer postopka ocenjevanja okoljske učinkovitosti lesnega materiala.

1 OPREDELITEV PROBLEMATIKE IN CILJEV

V ekotoksikologiji je že dobro uveljavljeno načelo, po katerem je potencialno strupenost snovi in/ali materiala (naravnega in/ali sintetičnega) mogoče ugotoviti le z izvajanjem niza ekotoksikoloških preskusov, saj noben preskusni model ne more sam v celoti zagotoviti reprezentativnosti rezultatov za vse možne vrste matriksov in/ali snovi. Ekotoksikologija sicer proučuje vplive kemičnih elementov in/ali snovi na osebe, populacije, združbe in ekosisteme in si prizadeva za razvoj metod in opredelitev njihove uporabe z namenom reševanja posebnih težav. Čeprav se je splošni pristop v zadnjih desetletjih nekoliko spremenil, kemija in ekotoksikologija še vedno predstavljata osnovo za oceno potencialne strupenosti dane spojine ali snovi na okolje z uporabo dveh ključnih elementov, in sicer testov toksičnosti in biomarkerjev. Poleg tega obstajajo tudi raziskave mezokozmosov, ki se v glavnem uporabljajo kot raziskovalna orodja za proučevanje usode in vplivov ksenobiotov na ravni prebivalstva in združbe. Podatke, pridobljene s temi ocenami, lahko združimo kot dokaze vpliva onesnaženosti na organizme.

Pri preskusih strupenosti so organizmi, ki pripadajo jasno določenim in značilnim vrstam (preskusne vrste), izpostavljeni različnim koncentracijam potencialno strupenih kemikalij ali abiotskih matriksov okolja (npr. voda, sedimenti in/ali vodni elutriati) za določena časovna obdobja (ure ali dnevi), na koncu katerih se merijo različne končne točke, kot so smrtnost, rast, plodnost gametov in spremembe v fazi razvoja zarodka (Regoli, 2001). Istočasna izvedba več testov toksičnosti na organizme na različnih trofičnih ravneh velja za najučinkovitejšo metodo za določitev toksičnosti snovi ali matriksa okolja (Blaise in Gagné, 2009). Preskusi strupenosti so osnovna metoda za oceno biološke škode; danes so številni preskusi zelo standardizirani, različni predpisi pa določajo, da se ocena kakovosti okolja poleg kemijsko-fizikalne ocene vode opira tudi na rezultatih testov proučevanja potencialne toksičnosti nevarnih onesnažil.

Biomarkerji so biokemična, celična, fiziološka ali vedenjska sprememba v tkivih, telesnih tekočinah ali v celotnem organizmu, ki priča o izpostavljenosti in/ali učinku enega ali več onesnaževal. Uporaba biomarkerjev omogoča, da s proučevanjem takojšnjih odzivov opredelimo vrsto in/ali vrste onesnažil, katerim je bioindikatorski organizem izpostavljen, ter ravni izpostavljenosti. Glede na vplive, izmerjene na različnih nivojih strukturne kompleksnosti, bomo lahko napovedali nastanek dolgoročnih negativnih učinkov tudi na ekološki ravni. Uporaba niza biomarkerjev, kjer se hkrati meri več biomarkerjev na različnih nivojih biološke ureditve, razširi možnosti tolmačenja laboratorijskih in terenskih raziskav ter boljše razumevanje fizioloških in molekularnih povezav med različnimi biološkimi odzivi (Blaise in Gagné, 2009).

V ekotoksikologiji so mezokozmosi opredeljeni kot zunanji delno nadzorovani sistemi (npr. eksperimentalni kali in vodni tokovi) z znanimi in nadzorovanimi kemijsko-fizikalnimi značilnostmi (Boyle in Fairchild, 1997). Kot eksperimentalni sistemi, ki predstavljajo vmesni pogoj med laboratorijsko ustvarjenimi mikrokozmosi in realnim kompleksnim svetom, mezokozmosi omogočajo in situ preučevanje vodnega ekosistema,

obenem združujejo ekološki realizem z lažjim dostopom do številnih kemijsko-fizikalnih, bioloških in ekotoksikoloških končnih točk (endpoint). Vodni mezokozmosi so del celovitega nabora eksperimentalnih pristopov in orodij, in sicer od laboratorijskih testov strupenosti na posamezne vrste do opredelitve biomarkerjev pri bioindikatorskih vrstah; v ekologiji in ekotoksikologiji se trenutno uporabljajo za oceno ekološkega tveganja (Caquet, 2013).

V sklopu projekta Durasoft je bil uporabljen integrirani in hierarhično organiziran ekotoksikološki pristop za proučevanje bioloških učinkov različnih vrst zaščite lesa na okolje, s katerimi so bili obdelani preizkušanci (vzorci in plošče), izpostavljeni vodnem okolju (morskemu in sladkovodnemu okolju). Za oceno strupenosti zaščitnih obdelav lesa in koncentracije učinkov (UNIVE) v morskem in sladkovodnem okolju smo kot presejalno metodo izvedli niz preskusov toksičnosti (akutne, subakutne in kronične). Na podlagi teh rezultatov smo izbrali tiste obdelave in končno razmerje površina vzorca/količina vode za teste izpostavljenosti, ki se bodo uporabljali pri proučevanju učinkov z uporabo nabora biomarkerjev na bioindikatorske sladkovodne in morske organizme (ISMAR-CNR). Nazadnje so bile mezokozmos raziskave namenjene in situ oceni učinkov na planktonsko populacijo in združbo (OGS).

2 ZAKONSKA PODLAGA

Za preprečevanje napada lesnih škodljivcev je bila posebna pozornost vedno namenja zaščiti stalnih lesenih konstrukcij, zlasti tistih v morski vodi. Tehnike obdelave, ki so se sčasoma uporabljale, so predvidevale uporabo učinkovitih, a za okolje strupenih in škodljivih zaščitnih sredstev, kot je na primer krezot, ki danes velja za rakotvorno snov. Skladno s klasifikacijo biološke nevarnosti *Evropskega komiteja za standardizacijo* (CEN 2013) se glavna področja uporabe obdelanega lesa (termin označuje katerokoli vrsto fizikalne ali kemijske obdelave) opredeljujejo in razvrstijo v tako imenovane **razrede nevarnosti**.

Vendar se v tem sistemu biološka nevarnost ne šteje kot nevarnost sproščanja kemikalij iz materiala s posledičnimi možnimi škodljivimi učinki na bioto in ekosistem na splošno, temveč kot **možna biološka razgradnja** materiala, ki jo povzročijo populacija organizmov ali skupine posebnih organizmov. V tem primeru ne gre za okoljsko nevarnost, temveč za nevarnost povezano z napadom lesnih škodljivcev, ki lahko spremenijo značilnosti lesenih konstrukcij.

S praktičnega vidika izraz »razred nevarnosti« bi zato učinkoviteje in ustrežneje nadomestili s terminom »razred uporabe« (OECD, 1999) (preglednica 1). Opredelitev nevarnosti (»uporaba«) velja torej za glavno merilo, ki ga je treba upoštevati pri izbiri najboljših vrst lesne surovine, pri uporabi morebitnih obdelav za podaljšanje življenjske dobe lesa glede na pogoje uporabe ter pri izbiri najboljših metod zaščitne obdelave, da bi tako dosegli najvišjo raven zaščite izbrane konstrukcije glede na kraj njene postavitve in namembnost uporabe.

Preglednica1 - Razredi uporabe z nekaterimi reprezentativnimi scenariji (OECD, 1999).

Class	Description	Scenarios proposed	Primary receiving environmental compartment
1	Situation in which wood or wood-based product is under cover, fully protected from the weather and not exposed to wetting	<i>no scenario</i>	Indoor/outdoor air (emissions to outdoor air are considered negligible)
2	Situation in which wood or wood-based product is under cover, fully protected from the weather but where high environmental humidity can lead to occasional but not persistent wetting	<i>no scenario</i>	
3	Situation in which wood or wood-based product is not covered and not in contact with the ground. It is either continually exposed to the weather or is protected from the weather but subject to frequent wetting	a. fence b. noise barrier c. house d. bridge	soil
4	Situation in which wood or wood-based product is in permanent contact with the ground or fresh water and thus is permanently exposed to wetting, divided into:		
4a	Wood in contact with the ground	a. transmission pole b. fence post	soil
4b	Wood in contact with fresh water	a. jetty in lake [#] b. sheet piling in waterway	freshwater
5	Situation in which wood or wood-based product is permanently exposed to salt water	harbour wharf	seawater

**It has to be noted that the above water part of jetties and wharf can be made of Use Class 3 wood, whereas the submerged part belongs to Use Class 4 and 5 respectively. For reasons of simplicity, the jetty and wharf scenarios are described under Use Class 4b and 5 respectively.*

V nadaljevanju so navedeni glavni evropski predpisi, ki so bili prevzeti v italijanski pravni red, kot na primer standardi UNI EN, ki urejajo uporabo lesenega materiala v naravnem okolju (po časovnem vrstnem redu izdaje).

UNI EN 212:2004: »Zaščitna sredstva za les - Splošna navodila za vzorčenje in pripravo zaščitnih sredstev za les in zaščitnega lesa za analizo«. Standard opiše splošne postopke za vzorčenje in pripravo zaščitnih sredstev za les, ki bodo analizirani.

UNI EN 351-1:2008: »Trajnost lesa in lesnih proizvodov - Zaščitni masivni les - 1. del: Razvrščanje biocidnih proizvodov glede na penetracijo in navzem.« Standard določa razvrščanje zaščitnega lesa glede na penetracijo zaščitnega sredstva ter poda navodila za njegovo razvrščanje glede na navzem proizvoda.

UNI EN 335:2013 - »Trajnost lesa in lesnih proizvodov - Razredi uporabe: definicije, uporaba pri masivnem lesu in lesnih ploščah«. Ta standard določa pet razredov uporabe, ki ustrezajo različnim razmeram izpostavljenosti lesa. Opredeljuje tudi biološke dejavnike, ki so značilni za posamezen razred uporabe. Ti razredi ne dajejo informacij o učinkovitosti izdelka in trajnosti lesa, še posebej razred nevarnosti 4 (les ali lesni izdelek je v stiku z zemljo ali sladko vodo in je zato stalno izpostavljen vlaženju) in razred nevarnosti 5 (les ali lesni izdelek je trajno izpostavljen slani vodi). Osnovno načelo je: »Višje je tveganje, večja je potreba po povečanju naravne odpornosti lesa z zaščitnimi obdelavami«.

UNI EN 599-1:2014 - *»Trajnost lesa in lesnih proizvodov - Učinkovitost biocidnih proizvodov za preventivno zaščito lesa, določena z biološkimi preskusi - 1. del: Zahteve glede na razred uporabe«* prenese standard EN599-1:2009+A1:2013. Ta standard določa za vsak od 5 razredov uporabe po predpisu UNI EN 335-1 biološke preskuse, ki ji je treba opraviti za oceno učinkovitosti biocidnih proizvodov za zaščito lesa kot preventivno obdelavo masivnega lesa, skupaj z minimalnimi postopki pospešenega umetnega staranja, zahtevanimi za posamezen razred uporabe.

UNI EN 73:2020: *»Trajnost lesa in lesnih proizvodov - Pospešeno staranje zaščitenega lesa pred biološkim preskušanjem - Postopek izparevanja«*. Ta standard se uporablja za oceno učinkovitosti zaščitnih sredstev lesa skozi čas, saj je les lahko izpostavljen razmeram, ki bi lahko povzročile izhlapevanje ali odstranitev zaščitnega sredstva s posledičnim zmanjšanjem njegove učinkovitosti. Dokument predlaga laboratorijsko metodo staranja vzorcev pred biološkim preskušanjem. Predvideni postopek staranja je izparevanje lesnih vzorcev in izdelkov na osnovi lesa, ki bodo nato predmet biološkega preskušanja. Ta metoda se lahko uporablja tudi za predhodno kondicioniranje neobdelanega lesa, modificiranega lesa in lesnih plošč ne glede na to, ali so bili obdelani z zaščitnimi sredstvi ali ne.

UNI EN 84:2020: *»Trajnost lesa in lesnih proizvodov - Pospešeno staranje zaščitenega lesa pred biološkim preskušanjem - Postopek izpiranja«*. Ta dokument opredeljuje metodo izpiranja, ki se lahko uporablja za lesene plošče pred njihovim biološkim preskušanjem. Postopek se lahko uporablja a) za predhodno kondicioniranje vzorcev pred biološkim preskušanjem in b) za oceno izgube učinkovitosti, ko se izsledki biološkega testa na izprane vzorce primerjajo z drugimi vzorci, ki niso bili obdelani z istim postopkom. Opisana metoda se lahko uporablja za predhodno kondicioniranje neobdelanega lesa, modificiranega lesa in lesnih plošč, ne glede na to, ali so bili obdelani z zaščitnim sredstvom. Osnovno načelo tega predpisa je, da se lesni vzorci *»vakuumsko impregnirajo s sredstvi na osnovi vode«*, se za določen čas potopijo v vodo, nato se biološko testirajo pred glivami in žuželkami.

UNI EN 113-1:2021: *»Trajnost lesa in lesnih proizvodov - Preskusna metoda proti glivam prostotrosnicam - 1. del: Ocenjevanje biocidne učinkovitosti zaščitnih sredstev lesa«*. Ta dokument opiše metodo za ugotavljanje učinkovitosti zaščitnih sredstev, ki so bili naneseni na les s postopkom penetracije, proti glivam prostotrosnicam. Ta metoda se uporablja za formulirane izdelke ali njihove aktivne sestavine. Testni vzorci lesne vrste, občutljive na glive prostotrosnice, se impregnirajo z naraščajočimi koncentracijami raztopin zaščitnega sredstva za les, preskusni vzorci referenčnega lesa pa so izpostavljeni napadu čistih kultur gliv prostotrosnic. Po predpisanem inkubacijskem obdobju pod določenimi pogoji bo biocidna učinkovitost proučenega proizvoda določena na podlagi izgube suhe mase preizkušancev.

Razen spodnjega predpisa EN ISO 15181-1:2007 o izločanju biocidov noben standard ne izrecno navaja **okoljske nevarnosti morebitnih zaščitnih sredstev**, uporabljenih pri obdelavah.

UNI EN 15181-1:2007: »Barve in laki - Določitev razmerja sproščanja biocidov iz barv proti obraščanju - 1. del: Splošna metoda za ekstrakcijo biocidov«. Ta predpis določa standardne laboratorijske pogoje za ekstrakcijo biocidov iz barv proti obraščanju z uporabo umetnostno oblikovane morske vode. Skupaj z drugimi deli standarda ISO 15181 se uporablja za določitev količine specifičnih biocidov v ekstraktu, kot so na primer baker in/ali drugi organski biocidi, in za izračun **stopnje njihovega sproščanja** iz barve.

V evropski in državni (italijanski) zakonodaji obstaja vrzel pri normiranju nevarnosti in tveganja lesnega materiala za okolje (predvsem vodno) v povezavi z uporabo zaščitnih obdelav lesa.

Ker ne obstajajo specifični področni predpisi, se je za oceno **okoljske nevarnosti** treba sklicevati na evropske standarde in uredbe, ki proizvajalcem narekujejo obvezne **ekotoksikološke teste** za pridobitev dovoljenja za uporabo izdelka, ki se lahko šteje za prijaznega do okolja.

V nadaljevanju povzemamo **glavno okoljsko zakonodajo in uredbe EU** s področja ocene kakovosti vode in okoljske združljivosti proizvodov/materialov, ki pridejo v stik z vodo. S tem želimo izpostaviti, kot je že danes jasno, **ključno vlogo ekotoksikologije** pri oceni tveganja in nevarnosti kemikalij in proizvodov.

2.1 Direktiva 2000/60/ES

Okvirna direktiva o vodah predstavlja najpomembnejši okoljski predpis Evropske unije. V 1. členu so opredeljeni naslednji osnovni cilji:

1. zaščita in izboljšanje kakovosti vodnih ekosistemov;
2. spodbujanje trajnostne rabe vode, ki temelji na dolgoročnem upravljanju vodnih virov;
3. zagotavljanje ustrezne količine vode, kadar in ko je to potrebno.

Ugotavlja se, da se glavni cilji direktive vključijo v širši kontekst evropske okoljske politike, ki stremi k varstvu, ohranjanju in izboljšanju kakovosti okolja.

Preudarno in gospodarno izkoriščanje naravnih virov mora temeljiti na previdnostnem načelu, na načelu preventivnega ukrepanja in na načelu, da naj se poškodba okolja prednostno odpravi pri viru, kot tudi na načelu »onesnaževalec plača«.

Strategija za preprečevanje onesnaževanja vode, opisana v 16. členu, predvideva postopno zmanjšanje uhajanja nevarnih snovi v vodo, da se tako doseže končni cilj odprave prednostnih nevarnih snovi (navedene v Prilogi X) in prispeva k temu, da se v morskem okolju pri naravno prisotnih snoveh dosežejo koncentracije, ki so blizu vrednostim naravnega ozadja.

Skladno s to direktivo so **testi strupenosti** uporabno orodje za pripravo seznama kemikalij in s tem povezano oceno tveganja za glavna onesnaževala v vodnem okolju.

Med prilogami velja omeniti Prilogo V, kjer je državam članicam predlagan postopek za določitev standardov kemijske kakovosti, ki jih je treba opredeliti za vodo, sediment in bioto. **Testi toksičnosti bi se morali uporabljati pri določanju standardov kakovosti širokega nabora onesnaževal** (navedena v točkah 1 do 9 Priloge VIII direktive) za varstvo vodnih organizmov.

V oddelku 1.2.6 so jasno navedeni postopki za določanje okoljskih standardov kakovosti za vodo, sediment in bioto. Za vsako onesnaževalo »*bi bilo treba, kadar je mogoče, pridobiti podatke o akutnih in kroničnih učinkih za navedene taksoni, ki so pomembni za določen tip vodnega telesa ter za vse druge vodne taksoni, za katere so podatki na voljo.*«

Jasno je, da se podatki o zgoraj opisanih akutnih in kroničnih učinkih, čeprav to ni izrecno navedeno, nanašajo na teste toksičnosti. V nadaljevanju besedila piše, da je treba proučiti podatke o »osnovnem sklopu« taksonov, in sicer:

- *alge in/ali makrofite;*
- *vodne bolhe ali organizme, značilne za slane vode;*
- *ribe.*

Za določanje najvišje povprečne letne koncentracije teh elementov v vodnih telesih države članice določijo za vsak primer ustrezne varnostne faktorje, skladne z naravo in kakovostjo razpoložljivih podatkov, kot je prikazano v spodnji preglednici (2).

Preglednica 2 - Direktiva 2000/60/ES, Priloga V. Opis varnostnih faktorjev za določanje okoljskega standarda kakovosti.

Opis	Varnostni faktor
Vsaj ena akutna L(E)C50 iz vsake od treh prehranjevalnih ravni osnovnega sklopa	1000
Ena kronična NOEC (za ribo ali za vodno bolho ali za organizem, reprezentativen za slano vodo)	100
Dva kronična NOEC iz vrst, ki predstavljajo dve prehranjevalni ravni (riba in/ali vodna bolha ali za slane vode reprezentativni organizem in/ali alge)	50
Kronični NOEC iz vsaj treh vrst (običajno riba, vodna bolha ali za slane vode reprezentativen organizem in alge), ki predstavljajo tri prehranjevalne ravni	10
Drugi primeri, vključno s podatki s terena ali modeli ekosistemov, ki omogočajo izračun in uporabo natančnejših varnostnih faktorjev	Ocena za vsak posamezen primer

2.2 - Uredba (ES) št.1907/2006 in Uredba (ES) št. 440/2008

Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) (Evropski uradni list št. 396 z dne 20. 12. 2006) dopolnjena z Uredbo Komisije (ES) št. 440/2008 z dne 30. maja 2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 (Evropski uradni list št. 142 z dne 31. 05. 2008)

Uredba ES št. 1907/2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij, znana s kratico **REACH** (ang. Registration, Evaluation, Authorization of CHemicals), je stopila v veljavo 1. junija 2007 in je temeljito spremenila dotedanja področna pravila.

REACH je sistem, namenjen zbiranju vseh informacij o kemično-fizikalnih, toksikoloških in ekotoksikoloških lastnosti kemikalij ter o različnih uporabah, ki bi lahko delavce, potrošnike in okolje izpostavile tem snovem.

Besedilo nadomešča in povzema več kot 40 uredb in direktiv, ki urejajo kemikalije na različnih ravneh, njegov cilj pa je zagotoviti višjo raven zaščite zdravja ljudi in okolja. Da bi zagotovili dosego teh ciljev, je bilo načelo dokazovanja temeljito spremenjeno: prej so se snovi lahko uporabljale, dokler niso javni organi dokazali njihove škodljivosti, po novem pa morajo industrijski proizvajalci dokazati, da je kemikalija varna znotraj določenih razponov koncentracije (načelo previdnosti).

Uredba REACH zadeva vsa področja, ki v različne namene uporabljajo kemikalije, in sicer proizvajalci, uvozniki, formulatorji in končni uporabniki kemijskih snovi in pripravkov ne glede na to, če so nevarni ali ne.

V zvezi z biocidnimi proizvodi se Uredba REACH v celoti uporablja za količine aktivnih snovi za »nebiocidno« uporabo in vse ostale neaktivne komponente, vsebovane v biocidnem proizvodu. Aktivne snovi, ki se uporabljajo izključno v biocidnih proizvodih, se štejejo za že registrirane (15.2 člen), če so vključene v priloge I, IA ali IB Direktive 98/08/ES, ali so vključene v program pregleda za aktivne snovi, ki so bile na 14. 05. 2000 že na trgu (Uredba (ES) 1451/2007).

Uredba Komisije (ES) št. 440/2008 z dne 30. maja 2008 je uvedla **testne metode za ugotavljanje kemično-fizikalnih, toksičnih in ekotoksičnih lastnosti**, ki jih je treba izvajati v skladu z načeli dobre laboratorijske prakse, kot je opredeljena v Direktivi 2004/10/ES (4. odstavek 13. člena).

V oddelku 12.1 priloge 2 k Uredbi REACH o navodilih za pripravo varnostnih listov je določeno, da *»je treba navesti ustrezne razpoložljive podatke o akutni in kronični strupenosti za vodno okolje za ribe, rake, alge in druge vodne rastline. Če so na voljo, je treba prav tako vključiti podatke o strupenosti za mikro- in makroorganizme v tleh ter druge okoljsko pomembne organizme, kot so ptice, čebele in rastline. Kadar ima snov ali pripravek zaviralne učinke na aktivnost mikroorganizmov, je treba omeniti možni učinek na naprave za čiščenje odpadne vode.«* V točki 9 prilog VII, VIII, IX in X o standardnih zahtevah po informacijah za snovi, proizvedene ali uvožene v količinah 1 tone ali več

(Priloga VII), 10 ton (Priloga VIII), 100 ton (Priloga IX), 1000 ton (Priloga X) je preglednica, kjer so navedeni predvideni **testi toksičnosti za vsako kategorijo**. V preglednici 3 so na enem mestu povzeti zahtevani preskusi, ki se razlikujejo glede na količino materiala, ki se trži.

Ugotavlja se, da število preskusov, ki jih je treba opraviti, sorazmerno narašča s povečanjem količine snovi. Podobno, **kratkoročne teste strupenosti postopoma nadomeščajo dolgoročni preskusi**, ki se izvajajo tako na vodnih kot tudi na kopenskih organizmih.

Preglednica 3- Povzetek ekotoksikoloških podatkov, ki se zahtevajo glede na količino na tržišču (Uredba REACH)

EKOTOKSIKOLOŠKI PODATKI	Priloga VII	Priloga VIII	Priloga IX	Priloga X
Zahtevani preskusi	Snovi ≥ 1 t	Snovi ≥ 10 t	Snovi ≥ 100 t	Snovi ≥ 1000 t
Vodna strupenost	Kratkoročna strupenost za nevretenčarje (<i>Daphnia</i>) Zaviranje rasti alg	Kratkoročna strupenost za ribe Študija zaviranja dihanja aktivnega blata	Dolgoročna strupenost za nevretenčarje (<i>Daphnia</i>) Dolgoročna strupenost za ribe	-
Razkroj	Biološka razgradljivost	Abiotska razgradnja	Simulacija razgradnje v površinskih vodah, tleh, sedimentu in opredelitev razgradnih produktov.	Biotska razgradnja
Usoda in obnašanje v okolju	-	Adsorpcijska/desorpcijska presejalna preiskava	Dodatni podatki o adsorpciji/desorpciji Bioakumulacija vodnih vrst (ribe)	Dodatni podatki o adsorpciji/desorpciji
Učinki na kopenske organizme	-	-	Kratkoročna strupenost za nevretenčarje Učinki na mikroorganizme Kratkoročna strupenost za rastline	Dolgoročna strupenost za nevretenčarje Dolgoročna strupenost za organizme, ki živijo v sedimentu. Dolgoročna strupenost ali strupenost za razmnoževanje ptic

V Uredbi o določitvi testnih metod (št. 440/2008/ES) so predlagane in opisane vse metode za fizikalno-kemijske, **toksikološke in ekotoksikološke analize** iz Uredbe REACH.

V delu C Priloge o metodah je opisanih 24 metod za določanje ekotoksičnosti. Na vsakem listu je treba navesti naslednje podatke o preskusu:

- **METODA:** opredelitev in enota, referenčne snovi, načelo preskusne metode, merila kakovosti, opis preskusne metode, postopek;
- **PODATKI IN OCENA;**
- **POROČILO O IZVEDBI PRESKUSA** (poročilo o preskusu);
- **LITERATURA** s sklicevanjem na standardne metode;
- **DODATKI**, ki vsebujejo dodatne informacije, kot so seznam organizmov, na katere se lahko izvedejo preskusi, pogoji gojenja in vzdrževanja, recepti za raztopine in načrti ocenjevanja.

Med predvidenimi metodami so navedeni (akutni) test omejevanja gibanja z *D. magna*, test razmnoževanja z *D. magna* in test zaviranja rasti alg, ki so bili tudi izvedeni pri tem projektu.

2.3 Uredba 1272/2008/EU CLP

Uredba 1272/2008/EU o razvrščanju, označevanju in pakiranju (v ang. CLP - Classification, Labelling and Packaging) je v Evropi uvedla sistem razvrščanja, označevanja in pakiranja kemikalij (in njihovih zmesi). Cilji uredbe so:

- omogočati prosti pretok snovi in njihovih zmesi v Evropski uniji ter zagotoviti visoko raven varovanja zdravja ljudi in okolja;
- določiti lastnosti, zaradi katerih bi bilo treba snovi in zmesi razvrstiti kot nevarne;
- da proizvajalci seznanijo potrošnike o nevarnostih snovi in zmesi.

Postopek razvrščanja nevarnosti predvideva identifikacijo fizikalno-kemijske nevarnosti (PH), nevarnosti za zdravje človeka (H) in nevarnosti za okolje (ENV), ki jo povzroča snov ali zmes, ter razporeditev po kategorijah, kjer je določena resnost nevarnosti.

Po tej uredbi morajo proizvajalci, uvozniki ali nadaljnji uporabniki snovi ali zmesi zbrati in oceniti vse razpoložljive informacije o nevarnih lastnostih le-teh. Gre skratka za samorazvrščanje proizvoda, ki jo je proizvajalec ali uvoznik dolžan opraviti.

Za samorazvrščanje snovi ali zmesi je treba:

- pridobiti razpoložljive informacije o potencialni nevarnosti, povezane s snovjo (ali zmesjo);
- oceniti zanesljivost informacij in izbrati najustreznejše informacije; oceniti informacije glede na merila za razvrščanje;

- odločiti, ali je snov (ali zmes) mogoče razvrstiti kot nevarno glede na razrede nevarnosti, opisane v prilogi I uredbe, in na stopnjo nevarnosti.

Uredba CLP običajno ne zahteva novih preskušanj o nevarnosti snovi ali zmesi za okolje (in za zdravje človeka). Če podatki niso razpoložljivi, pa je treba opraviti **ekotoksikološke** (in toksikološke) teste, ki izpolnjujejo zahteve po Uredbi REACH, načela OECD o dobri laboratorijski praksi (GLP) in vse mednarodno priznane metode, potrjene z mednarodnimi postopki, s čimer se lahko zagotovi zanesljivosti in visoko kakovost podatkov.

Glede nevarnosti za okolje podatki o akutni in kronični nevarnosti za vodno okolje temeljijo v glavnem na opredelitvi »končnih točk« (end point) strupenosti na **treh različnih vodnih trofičnih ravneh** z uporabo visoko standardiziranih protokolov za preskušanje. Ribe, raki in alge (ali druge rastline) se uporabljajo kot kazalniki, ki predstavljajo skupino vrst in taksonov znotraj posamezne trofične ravni. Informacije o usodi snovi ali zmesi v okolju (razgradnja in bioakumulacija) se skupaj s podatki o toksičnosti uporabljajo za določitev dolgoročnih učinkov.

[2.4 UREDBA \(EU\) št. 528/2012 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 22. maja 2012 o dostopnosti na trgu in uporabi biocidnih proizvodov](#)

Evropski referenčni predpis za impregnacijska sredstva za zaščito lesa je Uredba o dostopnosti na trgu in uporabi biocidnih proizvodov, obdelanega materiala in proizvodov.

Uredba EU o biocidnih proizvodih št. 528/2012, ki nadomešča Direktivo o biocidnih proizvodih 98/8/ES (*Direktiva Evropskega parlamenta in sveta z dne 16. februarja 1998 o dajanju biocidnih pripravkov v promet - Uradni list Evropska unije L. 123 z dne 24. 04. 1998*), opredeljuje dajanje v promet in uporabo biocidnih proizvodov, obdelanega materiala in proizvodov, ki se z delovanjem aktivnih snovi, ki jih vsebujejo biocidni proizvodi, uporabljajo za obvladovanje zdravju človeka ali živali škodljivih organizmov, kot so bakterije ali žuželke.

Uredba ureja:

- sestavo evropskega seznama aktivnih snovi, ki se lahko uporabljajo v biocidnih proizvodih;
- dovoljenje za dajanje biocidnih proizvodov na trg;
- vzajemno priznavanje dovoljenj znotraj Evropske unije;
- omogočanje dostopnosti na trgu in uporabo biocidnih proizvodov v eni ali več državah članicah ali v Uniji;
- dajanje obdelanih proizvodov na trg.

Te naloge lahko opravljajo pristojni organi držav članic ali osrednji organ **Evropska agencija za kemikalije - ECHA**.

V prilogi II predpisa so navedene ekotoksikološke informacije, potrebne za odobritev aktivne snovi. Vključeni sta zbirka osnovnih podatkov - ZOP (Core Data Set-CDS), ki temelji predvsem na **testih kratkoročne strupenosti** (preglednica 4), in zbirka **dodatnih podatkov** - ZDP (Additional Data Set - ADS), ki se zahtevajo, če je bilo v zvezi z uporabo

aktivne snovi ugotovljeno možno tveganje za vodni ekosistem ali če se pričakuje dolgoročna izpostavljenost (preglednica 5).

Podatki, ki spadajo v ZOP, veljajo za osnovne podatke, ki bi morali biti načeloma na voljo za vse aktivne snovi. V nekaterih primerih pa je zaradi fizikalnih ali kemijskih lastnosti snovi nemogoče ali nepotrebno zagotoviti posebne podatke, ki spadajo v sistem ZOP.

Preglednica 4 - Ekotoksikološki osnovni podatki (zbirka osnovnih podatkov - ZOP) , potrebni za odobritev aktivne snovi skladno z UREDBO (EU) št. 528/2012.

9.	EKOTOKSIKOLOŠKE ŠTUDIJE		
9.1	<p>Na voljo mora biti dovolj informacij glede ekotoksičnosti biocidnega proizvoda, da omogočajo odločitve o razvrstitvi proizvoda.</p> <p>— Kadar so na voljo veljavni podatki o vsaki od sestavin zmesi, sinergijski učinki med katero koli od sestavin pa niso pričakovani, je mogoče zmes razvrstiti v skladu s pravili iz Direktive 1999/45/ES, Uredbo (ES) št. 1907/2006 (REACH) in Uredbo (ES) št. 1272/2008 (CLP).</p> <p>— Kadar veljavnih podatkov o sestavinah ni na voljo ali kadar je mogoče pričakovati sinergijske učinke, je morda treba opraviti preskuse sestavin in/ali samega biocidnega proizvoda.</p>		
9.2	<p>Nadaljnje ekotoksikološke študije</p> <p>Kadar podatki o aktivni snovi ne morejo dati zadostnih informacij in kadar obstajajo znaki tveganja zaradi posebnih lastnosti biocidnega proizvoda, so lahko potrebne nadaljnje študije, izbrane med končnimi točkami iz oddelka 9 Priloge II, za posamezne sestavine biocidnega proizvoda ali sam biocidni proizvod.</p>		
9.3	Učinki na druge specifične neciljne organizme (floro in favno), za katere se predvideva, da so ogroženi	ZDP	Podatki za oceno tveganj v zvezi z divjimi sesalci se pridobijo iz ocene toksičnosti za sesalce.
9.4	Če je biocidni proizvod v obliki vabe ali zrnc, so lahko potrebne naslednje študije:		
9.4.1	Nadzorovani preskusi za oceno tveganja za neciljne organizme v razmerah na prostem		
9.4.2	Študije o tem, ali in kako ogroženi neciljni organizmi zaužijejo biocidni proizvod		
9.5	Drugotni ekološki vpliv, npr. ob tretiranju velikega dela specifičnega habitata	ZDP	

Preglednica 5 - Ekotoksikološki dodatni podatki (zbirka dodatnih podatkov - ZDP) , potrebni za odobritev aktivne snovi skladno z UREDBO (EU) št. 528/2012.

Stolpec 1 Zahtevane informacije	Stolpec 2 Vsi podatki so del ZDP, razen če so označeni kot ZDP	Stolpec 3 Posebna pravila za prilagoditev glede standardnih informacij v zvezi z nekaterimi zahtevami glede informacij, za katere je potrebna uporaba preskusov na vrstničarjih
9.1.6 Nadaljnje študije toksičnosti na vodnih organizmih Če rezultati ekotoksikoloških študij, študij o usodi in obnašanju alihi predvideni uporabi aktivne snovi pokazajo, da obstaja tveganje za vodno okolje ali če se pričakuje dolgoročna izpostavljenost, se izvede eden ali več preskusov, opisanih v tem odseku.	ZDP	
9.1.6.1 Preskušanje dolgoročne toksičnosti na ribah (a) Preskus toksičnosti za ribe v zgodnji fazi življenja (ELS) (b) Preskus karkotrajne toksičnosti na zarodkih rib in ribji zalogi (c) Preskus rasti mladih rib (d) Preskus v celotnem življenjskem krogu rib	ZDP	
9.1.6.2 Preskušanje dolgoročne toksičnosti na nevrtenčarjih (a) Študija rasti in razmnoževanja vodne bolhe (Daphnia) (b) Razmnoževanje in rasti drugih vrst (npr. Mysid) (c) Razvoj in pojav drugih vrst (npr. Chironomid)	ZDP	
9.1.7 Biokumulacija v ustreznih vodnih vrstah	ZDP	
9.1.8 Učinki na druge specifične neclne organizme (biov. in favoz), za katere se predvideva, da so ogroženi	ZDP	
9.1.9 Študije na organizmih, živečih v usedlinah	ZDP	
9.1.10 Učinki na vodne makrofite	ZDP	

Agencija ECHA je pripravila smernice za izvajanje uredbe - Guidance on information requirements (ECHA, 2013).

V prilogi V so navedene vrste biocidnih proizvodov in sredstev za konzerviranje lesa, ki spadajo v **skupino 2: sredstva za konzerviranje**.

Uredba opredeljuje vrsto biocidnih proizvodov, ki so bili uporabljeni v tej raziskavi, vendar se ne nanaša na njihovo uporabo na lesu, na vrsto izpiranja za testiranje in na mejne vrednosti strupenosti.

3 EKOTOKSIKOLOŠKE OCENE NA LESNIH PLOŠČAH, KI SO BILE TERMIČNO OBDELANE ALI IMPREGNIRANE

Strategija preizkušanja, uporabljena v tej raziskavi, sloni na različnih stopnjah biološke obremenitve tako, da usmerja proces ocenjevanja sprejemljivosti učinkov zaščitnih obdelav lesa (tako fizikalnih kot kemijskih) v primeru, ko je lesni material izpostavljen vodnemu okolju (morskemu in sladkovodnemu okolju). Izmerili smo zlasti učinke, ki jih te obdelave lahko imajo na živalske in rastlinske organizme glede na sproščanje potencialno strupenih snovi, ki so prisotne v predlaganih impregnacijskih sredstvih (npr. baker, amin) in naravno prisotne v lesu iglavcev (npr. terpeni, polifenoli, lignin). V ta namen smo združili izkušnje, ki so jih italijanski partnerji pridobili na področju vodne ekotoksikologije in so jih že uspešno uporabili pri ocenjevanju obdelanega lesa v Beneški laguni z namenom njihovega čezmejnega usklajevanja. Partner UNIVE je opravil laboratorijske teste akutne, subkronične in kronične ekotoksičnosti na organizmih, ki pripadajo različnim deblom in imajo različne trofične strategije, z uporabo niza preskusov, ki so bili že temeljito preverjeni v Beneški laguni, ter novega niza testov za sladko vodo. Partner CNR-ISMAR je izvedel laboratorijske teste izpostavljenosti in je z uporabo pristopa biomarkerjev ocenil presnovne, celične in fiziološke spremembe pri morskih in sladkovodnih nevretenčarjev, kot so školjke in polži. Partner OGS pa je v mikrokozmosu proučil spremembe v sestavi planktonskih združb, ki so naravno prisotne v vodi, ter morebitne zaviralne učinke obdelanega ali modificiranega lesenega materiala na tvorbo mikrobnega biofilma.

3.1 Aktivnosti, ki jih je izvedel partner UNIVE

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

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

ITS postopek za sladkovodno okolje je predvidel primerjanje obdelanih vzorcev z neobdelanim (NTC), s posebnim poudarkom na oceni toplotno modificiranih vzorcev lesne vrste *Picea abies* (TM) in vzorcev, obdelanih s Silvanolinom za uporabo na prostem, brez stika s tlemi (S-UC3) (0,25 % koncentracija CU v raztopini).

Iz testov TIER I izhaja, da je glede na sprejeta merila za ITS ocenjevanje za sladko vodo le obdelava TM imela enake ali celo nižje toksične učinke kot neobdelani les (NTC). Ugotovljeno pa je bilo, da obdelava S-UC3 ni prijazna do vodnega okolja zaradi visoke akutne strupenosti na bakterije, alge in rakce ne glede na čas predhodne izpostavljenosti. Pridobljeni rezultati prvostopenjske ocene so pokazali, da je samo TM primerna za drugo fazo ocenjevanja. Na podlagi rezultatov na stopnji TIER II smo lahko ugotovili, da je obdelava TM primerna za oceno tretje stopnje. Kljub temu so tudi splošni učinki izpirka neobdelanega preizkušanca (NTC) pri končni točki razpočenja ovojnice pri polžu *L. auricularia* pokazali potrebo po času predhodne izpostavljenosti, daljšem od 15 dni, s čimer je mogoče odpraviti toksični učinek izpirka na razvoj ličink. Na podlagi splošnih rezultatov kroničnih testov tretje stopnje na školjke *L. auricularia* in rakce *Daphnia magna* je jasno razvidno, da ima obdelava TM enake učinke na oba vodna indikatorja, uporabljena za neobdelan les (NTC). Predvsem iz rezultatov testov o razmnoževanju *D. magna* je bilo jasno ugotovljeno, da je treba pred uporabo materiala zagotoviti minimalni 15-dnevni čas predhodne izpostavljenosti, s čimer zajezimo vpliv na sladkovodno okolje. Po predlagani oceni ITS je bilo tako ugotovljeno, da je obdelava

TM okolju prijazna, saj niti pri daljši izpostavitvi ne povzroča dodatnega tveganja za okolje.

Podrobnejše informacije o eksperimentalnem načrtu in pridobljenih rezultatih dobite v poročilih aktivnosti 14 in 15.

3.2 Aktivnosti, ki jih je izvedel partner CNR-ISMAR

V sklopu aktivnosti, namenjene ocenjevanju okoljske združljivosti kemijskih ali fizikalnih obdelav, ki so bile nanese na lesene plošče vrste *Picea abies*, je ekipa raziskovalnega centra CNR-ISMAR opravila dva posebna laboratorijska preskusa z uporabo bioindikatorskih organizmov, ki so bili izpostavljeni različno obdelanim ploščam in na katere je bila opredeljena skupina biomarkerjev. Ta izraz označuje vse biokemijske, celične, fiziološke in vedenjske spremembe, ki jih je mogoče izmeriti na ravni organizma potem, ko je bil izpostavljen biološkemu stresu. Biološki odzivi, ugotovljeni v organizmiških pokazateljih, omogočajo, da se z opisom zdravstvenega stanja osebkov celostno oceni kakovost ekosistema, katerega del so živali same.

Pri testiranju v slani vodi so bili kot bioindikatorski organizmi uporabljeni školjke vrste *Mytilus galloprovincialis* in polži vrste *Steromphala albida*, pri preskušanju v sladki vodi pa školjke vrste *Dreissena polymorpha* in polži vrste *Theodoxus fluviatilis*. V obeh preskusih smo bioindikatorske organizme pustili 4 tedne v bazenih v polstatičnih pogojih in pri naslednjih testnih pogojih:

- test v morski vodi: kontrolni pogoj (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);
- test v sladki vodi: kontrolni pogoj (brez lesenih plošč), NTC (neobdelane lesene plošče), TM (toplotno 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. Med testiranjem smo iz vseh bazenov tedensko odvzeli vodne vzorce, da bi analizirali morebiten izpust 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 *M. galloprovincialis* smo z izvedbo testa mikrojedov ovrednotili tudi morebitne genotoksične učinke. Fiziološki odziv smo pri školjkah proučili s testom sposobnosti preživetja na zraku in indeksom stanja, pri polžih *S. albida* pa smo ocenili vedenjsko končno točko z izvedbo testa prevračanja (flipping test).

Iz rezultatov testov izpostavljenosti morski vodi je bilo ugotovljeno, da so plošče, zaščitene s Silvanolinom UC5, pokazale najvišjo stopnjo strupenosti tako pri školjkah kot pri polžih ter beležile 100 % smrtnost obeh vrst že nekaj dni po začetku preskusa. Na podlagi rezultatov vseh analiz biomarkerjev, opravljenih na obeh vrstah kazalnikov, pa je bilo mogoče izključiti prisotnost toksičnih učinkov, ki bi jih lahko pripisali neobdelanim ploščam NTC in ploščam, obdelanim s S-Low. Zabeležen strupeni učinek pri testnem pogojju S-UC5 je v skladu z izmerjeno koncentracijo bakra v vodi, ki je po 2 in

8 dneh izpostavljenosti presešla vrednosti 200 in 400 ppb, pri vseh drugih testnih pogojih pa je bila koncentracija v času trajanja preiskave nižja od 50 ppb.

Rezultati preskušanja v sladki vodi so pokazali, da so se plošče, obdelane z raztopino UC3, izkazale za najbolj toksične; 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 ploščam TM, in vsi kontrolni organizmi (organizmi, izpostavljeni neobdelanim ploščam, in tisti, ki niso bili izpostavljeni nobeni plošči) so preživeli celoten čas preskusa, natančneje školjke 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 posebnih toksičnih učinkov. Biološki odzivi polžev so namreč pokazali nekaj znakov stresa, ki verjetno niso vezani na prisotnost anorganskih spojin, ki so se s plošč sproščale v vodo. Plošče, obdelane s formulacijo S-UC3, so povzročile smrtnost vseh polžev, pri školjkah pa so privedle do fizioloških poškodb, poškodb antioksidativnega obrambnega sistema, kakor tudi do izrazite indukcije metalotioneina. Navedeni odzivi so v skladu z izmerjeno koncentracijo bakra v vodi, ki je po 10 dneh izpostavljenosti presešla vrednost 200 ppb, pri vseh drugih testnih pogojih pa je bila koncentracija v času trajanja preiskave nižja od 8 ppb.

Podrobnejše informacije o eksperimentalnem načrtu in pridobljenih rezultatih dobite v poročilih aktivnosti 18 in 19.

3.3 Aktivnosti, ki jih je izvedel partner OGS

Ekipa raziskovalne ustanove OGS je opravila dva preskusa za proučevanje:

- strupenega učinka lesnih vzorcev, obdelanih z 1. impregnacijskimi sredstvi novejšje generacije (Silvanolin UC5 in MAR); 2. izdelki, že prisotni na trgu (CCB, na osnovi bakra, kroma in bora); 3. termično modificiranim lesom na naravne planktonske združbe;
- zaviralnega učinka na razvoj mikrobnega biofilma na površini lesnega materiala, obdelanega z različnimi postopki.

Da bi ocenili strupeni učinek zaščitnih obdelav na naravne planktonske združbe, smo morsko vodo, odvzeto iz gradeške lagune, prenesli v 14 akvarijev s termostatsko komoro, v katere smo namestili lesene vzorce (*Abies alba* - bela jelka), zaščitene z različnimi postopki. Med 12-dnevnem preizkušanju smo spremljali različne parametre (anorganska makrohranila, raztopljen organski dušik, težke kovine, fototrofne in heterotrofne mikroorganizme) na začetku, po 3 dneh in na koncu testnega obdobja.

Iz rezultatov izhaja, da na fototrofne mikroorganizme močno vpliva sproščanje snovi iz lesenih vzorcev, zaščiteneh tako s Silvanolinom (S-UC5 in S-MAR) kot s sredstvom CCB; te snovi so se med trajanjem preiskave številčno zmanjšale, v nekaterih primerih pa so že po 3 dneh (T1) v celoti izginile. Nasprotno, heterotrofni mikrorganizmi so hitro prevladali, sprva heterotrofne bakterije, pozneje nanoflagelati, obe vrsti pa sta bili najštevilčnejši v akvarijih z lesom, zaščitnim z raztopinama Silvanolin in CCB.

Izkazalo se je, da obe kemijski obdelavi povročita negativni ekološki učinek na lagunske planktonske združbe, ki je bil izrazitejši pri Silvanolinu kot pri sredstvu CCB.

Da bi ocenili zaviralni učinek na razvoj mikrobnega biofilma na površini lesnega materiala, obdelanega z različnimi postopki, smo na dveh območjih Gradeške lagune z različno hidrodinamiko potopili ustrezno obdelane vzorce bele jelke in navadne smreke ter jih odvzeli po 6, 20 in 40 dneh z namenom, da bi z različnimi mikroskopskimi tehnikami ugotovili kratko-, srednje- in dolgoročne učinke na številčnost in sestavo združbe mikroalg. Proučili smo tudi številčnost in sestavo prve stopnje obraščanja večjih organizmov, kjer je bilo prisotno. Rezultati so izpostavili pomen hidrodinamike posameznega območja: ne glede na vrsto uporabljene obdelave se je ob manjši hidrodinamiki pospešil proces nastanka biofilma mikroalg kakor tudi pritrditve večjih organizmov. Ugotovljeno je bilo, da so na obeh območjih in ob različnih hidrodinamičnih pogojih le obdelave s Silvanolinom zavirale pritrditve raznih živalskih taksonov s posledičnim zmanjšanjem živalske raznolikosti; kljub navedenemu to sicer ni preprečilo, da se nekaj vrst v pogojih nizke hidrodinamike ne bi občutno razmnožilo in v celoti prekrilo vzorce. Preizkušana impregnacijska sredstva so tudi povzročila razne spremembe v skupnosti mikroalg; v primerjavi s kontrolnim pogojem je bila namreč opažena prisotnost kremenastih alg manjših velikosti z deformirano frustulo, ki so razvile posebne življenjske strategije premagovanja strupenega učinka, ki ga imajo snovi, vsebovane v impregnacijskih sredstvih. Podrobnejše informacije o eksperimentalnem načrtu in pridobljenih rezultatih dobite v poročilih aktivnosti 16 in 17.

4. RAZPRAVA

V preglednici 6 je prikazana celostna analiza rezultatov preizkušanja, opravljenega za proučevanje morebitne toksičnosti različnih vrst zaščite lesa na okolje, s katerimi so bili obdelani preizkušanci (vzorci in plošče), izpostavljeni morski vodi.

Obdelava TM ni imela toksičnih učinkov na nobenega od modelnih organizmov, uporabljenih v preskusih akutne strupenosti 1. stopnje niti v testih akutne strupenosti 2. in 3. stopnje, s katerimi je mogoče ugotoviti škodljive učinke na ličinke mehkužcev in rakov ter na življenjski cikel raka *Acartia tonsa*. Na ekološki ravni v planktonski skupnosti, ki je bila izpostavljena tem vzorcem, ni bil ugotovljen noben znak stresa, prav tako ni prišlo do zaviranja mikrobnega biofilma na njihovi površini. Ugotovljeni odzivi so bili v glavnem enaki tistim pri testnih organizmih, izpostavljenih neobdelanim vzorcem (NTC), kjer analize biomarkerjev na školjkah in polžih niso pokazale nobenega znaka obremenitve.

Prav tako noben poseben znak poškodb ni bil beležen pri testih toksičnosti, opravljenih na vzorcih, obdelanih s formulacijo S-Low, ki vsebuje 0,033 % koncentracijo bakra. Ta rezultat je bil potrjen tudi z analizo biomarkerjev, določenih v školjkah in polžih, ter z ekološkimi analizami na planktonske in mikrobne združbe.

Preglednica 6 - Celostna ekotoksikološka ocena kemijskih in fizikalnih obdelav, ki so bile nanese na lesene vzorce, izpostavljene morski vodi. Legenda: Rdeča = prisotnost strupenih učinkov; Zelena = brez toksičnih učinkov n.d = testi niso bili izvedeni

Partner	Test	C	NTC	TM	S-Low	S-MAR	S-UC5	CCB
UNIVE	Tier1 - Akutna strupenost izpirkov pri času 0 in po 15 in 30 dneh predhodne izpostavljenosti							n.d.
	Tier2 - Strupenost izpirkov za larvalne stopnje po 30 dneh predhodne izpostavljenosti					n.d.	n.d.	n.d.
	Tier3 - Kronična strupenost izpirkov po 30 dneh predhodne izpostavljenosti					n.d.	n.d.	n.d.
CNR-ISMAR	Biomarkerji, določeni v školjkah			n.d.		n.d.		n.d.
	Biomarkerji, določeni v polžih			n.d.		n.d.		n.d.
OGS	Strupenost za naravne planktonske združbe				n.d.			
	Zaviranje razvoja mikrobnega biofilma				n.d.			

Obdelava vzorcev lesa s pripravkoma S-UC5 in S-MAR, ki vsebujeta 1 % oziroma 0,25 % bakra, pa je povzročila akutno toksičnost že pri preskusih stopnje 1 in zato ni bila primerna za preskuse na stopnji 2 in 3. Izraziti znaki stresa so se pokazali tudi pri analizi biomarkerjev, ki je bila opravljena na školjkah in polžih, izpostavljenih vzorcem, obdelanim s pripravkom S-UC5, medtem ko formulacija S-MAR ni bila testirana z uporabo biomarkerjev. Analize, opravljene na planktonski in mikrobnih združbi, so prav tako potrdile visoko toksičnost obeh formulacij in zaščitnega sredstva CCB.

Škodljive učinke na morske organizme bi lahko pripisali sproščanju CU, vsebovanega v Silvanolinu, v morsko vodo, ki je bil za testne organizme škodljiv. Zlasti kemijske analize, ki jih je skupina ISMAR opravila v vodi, uporabljeni za preskuse izpostavljenosti, so pokazale, da je bila koncentracija Cu v vodi posod z vzorci, obdelanimi s pripravkoma S-UC5 in S-Low, višja od tiste v akvarijih z neobdelanimi kontrolnimi vzorci. Vrednost koncentracije se je v prvem tednu preizkušanja narasla, nato se je v nadaljnjih tednih znižala. Tudi kemijske analize, ki jih je opravila skupina OGS, so potrdile sproščanje bakra v vodi testnih posod z vzorci, obdelanimi s pripravkoma S-UC5 in S-MAR.

V preglednici 7 je prikazana celostna analiza rezultatov preizkušanja, opravljenega za proučevanje morebitne toksičnosti različnih vrst zaščite lesa, s katerimi so bili obdelani vzorci, izpostavljeni sladki vodi.

TM vzorci niso imeli škodljivega učinka na sladkovodne organizme, uporabljene v testih toksičnosti prve, druge in tretje stopnje. Tudi analiza biomarkerjev na školjkah je potrdila odsotnost škodljivih učinkov na to vrst, biološki odzivi, ugotovljeni pri polžih, pa so dali nekaj znakov stresa. Ker kemijske analize vodnih vzorcev v glavnem niso pokazale prisotnosti kovin v posodah z vzorci NTC in TM, bi navedene znake stresa lahko pripisali prisotnosti drugih naravnih komponent iz lesa, ki so se za to vrsto polžev, uporabljeno v preskusu, izkazale za strupene.

Vzorci, obdelani z pripravkom S-UC3 0,25 % bakrove koncentracije, so povzročili strupene učinke na vzorčne vrste, uporabljene že v testih strupenosti prve stopnje, zato nismo nadaljevali s testiranjem druge in tretje stopnje. Ta obdelava se je izkazala za toksično tudi pri analizah biomarkerjev na školjkah in polžih.

Preglednica 7 - Celostna ekotoksikološka ocena kemijskih in fizikalnih obdelav, ki so bile nanese na lesene vzorce, izpostavljene sladki vodi. Legenda: Rdeča = prisotnost strupenih učinkov; Oranžna = blagi strupeni učinki; Zelena = brez toksičnih učinkov; n.d = testi niso bili izvedeni

Partner	Test	C	NTC	TM	S-UC3
UNIVE	Tier1 - Akutna strupenost izpirkov pri času 0 in po 15 in 30 dneh predhodne izpostavljenosti				
	Tier2 - Strupenost izpirkov za larvalne stopnje po 30 dneh predhodne izpostavljenosti				n.d.
	Tier3 - Kronična strupenost izpirkov po 30 dneh predhodne izpostavljenosti				n.d.
CNR-ISMAR	Biomarkerji, določeni v školjkah				
	Biomarkerji, določeni v polžih				

Tudi v tem primeru je toksični učinek na vzorčne organizme mogoče pripisati sproščanju bakra, vsebovanega v Silvanolinu, tudi v sladkovodno okolje. Kemijske analize, ki jih je opravila skupina CNR-ISMAR, so namreč pokazale, da so bile koncentracije bakra v posodah z vzorci, obdelanimi s pripravkom S-UC3, višje od tistih, beleženih v posodah s termično modificiranimi ali neobdelanimi vzorci. Tudi v tem primeru je bilo ugotovljeno postopno naraščanje koncentracije bakra v vodi v prvem tednu, nato so vrednosti med potekom testa začele upadati.

5 ZAKLJUČKI/PRIPOROČILA

Ekotoksikološke preiskave, opravljene z različnimi modelnimi organizmi, izpostavljenimi vzorcem lesa, ki so bili obdelani z različnimi formulacijami impregnacijskega sredstva Silvanolin in/ali termično modificirani, so pokazale, da

- termična modifikacija TM in obdelava s formulacijo S-Low nimata strupenih učinkov, ko so materiali izpostavljeni morski in sladki vodi;
- obdelava s Silvanolinom v formulacijah UC5 in MAR ima strupene učinke pri vzorcih, izpostavljenih morskemu okolju, zato je treba spremeniti protokole o impregnaciji, da se odpravi delež impregnacijskega sredstva, ki se zlahka sprosti pred postavitvijo obdelanega materiala v morsko okolje;
- obdelava s Silvanolinom v formulaciji UC3 ima strupene učinke pri vzorcih, izpostavljenih sladkovodnemu okolju, zato je treba spremeniti protokole o impregnaciji, da se odpravi delež impregnacijskega sredstva, ki se zlahka sprosti pred postavitvijo obdelanega materiala v sladkovodno okolje.

Na podlagi podatkov kemijskih analiz, ki so pokazale sproščanje Cu v testnih posodah le v prvem delu preizkušanja izpostavljenosti, priporočamo, da se pred postavitvijo zaščitene materiala izboljša faza izpiranja/predhodne izpostavljenosti le-tega, da se tako čim bolj zmanjšajo negativni učinki. Testi, ki jih je opravil partner UNIVE, so pokazali, da 30-dnevna predhodna izpostavitve zagotavlja boljše rezultate v vseh fazah ocenjevanja.

Element inovativnosti te raziskave predstavlja uporaba pristopa k okoljski trajnosti in združljivosti obdelanega lesa pri oceni morebitnega učinka na biološko komponento vodnega ekosistema z uporabo celovitega ekotoksikološkega pristopa. Proučili smo materiale, pridobljene z glavnimi metodami zaščite, to sta impregnacija in modifikacija lesa. . Tovrstna ocena je nedvomno inovativna, vendar na evropski ravni ni še dovolj uporabljena in normirana v zvezi s preprečevanjem vplivov na okolje in, posredno, na kakovost življenja v njem živečih živih bitij. Na podlagi navedenega ta študija lahko predstavlja primer postopka ocenjevanja okoljske učinkovitosti lesnega materiala.

NAVEDENI VIRI

Boyle T.P., Fairchild J.F., 1997. The role of mesocosm studies in ecological risk analysis. *Ecological Applications*, 7: 1099–1102.

Caquet, T. (2013). Aquatic Mesocosms in Ecotoxicology. In: Férard, JF., Blaise, C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2_10

C. Blaise and F. Gagné, 2009. Bioassays and biomarkers, two pillars of Ecotoxicology: past, present and prospective uses. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18: 135–139.

Regoli F., 2001. Monitoraggio della contaminazione chimica: ecotossicologia e biomarker. Recupero ambientale, a cura di R. Danovaro, UTET libreria, str. 189–222.

CEN (2013). EN 335-1-Classification of hazard classes. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.

ECHA, 2013. Guidance on information requirements. Guidance on regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products (BPR) Version 1.0 July 2013 ECHA-13-G-04-EN, ISBN 978-92-9244-014-5, str. 225.

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

Prispevali so k aktivnostim projekta:

Daniele Cassin (CNR-ISMAR)
Francesco Acri (CNR-ISMAR)
Andrea Pesce (CNR-ISMAR)
Stefano Pasqual (CNR-ISMAR)
Irene Guarneri (CNR-ISMAR)

Marco Baccichet (UNIVE)
Marco Brino (UNIVE)
Gabriele Capodaglio (UNIVE)
Gabriele Giuseppe Distefano (UNIVE)
Chiara Licata (UNIVE)
Davide Marchetto (UNIVE)
Martina Russo (UNIVE)
Elisa Scalabrin (UNIVE)

Cecilia Balestra (OGS)
Federica Camisa (OGS)
Mauro Celussi (OGS)
Federica Cerino (OGS)
Edvino Cociancich (OGS)
Tommaso Diociaiuti (OGS)
Elena Di Poi (OGS)
Daniela Fornasaro (OGS)
Annalisa Franzo (OGS)
Martina Kralj (OGS)
Simonetta Lorenzon (OGS)
Federica Nasi (OGS)
Vanessa Natali (OGS)
Federica Relitti (OGS)
Gianluca Zazo (OGS)

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

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