

Istituto superiore per la Ricerca e la
Protezione Ambientale



Ministero del Lavoro, Salute e
Politiche Sociali

In collaborazione con:

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

Ministero dello Sviluppo Economico

Istituto Superiore di Sanità

IDENTIFICAZIONE E VALUTAZIONE DEL PERICOLO PER L'AMBIENTE

Silvia Marchini

ISS

DEFINIZIONI

Identificazione del pericolo

identificare le proprietà intrinseche di una sostanza che la rendono capace di essere assunta e di causare effetti tossici negli organismi esposti ad essa (proprietà fisico chimiche, di destino ambientale e di tossicità di una sostanza)

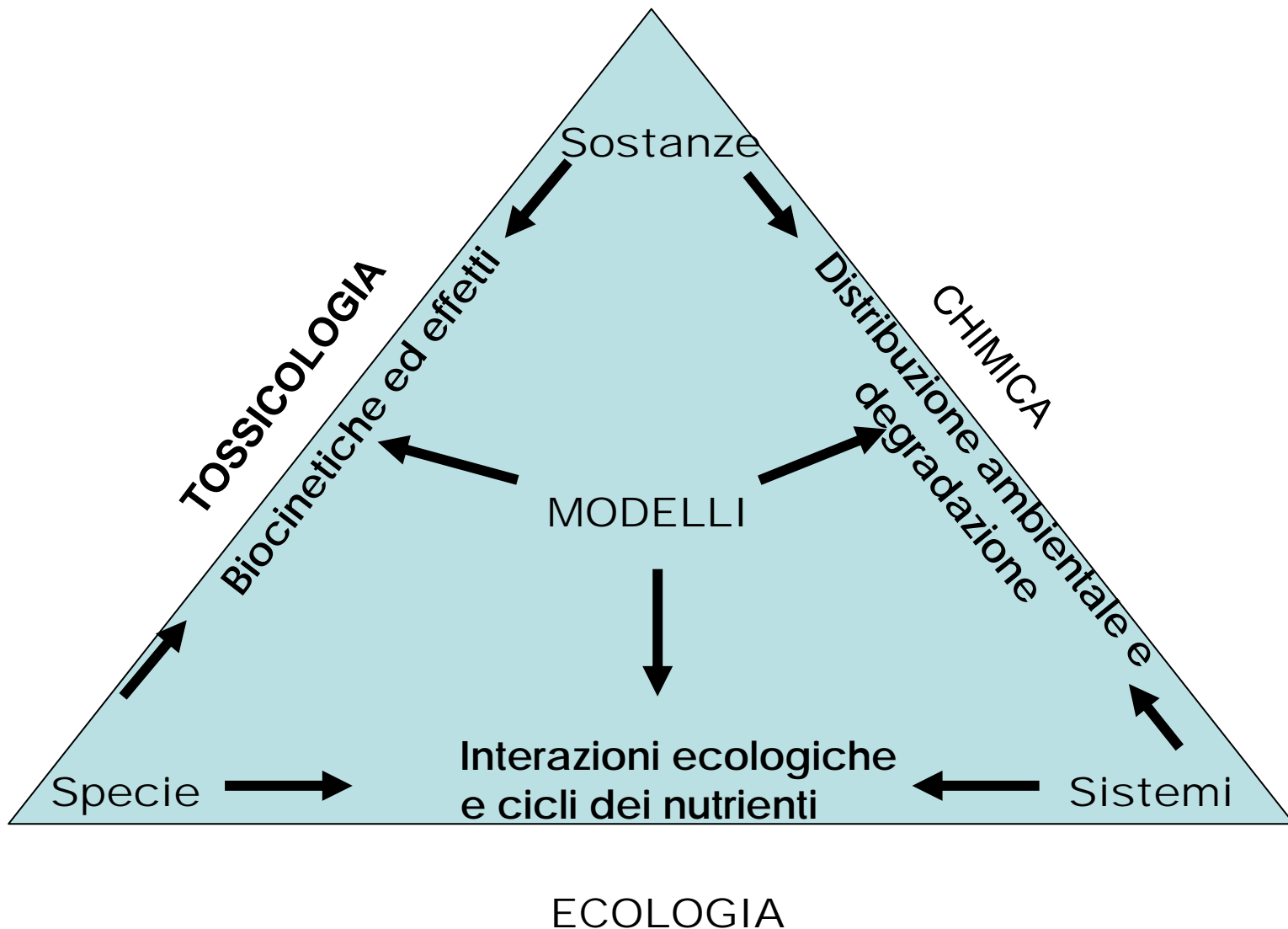
Valutazione del pericolo

caratterizzare la relazione esistente tra la severità degli effetti osservati e i livelli di esposizione alla sostanza (relazioni dose risposta/concentrazione risposta)

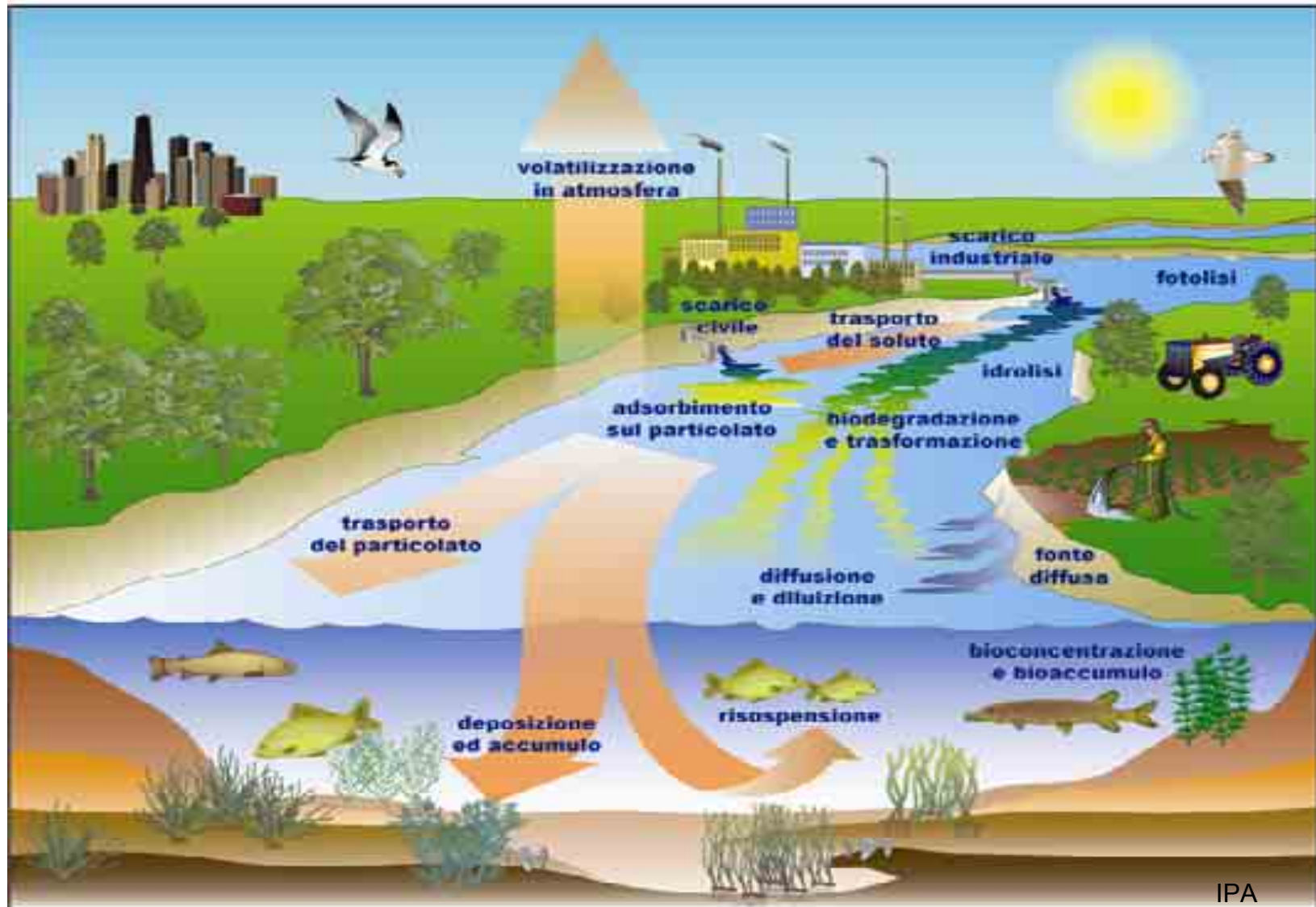
Caratterizzazione del rischio

confrontare l'incidenza e la severità degli effetti con le concentrazioni ambientali predette (stima del rischio per le popolazioni esposte alla sostanza)

ECOTOSSICOLOGIA



DISTRIBUZIONE DI UN CONTAMINANTE NELL'AMBIENTE



STIMA DELL'ESPOSIZIONE

Concentrazione ambientale predetta (PEC)

=

Concentrazione a cui sono esposti gli organismi?

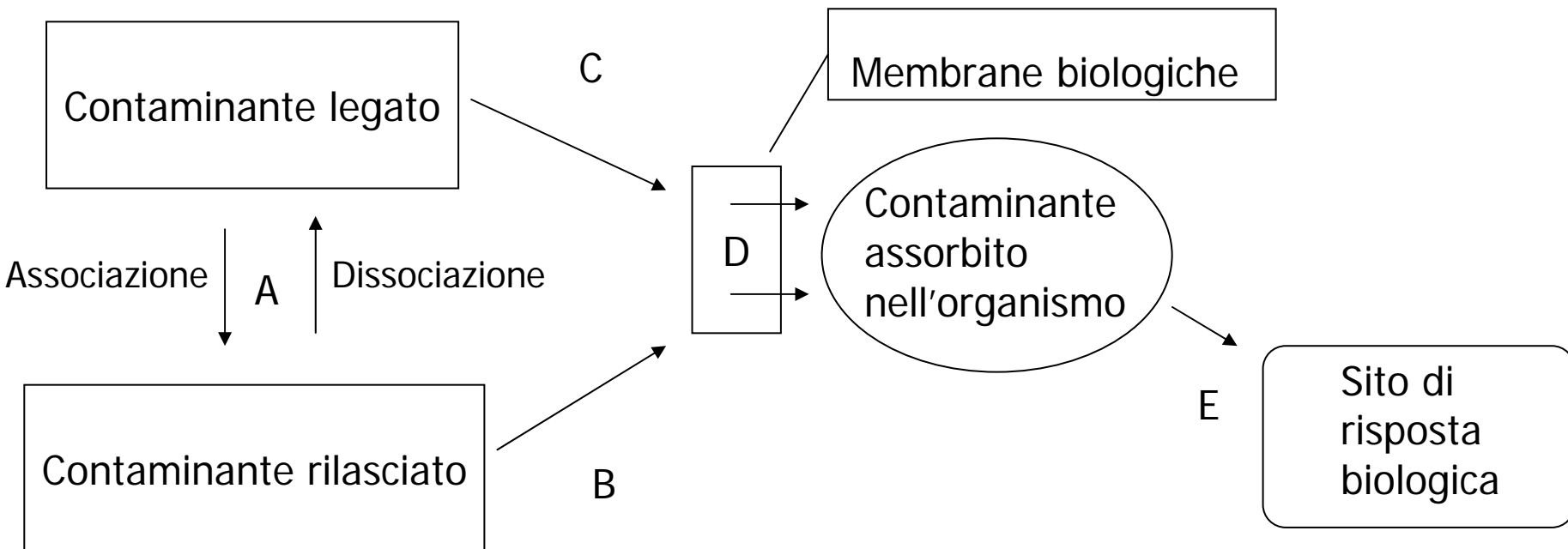
VIE DI ESPOSIZIONE

- Respirazione
- Contatto con le superfici corporee
- Ingestione di sedimento e acqua contaminata
- Consumo di cibo contaminato

BIODISPONIBILITA'

- **Una misura della frazione della sostanza nei media ambientali che è accessibile all'assorbimento da parte di un organismo (ASTM, 1998)**
- **Una misura del potenziale di entrare in contatto (o interagire) con recettori umani o ecologici. E' specifica del recettore, della via di entrata, tempo di esposizione e della matrice che contiene la sostanza. (Anderson et al., 1999, Lanno, 2001)**

PROCESSI DI BIODISPONIBILITA'



Processi di biodisponibilità (A, B, C, and D)

Interazione del contaminante tra le fasi

Trasporto all'organismo

Passaggio attraverso le membrane

Circolazione nell'organismo, accumulo nell'organo bersaglio, tossicocinetica, effetti tossici

FATTORI DI BIODISPONIBILITA'

Sedimenti:

- ripartizione nelle matrici e mobilità della sostanza
- presenza di altre sostanze (AVS, ligandi
- caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua e dei sedimenti
- tipo di organismo
- via di esposizione
- abitudini alimentari
- In laboratorio : raccolta, conservazione e manipolazione

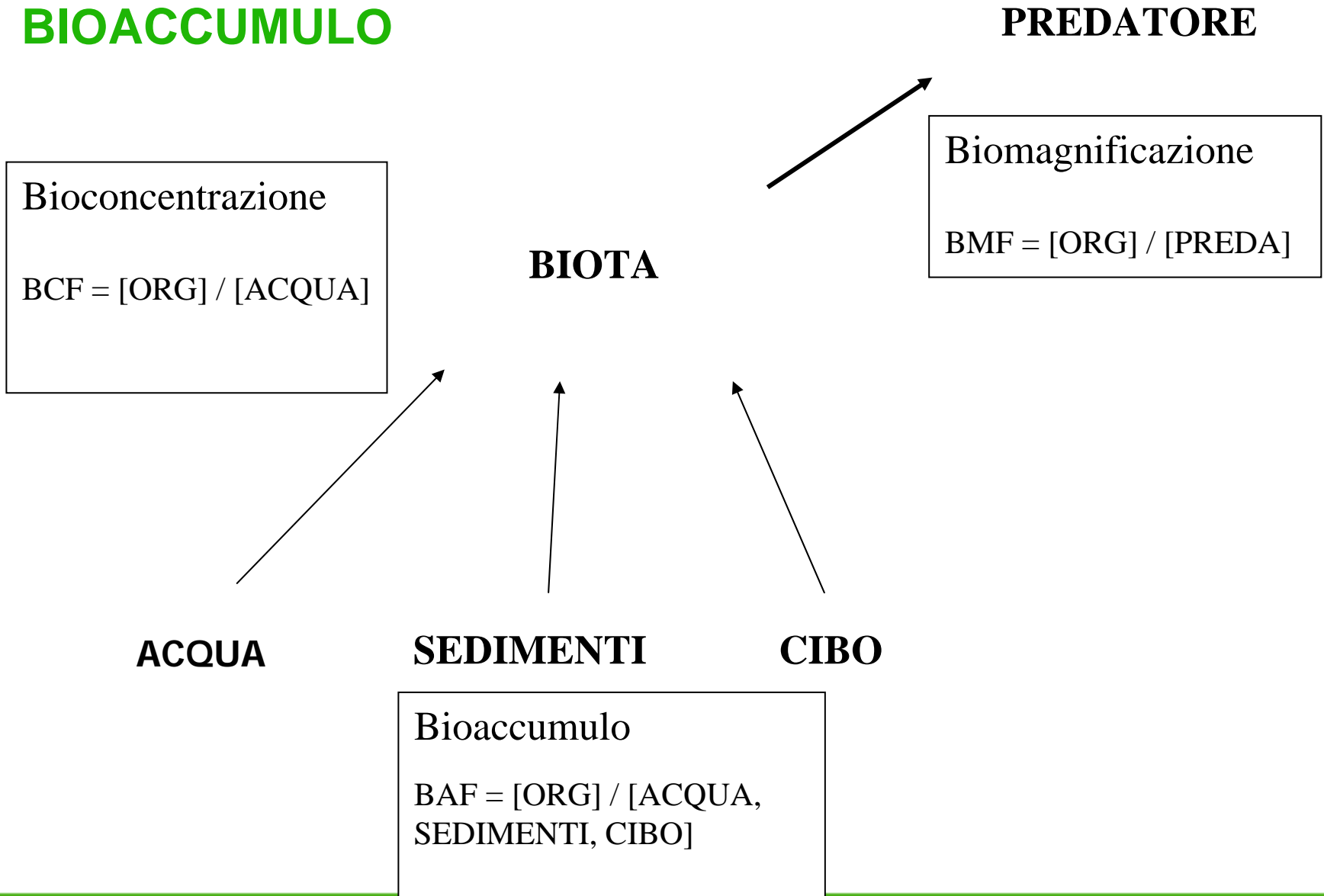
POTENZIALE DI BIOACCUMULO

Lipofilia (Log Kow > 3)

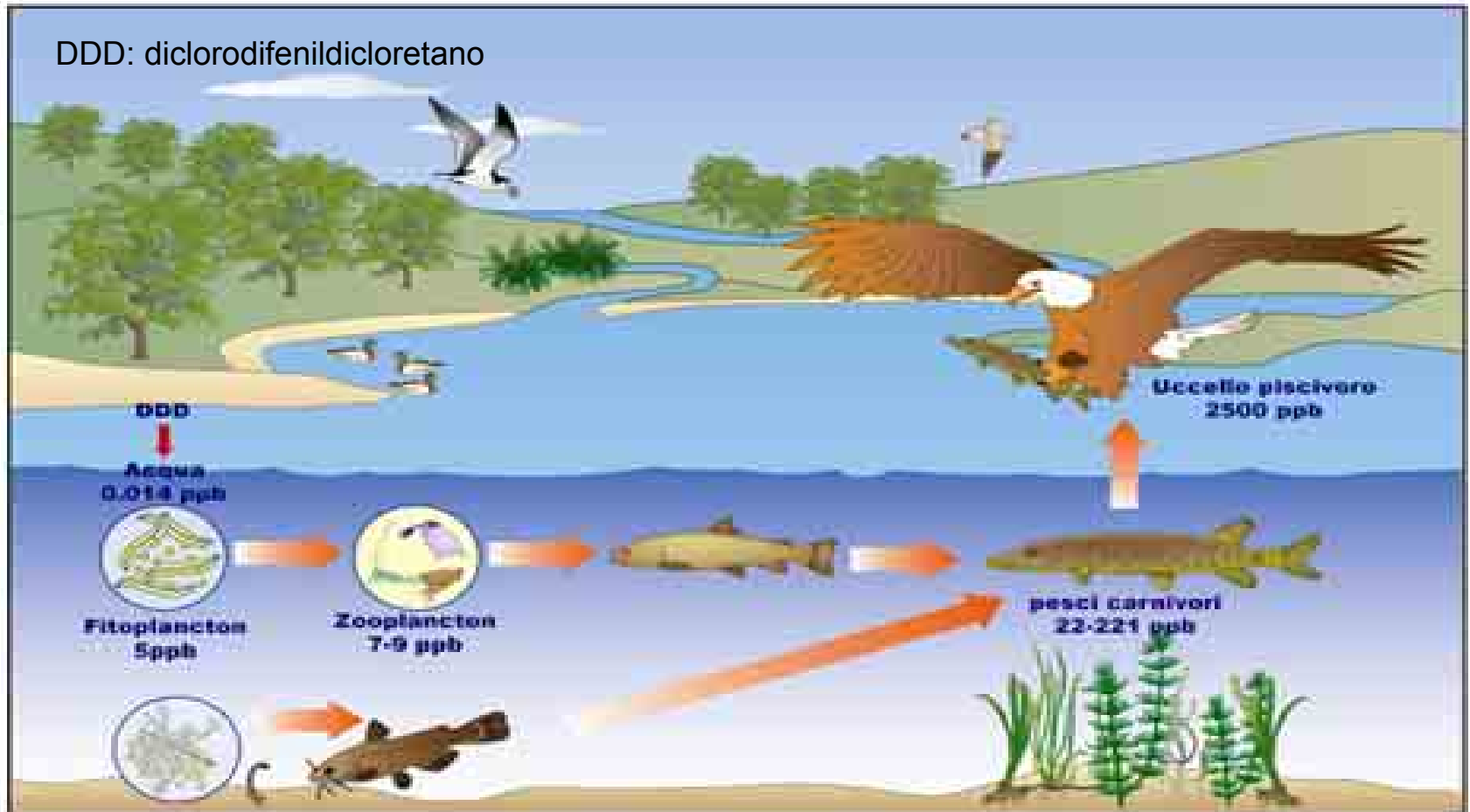
Persistenza ambientale

Lenta eliminazione nell'organismo

BIOACCUMULO



BIOACCUMULO E BIOMAGNIFICAZIONE



VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI AMBIENTALI

Scopo

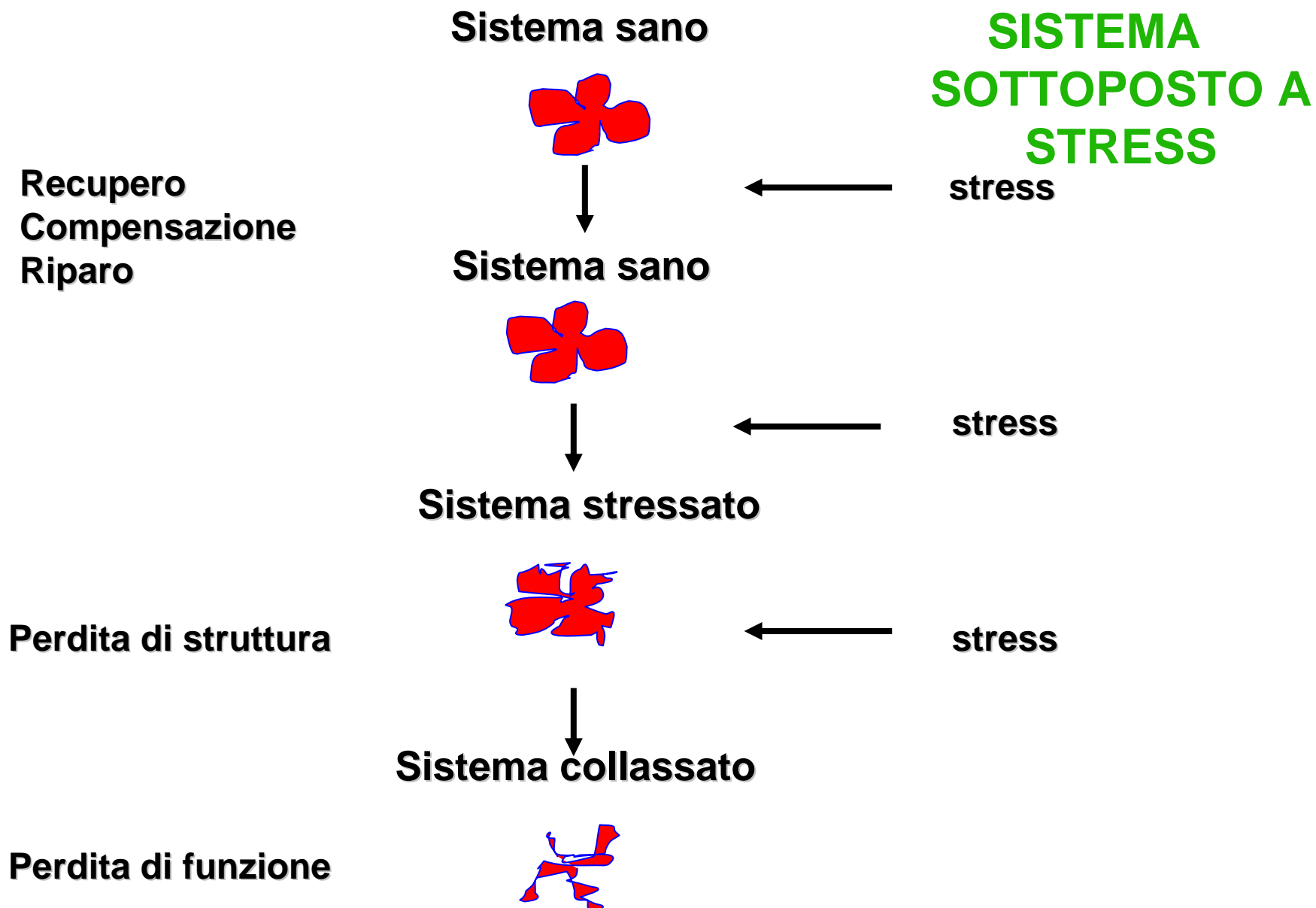
Conservazione della struttura e funzione dell'ecosistema

Assunzioni

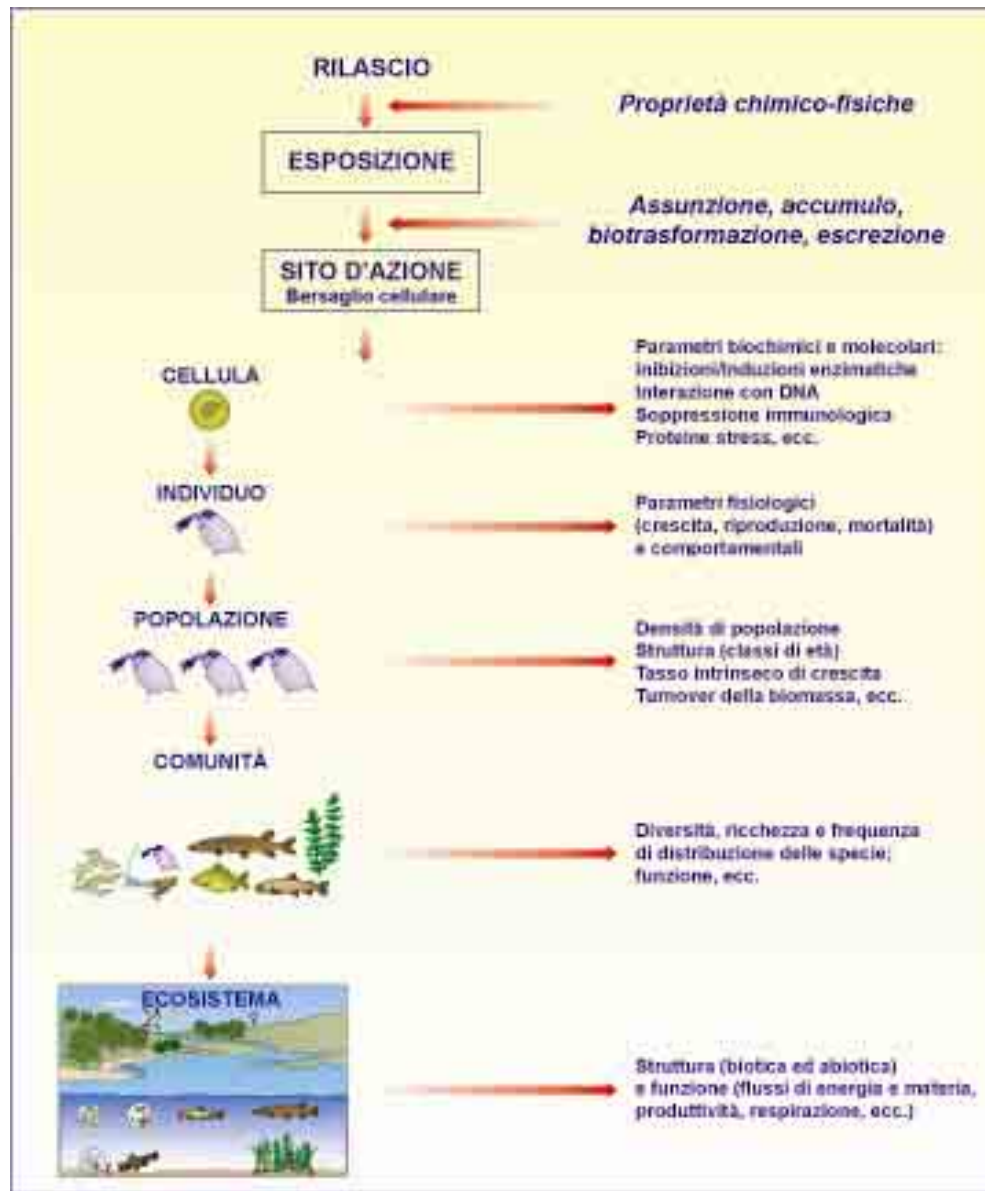
- Proteggere l'ecosistema significa proteggere la sua struttura (specie rappresentative e più sensibili)
- Proteggere la struttura dell'ecosistema vuol dire proteggere la sua funzione

ECOSISTEMA

Entità funzionale costituita da una comunità di esseri viventi e dal loro ambiente fisico e chimico (struttura) che interagiscono strettamente attraverso la circolazione di materia e un flusso continuo di energia (funzione)



Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



RILEVANZA ECOLOGICA

- Effetti esercitati al di sopra del livello di individuo (*p.e.* popolazione, comunità, ecosistema)
- Effetti rilevanti devono presentarsi in condizioni di esposizione realistiche: concentrazioni ambientali, stessa biodisponibilità, stesse dinamiche di esposizione.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI AMBIENTALI

Metodi

Saggi su poche specie rappresentative

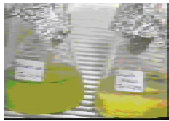


Estrapolazione all'intera biosfera

SCELTA DELL'ORGANISMO TEST

- conoscenza biologica
- facilità/esperienze di allevamento
- ciclo vitale relativamente breve
- importanza nella catena trofica / rappresentatività
- distribuzione ubiquitaria
- sensibilità alle sostanze tossiche
- uniformità/stabilità genetica
- difficoltà di recupero
- probabilità di essere esposto alla matrice ambientale di interesse

- **Ecosistema acquatico**



alghe



macrofite



invertebrati



pesci

- **Ecosistema sedimenti**



crostacei



insetti



nematodi

Altri macroinvertebrati

- **Ecosistema suolo**



invertebrati



piante



batteri

- **Impianti trattamento**



batteri



protozoi

SCELTA DEL TEST

- Idoneità allo scopo e al livello di valutazione del pericolo
- Standardizzazione
- Precisione (riproducibilità)
- Sensibilità
- Risorse disponibili
- Caratteristiche del corpo idrico o effluente
- Semplicità di esecuzione

TEST ACUTO

rapido

effetti letali

concentrazioni letali

facilità di esecuzione

test di screening

TEST CRONICO

prolungato nel tempo *

effetti subletali (e letali)

**concentrazioni subletali
(realistiche)**

relativamente laborioso

rivela effetti ritardati

predice impatto ecologico

DISEGNO SPERIMENTALE

Numero concentrazioni e controlli

Metodo di esposizione

Misure analitiche

Sostanze difficili

.....

ENDPOINT

LC50 (Lethal Concentration 50)

Concentrazione letale per il 50% degli individui di una popolazione (p.e. **96h LC50**)

EC50 (Effect Concentration 50)

Concentrazione che causa un effetto subletale sul 50% degli individui (p.e. **72h ErC50**)

NOEC (No Observed Effect Concentration)

Concentrazione più alta alla quale non si sono **osservati** effetti statisticamente diversi da quelli del controllo (p.e. **28d NOEC crescita**) .(si preferisce **EC10**).

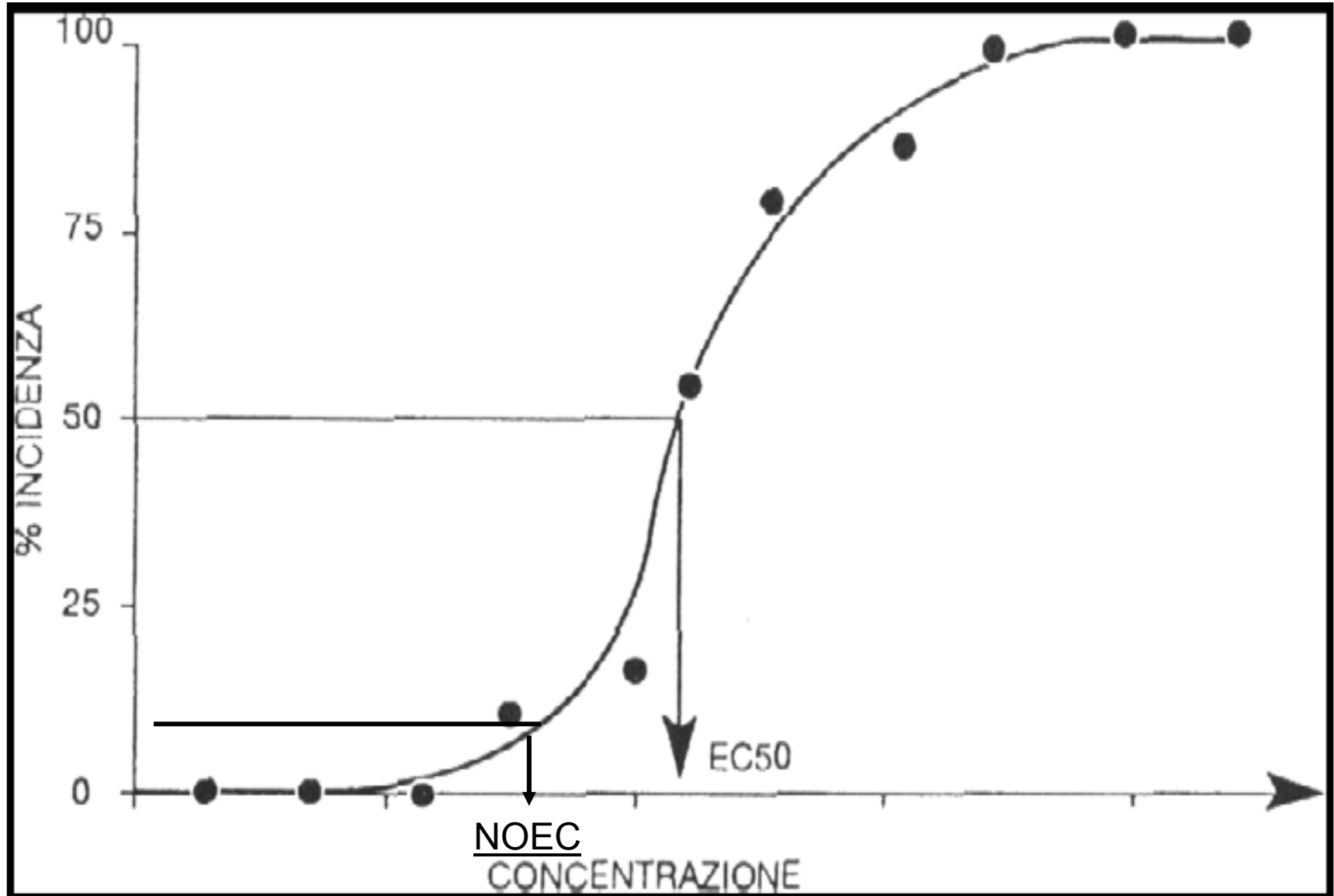
HC5 (Hazardous concentration 5)

Concentrazione che protegge il 95% delle specie

NOEAEC (No Observed Ecological Adverse Effect Concentration)

Concentrazione più alta alla quale non si sono **osservati** effetti ecologici statisticamente diversi da quelli del controllo (si tiene conto del recupero).

Curva concentrazione effetto

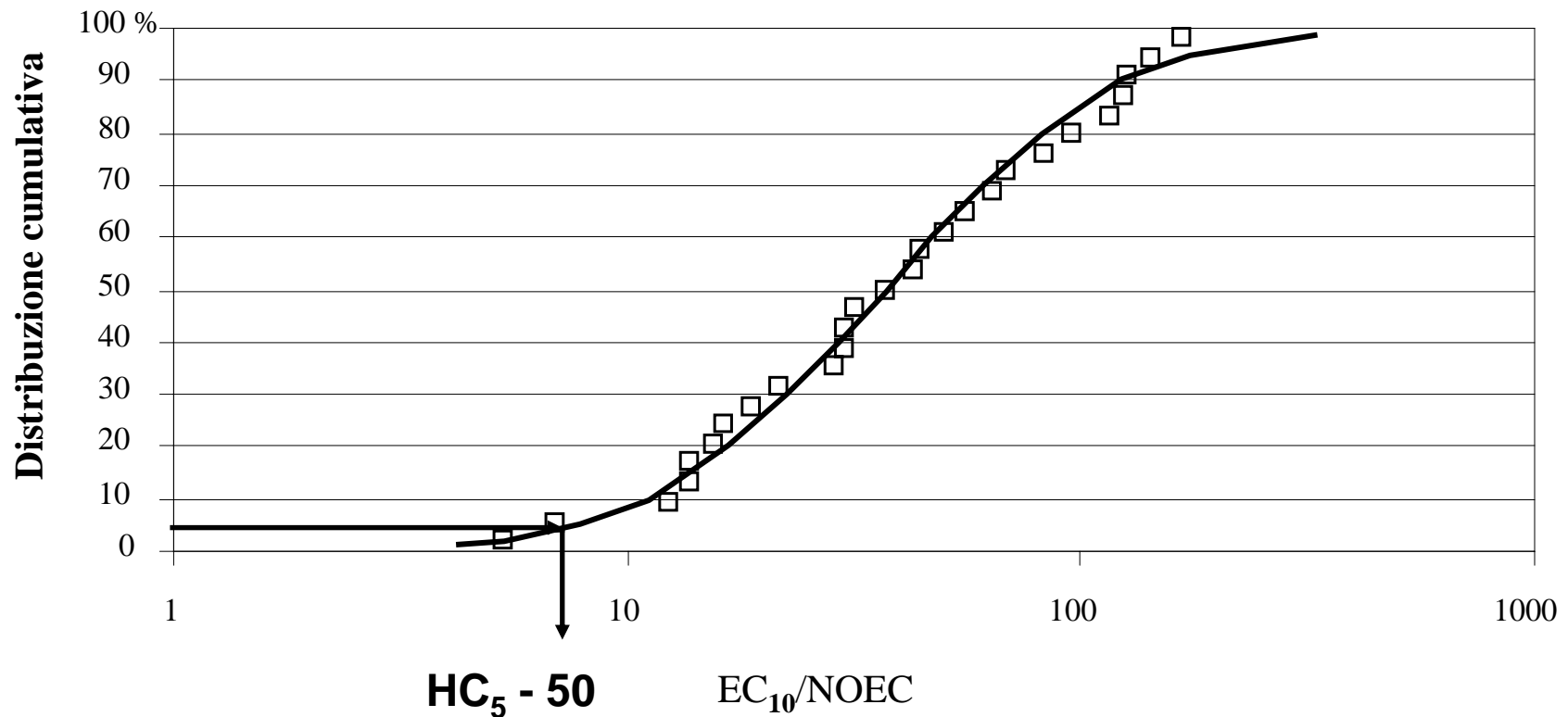


Raggruppamento dati (specie e endpoint)

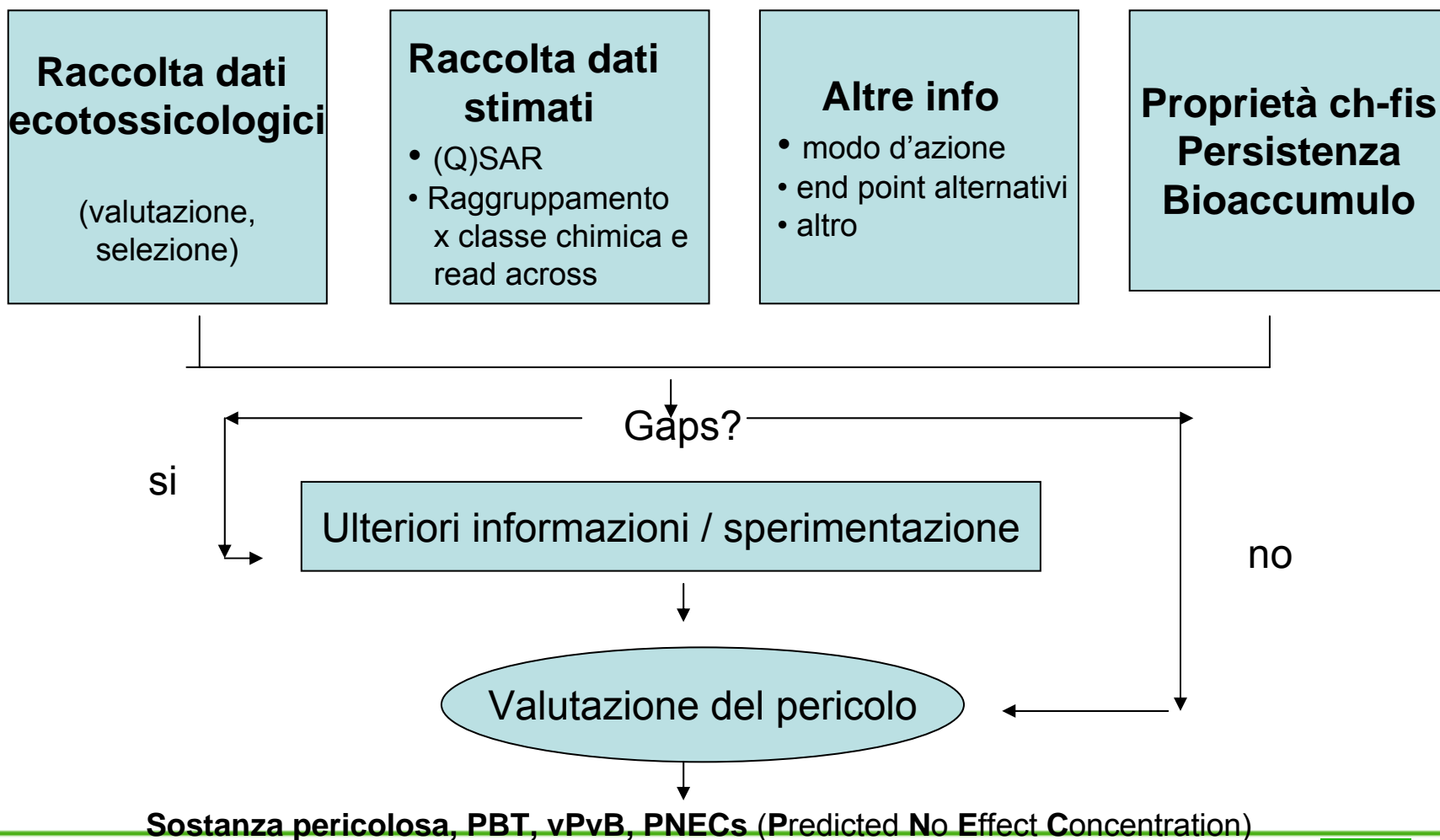
Normalizzazione (parametri fisico-chimici)

Scelta del modello di distribuzione

DERIVAZIONE DELLA HC5



Valutazione del pericolo per l'ambiente (All. VI REACH)



Criteri di qualità dei dati

- **Relevance** (appropriati e utili per una particolare identificazione del pericolo e caratterizzazione del rischio)
- **Reliability** (basati su metodi standard, chiarezza del test report, plausibilità dei risultati, BPL. Punteggio 1-4)
- **Regulatory acceptability** (adeguati agli scopi della valutazione del pericolo e del rischio)

'Solna principles' (OECD 1996a)

Strategie integrate di sperimentazione Test alternativi ?

- **Replace** (sostituire gli animali con materia insensibile)
- **Reduce** (ridurre il numero)
- **Refine** (ridurre le procedure disumane)

I principi delle 3 R - Russel and Burch (1959)

Test alternativi

Test in vitro (non direttamente estrapolabili agli effetti in vivo)

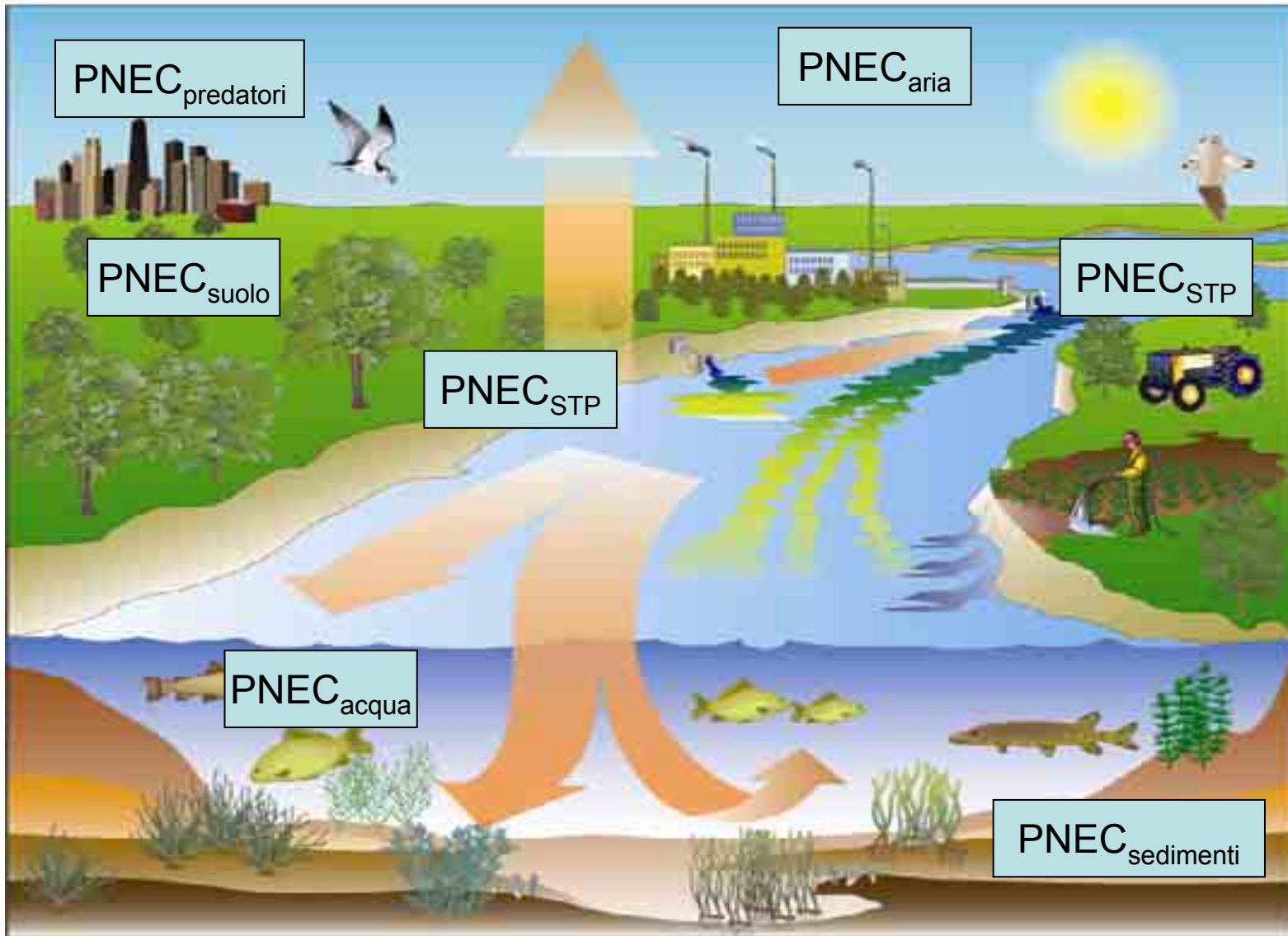
Linee cellulari di pesci (OK per effetti acuti ma mancano di tossicocinetiche realistiche. In corso di validazione)

Test con embrione di pesce (in sostituzione test acuto. Proposta in corso di valutazione OCSE)

Misura di BCF in vitro

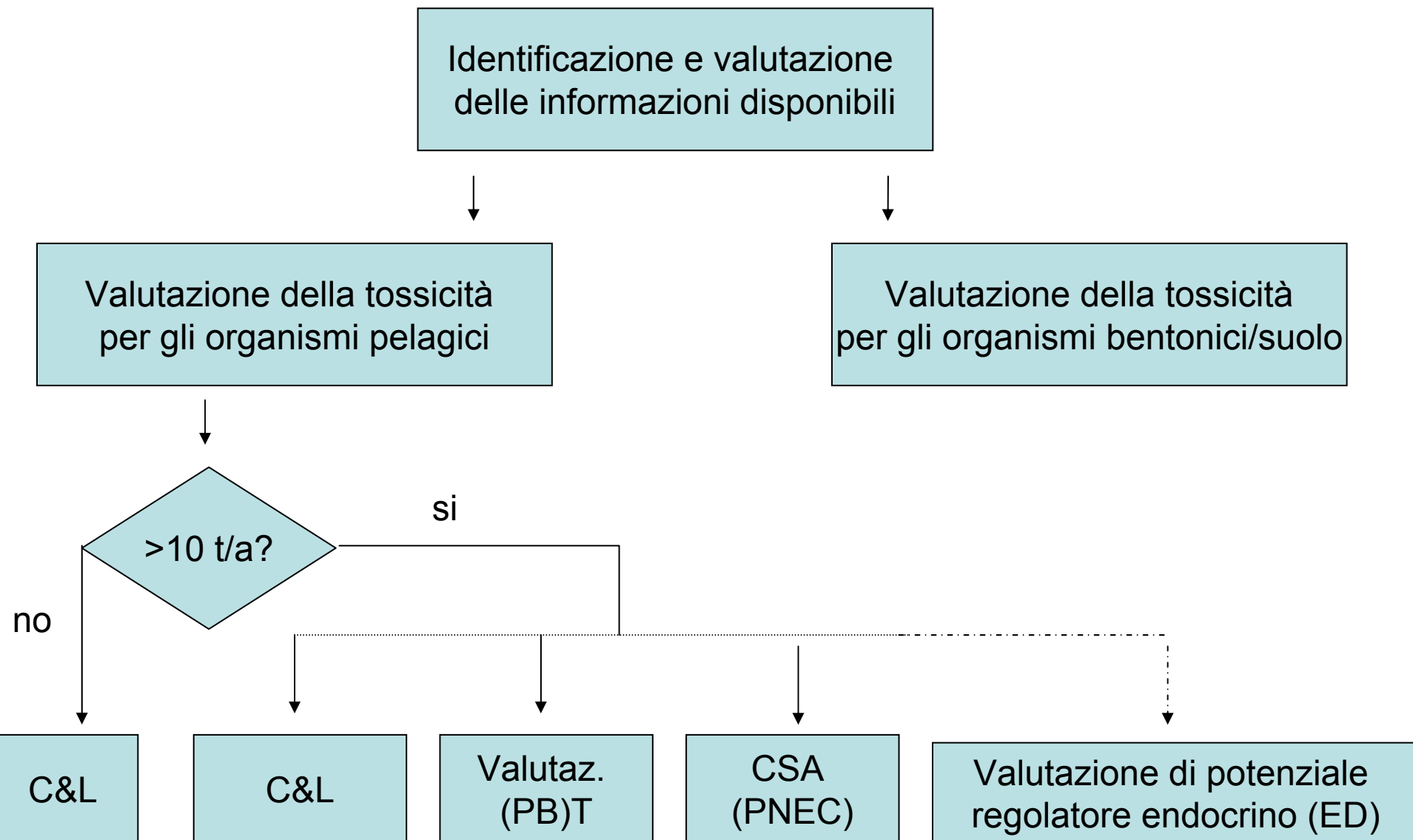
.....

Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

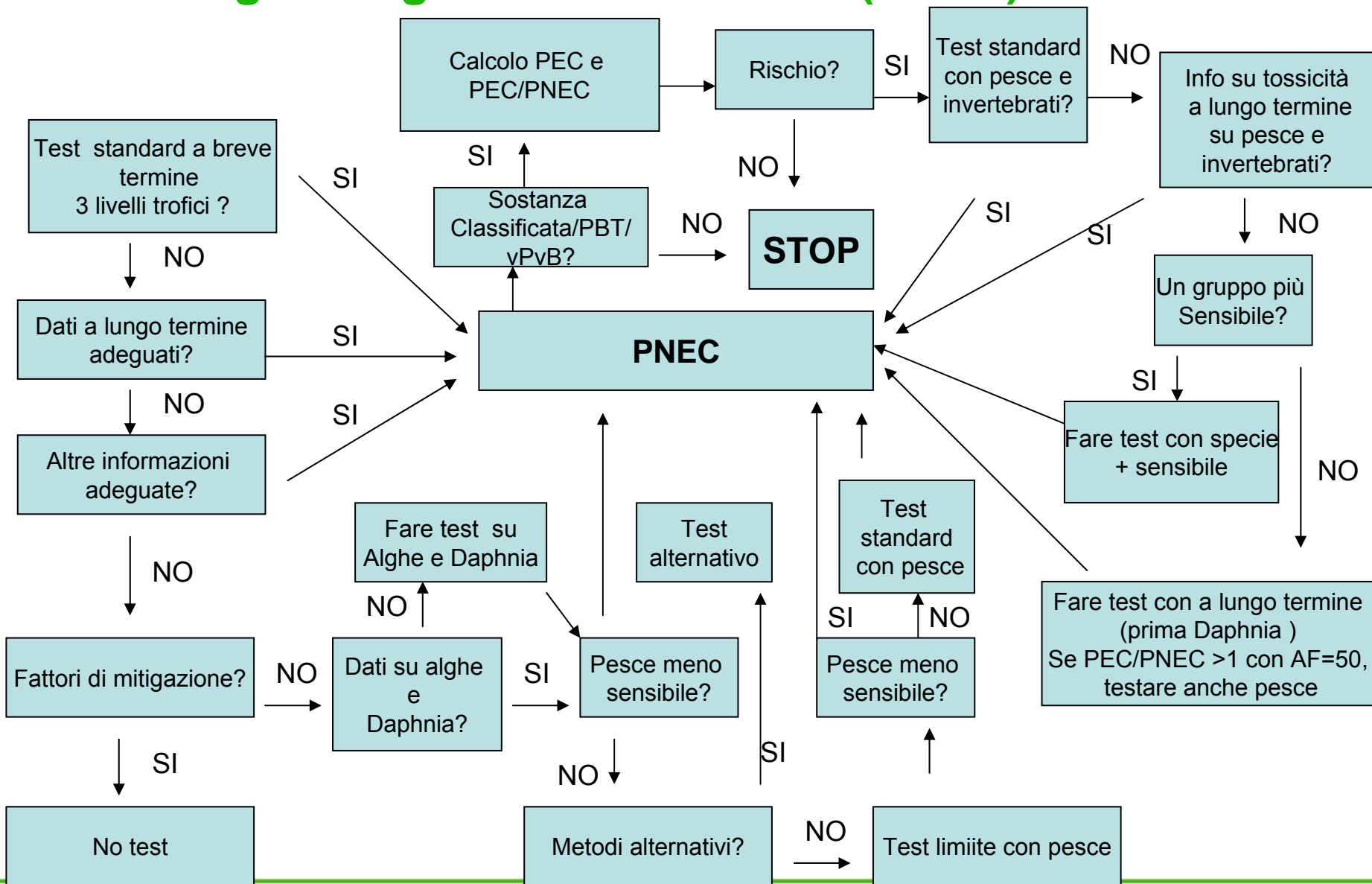


PNEC = Predicted No Effect Concentration (endpoint/AF)

TOSSICITA' ACQUATICA



Strategia integrata di valutazione (PNEC) – R.7b



PESCI- TEST A LUNGO TERMINE

- Fish Early Life Stage (FELS) toxicity test (*OECD 210*)
- Fish short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages (*OECD 212*)
- Fish, juvenile growth test (*OECD 215*)

Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study (OECD 204) - NO!!

PNEC

Pochi dati

(acuti e/o cronici)



Approccio deterministico



EC50 o NOEC (più basso)

e

Fattori di valutazione (AF)



$$\text{PNEC} = \text{EC50/NOEC} : \text{AF}$$

PNEC acqua dolce – Approccio deterministico

Dati disponibili (minimi)	AF *
L(E)C50 a breve termine per ognuno di 3 livelli trofici (pesce, invertebrati – Daphnia e alghe)	1000
EC10/NOEC a lungo termine per un livello trofico (più sensibile, pesce o Daphnia)	100
EC10/ NOEC a lungo termine per 2 livelli trofici (specie più sensibile, pesce e/o Daphnia e/o alghe)	50
EC10/ NOEC a lungo termine per 3 livelli trofici (in genere, pesce, Daphnia e alghe)	10
Dati di campo o da ecosistemi modello (microcosmi, mesocosmi)	Caso specifico

Flessibilità degli AF

- Evidenze da composti strutturalmente simili
- Conoscenza del modo d'azione
- Dati relativi ad ulteriori gruppi tassonomici
- Ulteriori dati sul taxon più sensibile
- Qualità dei test non standard
- Pendenza curva concentrazione-effetto
- Dipendenza della tossicità dal tempo

PNEC

Pochi dati

(acuti e/o cronici)



Approccio deterministico



EC50 o NOEC (più basso)

e

Fattori di valutazione (AF)



PNEC = EC50/NOEC : AF

Molti dati

(≥ 10 NOEC relativi a ≥ 8 taxa*)



Approccio probabilistico



HC5

e

Fattori di valutazione (AF)



PNEC = HC5 : AF

* *Comparto acqua dolce*

Taxa acquatici per l'applicazione dell'approccio probabilistico

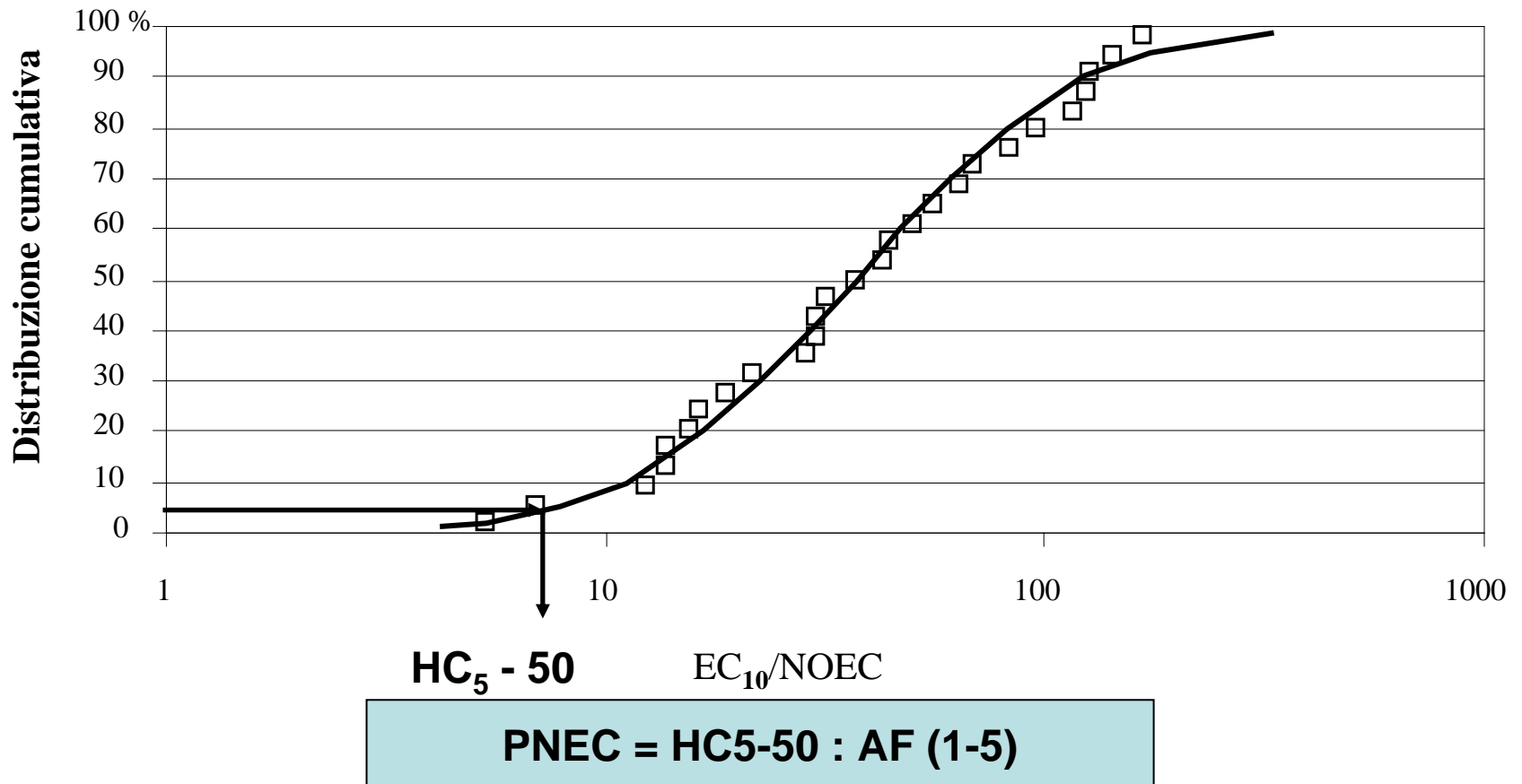
- 1) Pesci (p.e. *O. mykiss*)
- 2) Una seconda famiglia nel phylum Cordati (pesci, anfibi)
- 3) Crostacei (p.e. cladoceri, copepodi, ostracodi, anfipodi)
- 4) Insetti (e.g. zanzara, libellula)
- 5) Una famiglia in un phylum diverso da Artropodi o Cordati (p.e. Rotiferi, Annelidi, Molluschi)
- 6) Una famiglia in un ordine di insetti o qualsiasi phylum non già rappresentato
- 7) Alghe (e.g. *R. subcapitata*)
- 8) Piante superiori (*L. gibba*)

HC5 – Criteri per valutare l'incertezza

- Qualità della base di dati
- Diversità e rappresentatività dei taxa
- Modo d'azione
- Incertezza statistica della stima HC5 (variabilità inter-specie)
- Analisi dei punti che cadono al di sotto dell'HC5
- Confrontabilità delle singole NOEC con dati di mesocosmo/campo
- Influenza del tipo di medium sulla tossicità (variabilità intra-specie)

- Raggruppamento dati (specie e endpoint)
- Normalizzazione (parametri fisico-chimici)
- Scelta del modello di distribuzione

Derivazione della HC5



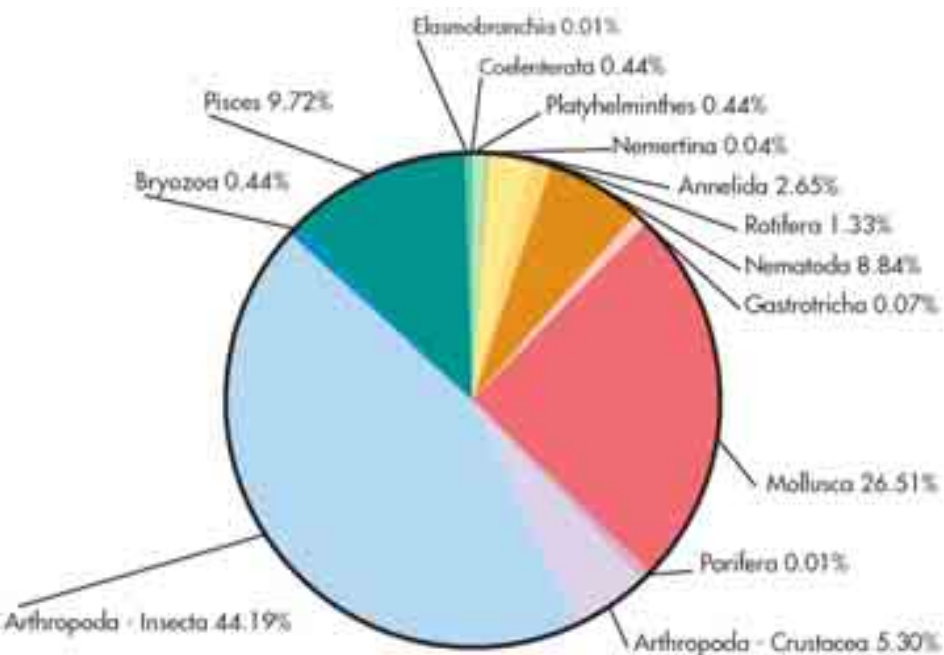
Comparto acquatico - mare

ECETOC Review (2001)

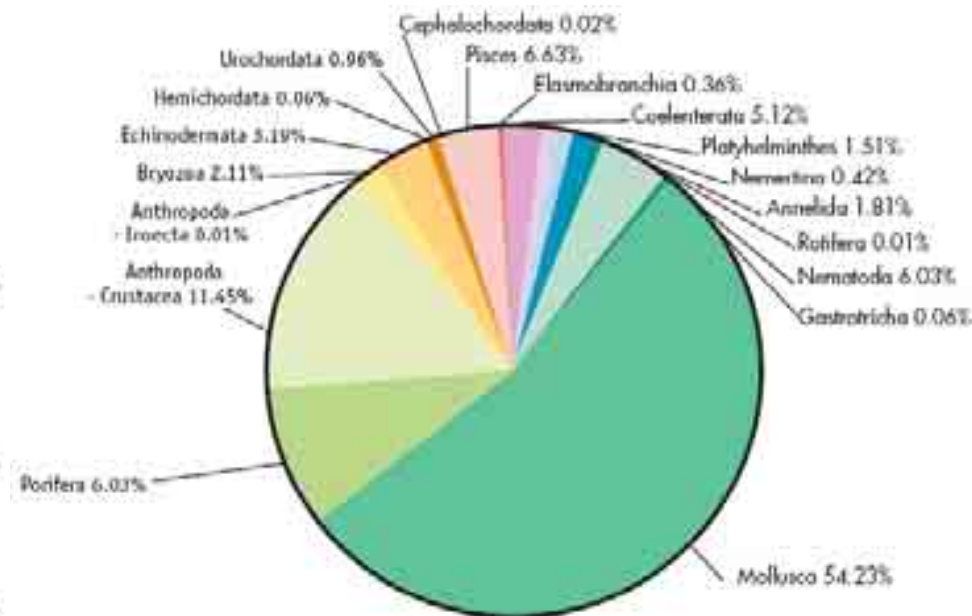
- Sensibilità paragonabile di specie d'acqua dolce e marine
- Dati tossicologici di specie d'acqua dolce possono essere usati al posto o in aggiunta a quelli di specie marine
- Alcuni taxa marini poco o non rappresentati tra gli organismi di acqua dolce (anellidi, molluschi, echinodermi)

Comparto acquatico - mare

Acqua dolce



Mare



SEDIMENTI

Rappresentano l'habitat per molti organismi acquatici

Comparto dove si accumulano molti contaminanti tossici, persistenti e bioaccumulabili

Fonte di contaminanti per la colonna d'acqua

Comparto sedimenti



≥1000 t/a
(Annex X)



tossicità a lungo termine per gli
organismi bentonici (dipende da CSA)

(**insetti, lombrichi**, anfipodi, policheti, nematodi)

ma

a seconda delle evidenze e informazioni (p.e., $\log K_{ow} > 3$, PEC/PNEC basato su
EPM >1, read across, distribuzione/formazione di metaboliti nei sedimenti)

può essere necessario effettuare il test anche a tonnellaggi inferiori

oppure può essere tralasciato

PNEC sedimenti

- **EPM (metodo di ripartizione)**

$$PNEC_{\text{sed (acqua dolce o marina)}} = K_{\text{ss-a}} / RHO_{\text{ss}}^* \times PNEC_{\text{acqua (dolce o marina)}} \times 1000$$

NB: se $\log k_{ow} > 5$ applicare un fattore 10.

- **Approccio deterministico**

- *Approccio probabilistico*

*) densità dei solidi sospesi umidi

PNEC sedimenti - acqua dolce

Dati disponibili (minimi)	AF
LC50 breve termine (≥ 1 dato)*	1000
NOEC or EC10 lungo termine (un dato)	100
NOEC or EC10 lungo termine (due specie con differente habitat ed alimentazione)	50
NOEC or EC10 lungo termine (tre specie con differente habitat ed alimentazione)	10

*)PNEC deve essere calcolato anche con EPM

Weight of evidence

Metalli (p.e. zinco):

- Lento adsorbimento ai sedimenti,
- Rilascio nell'acqua soprastante
- Influenza di velocità di flusso dell'acqua soprastante –
bioturbazione (Fattori di mitigazione)

Micro-organismi negli impianti di trattamento delle acque reflue (STP)

≥ 10 t/a
(Annex VIII)

Test di inibizione della respirazione di fanghi attivi (OECD 209)

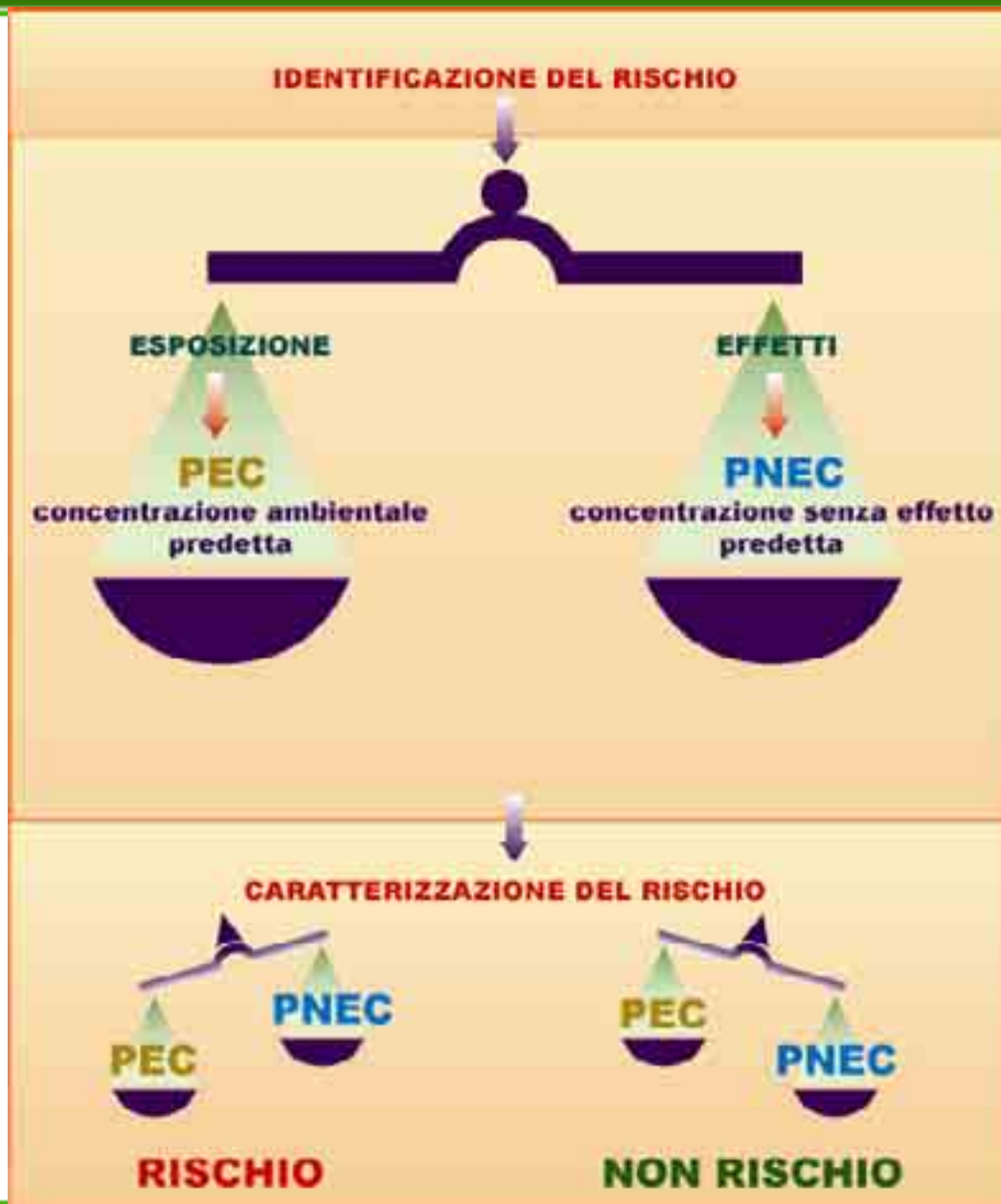
Non necessario se:

Esposizione non prevista o
Esposizione limitata (solubilità in acqua molto bassa) o
Sostanza biodegradabile e PEC < concentrazione testata

PNEC stp civile e industriale

Dati disponibili	AF *
Test di inibizione della respirazione di fanghi attivi (NOEC/EC ₁₀)	10
Test di biodegradabilità (concentrazione senza effetto = NOEC microrg. stp)	10
Test di inibizione di specifiche popolazioni batteriche (batteri nitrificanti, <i>P.putida</i> , protozoi ciliati)	1 (endpoint più sensibile)
Studio di simulazione con fanghi attivi	1-5
Dati di campo	1

Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



Conclusioni

Test ecotossicologici possono essere numerosi e complessi (= costosi)

ma

*con una attenta valutazione del peso dell'evidenza (giudizio esperto) e
strategia integrata di sperimentazione ben mirata*

si può

notevolmente ridurre il carico sperimentale

Impianti di trattamento delle acque reflue (STP)

Non è necessaria sperimentazione in caso di:

- assenza di emissioni
- la sostanza è prontamente biodegradabile e la PEC è inferiore alle concentrazioni sperimentali
- vi sono fattori conservativi quali la bassa solubilità a limitare l'esposizione

Impianti di trattamento delle acque reflue (STP)

Test	Available value	Assessment factor
Respiration inhibition tests EU Annex V C.11; OECD 209 (1984f) ISO 8182 (1988)	NOEC or EC10	10
	EC50	100
Inhibition control in standardised biodegradation tests - Ready biodegradability tests EU Annex V C.4 A-F; OECD 301A-F (1992f) 92/69/EEC C4 (1992) ISO 7827 (1994), -9439 (1999), -10707 (1994), -9408 (1999) - Inherent biodegradability tests EU Annex V C.9; OECD 302 B-C (1981d-1992g) 88/302/EEC (1988) ISO 9888 (1999)	The tested concentration at which toxicity to the inoculum can be ruled out with sufficient reliability (cf. corresponding text section above) could be considered as a NOEC for the toxicity to microorganisms of a STP	10
Inhibition of nitrification ISO-9509 (1989)	NOEC or EC10	1
	EC50	10
Ciliate growth inhibition tests (preferably with <i>Tetrahymena</i> , cf. OECD, 1998a) 1f	NOEC or EC10	1
	EC50	10
Activated sludge growth inhibition tests ISO-15522	NOEC or EC10	10
	EC50	100
Pilot scale activated sludge simulation tests OECD 303A (2001b) ISO-11733	Based on case-by-case expert judgement, the tested concentration not impairing proper functioning of the CAS ^{2f} unit could be considered as NOEC for microorganisms in STPs	Case-by-case down to 1
Growth inhibition test with <i>Pseudomonas putida</i> NF EN ISO 10712 (1995)	NOEC or EC10	1
	EC50	10