

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

## **Tossicità terrestre ed avvelenamento secondario**

### **Caso studio: grouping delle sostanze**

**Bruno Pennelli**

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura

## Indice

1. Campo di applicazione
2. Requisiti di sperimentazione della normativa
3. Valutazione della tossicità terrestre
4. Calcolo della PNEC terrestre
5. Avvelenamento secondario

### Requisiti di sperimentazione della normativa

E' necessaria la sperimentazione in caso di:

Sostanze fabbricate o importate in quantitativi pari o superiori a 100 tonnellate all'anno per fabbricante o importatore (Allegato IX del Regolamento REACH)

Ulteriori requisiti per sostanze fabbricate o importate in quantitativi pari o superiori a 1000 tonnellate (Allegato X del Regolamento REACH)

## Requisiti di sperimentazione della normativa

### Prescrizioni dell'allegato IX del Regolamento

Sostanze  $\geq 100$  t/anno

E' richiesto: Bioaccumulo nelle specie acquatiche, preferibilmente pesci

Non occorre tuttavia realizzare lo studio:

— se la sostanza ha un basso potenziale di bioaccumulo (ad esempio  $\log K_{ow} < 3$ ); e/o un basso potenziale di penetrazione delle membrane biologiche

o

— se è improbabile un'esposizione diretta o indiretta del comparto acquatico

## Requisiti di sperimentazione della normativa

### Prescrizioni dell'allegato IX del Regolamento

Sostanze  $\geq 100$  t/anno

Sono richiesti test sugli organismi del suolo quali:

- Tossicità a breve termine per gli invertebrati,
- Effetti sui microrganismi del suolo,
- Tossicità a breve termine per le piante.

Non occorre tuttavia realizzare questi studi se è improbabile un'esposizione diretta e indiretta del comparto terrestre.

In mancanza di dati può essere applicato il metodo dell'equilibrio di ripartizione per la stima della PNEC.

La scelta delle prove appropriate dipende dai risultati della valutazione della sicurezza chimica (es.: per sostanze con elevato potenziale di adsorbimento al suolo o molto persistenti è preferibile la sperimentazione della tossicità a lungo termine).

## Requisiti di sperimentazione della normativa

### Prescrizioni dell'allegato X del Regolamento

Sostanze  $\geq 1000$  t/anno

Sono richiesti ulteriori test di tossicità quali:

- lungo termine su invertebrati del suolo,
- lungo termine su piante,

se i risultati della valutazione della sicurezza chimica (Allegato I), rivelano la necessità di approfondire l'esame degli effetti della sostanza e/o dei suoi prodotti di degradazione sugli organismi del suolo. La scelta del/dei test appropriato/i dipende dal risultato della valutazione della sicurezza chimica.

Non occorre tuttavia realizzare questi test se:

- la sperimentazione è già prevista nelle prescrizioni dell'allegato IX,
- un'esposizione diretta e indiretta del comparto del suolo è improbabile.

## Requisiti di sperimentazione della normativa

### Prescrizioni dell'allegato X del Regolamento

Sostanze  $\geq 1000$  t/anno

Sono richiesti ulteriori test di tossicità a lungo termine o tossicità per la riproduzione degli uccelli.

**ATTENZIONE:** la necessità di sperimentazione su vertebrati va attentamente considerata, tenuto conto dell'ampia gamma di dati sui mammiferi in genere disponibili a questo livello di tonnellaggio.

## Valutazione della tossicità terrestre

### Premessa

#### Importanza:

Il suolo è spesso il collettore delle emissioni antropogeniche, fatto che diventa cruciale in caso di sostanze PBT.

Effetti avversi alla pedofauna comportano l'alterazione fisica, chimica e biologica del suolo a lungo termine (perdita della fertilità).

#### Limiti sperimentali:

Valutazione limitata agli organismi del suolo in senso stretto (invertebrati che prevalentemente vivono all'interno del suolo e sono esposti via suolo). Ne risultano esclusi gli invertebrati viventi in superficie, molti vertebrati, organismi delle acque interstiziali e, in parte, le funzioni del suolo indirettamente correlate alla pedofauna (potere tampone, formazione della struttura del suolo, ciclo dell'acqua).

## Valutazione della tossicità terrestre

### Principali organismi test

Organism group	Ecological process	Soil exposure pathway	Important taxa
Plants	Primary production	Mainly soil pore water (by root uptake)	All higher plants
Invertebrates	Breakdown of om Formation of soil structure	soil pore water, ingestion of soil material, soil air, secondary poisoning)	Earthworms, springtails, mites
Micro-organisms	Re-cycling of nutrients	Mainly soil pore water	Bacteria, protozoa, fungi

## Valutazione della tossicità terrestre

### Dati a disposizione

estrapolati:

“QSAR”, “Grouping” (read-across), EPM

sperimentali:

micro-organismi, invertebrati e piante

## Valutazione della tossicità terrestre

### Dati sperimentali

#### Micro-organismi

–Soil Micro-organisms, Nitrogen Transformation Test – OECD 216 (OECD, 2000a); ISO 14238 (ISO, 1997a)

–Soil Micro-organisms, Carbon Transformation Test – OECD 217(OECD, 2000b) ; ISO 14239(ISO, 1997b)

Durata dei test 28 gg.

I valori di EC10/NOEC ed EC50 ottenuti da questi test vanno considerati risultati a lungo termine per la popolazione microbica.

Per i non-fitofarmaci se il test di trasformazione dell'azoto è negativo, non sono attesi effetti tossici sulla trasformazione del carbonio e quest'ultimo test può essere evitato.

## Valutazione della tossicità terrestre

### Dati sperimentali

#### Invertebrati

– *Earthworm acute toxicity test* – OECD 207 (OECD, 1984); ISO 11268-1 (ISO, 1993)

Valuta la sopravvivenza di *Eisenia* spp. Prevede la somministrazione dell'agente chimico via carta da filtro (finalità di screening) o via suolo artificiale. LC50 ed effetti sulla biomassa sono determinati dopo 2 settimane di esposizione.

– *Earthworm reproduction test* – OECD 222 (OECD, 2004a); ISO 11268-2 (ISO, 1998)

Valuta l'effetto dell'agente chimico sulla capacità riproduttiva di *Eisenia* spp. Su un intervallo di tempo di 8 settimane. L'esposizione (4 settimane) è via suolo su un range di concentrazioni tale da coprire effetti letali e sub-letali.

– *Inhibition of reproduction of Collembola (Folsomia candida)* – ISO 11267 (ISO, 1999a)

NOEC/ECx a 21 gg è calcolato per sopravvivenza e successo riproduttivo.

## Valutazione della tossicità terrestre

### Dati sperimentali

#### Piante

– *Terrestrial Plant Test: Seedling emergence and seedling growth test* – OECD 208 (OECD 2006a); ISO 11269-2 (ISO, 2005b)

Specifico per lo studio degli effetti sulla prima parte del ciclo vitale. Non copre il lungo termine ma data la sensibilità di questa fase del ciclo vitale, si assume come stima della tossicità cronica. I semi sono posti a contatto con il terreno trattato e gli effetti sono osservati a 14 o 21 gg dopo il 50% di emergenza nel controllo. Vengono determinati EC50 e NOEC/EC10 su emergenza, peso secco parte aerea e danno apparente relativamente al controllo.

– *Terrestrial plant test: Vegetative vigour test* – OECD 227 (OEC, 2006b)

Adatto per la stima degli effetti delle deposizioni aeree. Piante allo stadio fogliare 2-4 sono irrorate con l'agente chimico a concentrazioni opportune ed osservate ad intervalli variabili fino a 21/28 gg seguenti. Si misurano peso e crescita delle parti aeree.

## Valutazione della tossicità terrestre

### Dati sperimentali

Test complessi (field e semi-field)

*Gnotobiotic laboratory tests: es. "Ohio type microcosm" (Edwards et al., 1998)*

*Terrestrial microcosms/mesocosms: es. "Terrestrial Model Ecosystem" (TME, standard guideline ASTM, 1993).*

*Field Studies, disegnati caso per caso, non standardizzati.*

**Richiesto un alto livello di "expert judgement"**

## Valutazione della tossicità terrestre

### Valutazione dei dati sperimentali

#### Elementi di considerazione

- *Organismi Test*: prioritari gli organismi OECD e ISO. Specie non standard possono essere utilizzate se rappresentative degli habitat, dei modelli di alimentazione e di diversi gruppi tassonomici. Considerare attentamente il modo d'azione della sostanza per la rappresentatività dell'organismo.
- *Endpoints*: prioritari gli endpoint OECD e ISO guidelines. Altri endpoint possono essere utilizzati accertandone la rilevanza ecologica e la pertinenza nel risk assessment. I criteri per la "reliability" sono gli stessi degli endpoint standard.
- *Exposure pathways*: come specificato in protocolli OECD e ISO. Esposizioni non standard devono comunque concordare con l'uso e le proprietà chimico fisiche della sostanza.
- *Composition of soils and artificial-soils*: come specificato in protocolli OECD e ISO. Suoli non standard possono essere considerati tenendo conto della condizione "worst case" e dei fattori della biodisponibilità.

## Valutazione della tossicità terrestre

### Valutazione dei dati sperimentali

#### Elementi di considerazione

- *Method of spiking*: come specificato in protocolli OECD e ISO. Considerare solubilità/solventi/vettori, biodisponibilità ed “ageing”. **-expert judgement-**
- *Duration of exposure*: come specificato in protocolli OECD e ISO. Considerare se la durata ha permesso l’assunzione della sostanza e se è calibrata per effetti short o long term. **-expert judgement-**
- *Feeding*: come specificato in protocolli OECD e ISO. Necessità di alimentare gli animali nei test cronici. Verificare che l’alimentazione non alteri l’esposizione alla sostanza e/o lo stato di salute degli animali.
- *Test design*: come specificato in protocolli OECD e ISO o conformi agli stessi criteri (dosi, repliche, controlli). Altrimenti, uso in “weight of evidence”.

## Valutazione della tossicità terrestre

### Considerazioni finali

#### Elementi di incertezza

Il suolo è il comparto ambientale più eterogeneo pertanto è fondamentale una buona caratterizzazione del substrato utilizzato nei test.

La variabilità dei risultati è inevitabilmente accentuata; nei test non standard deve tuttavia mantenersi sui livelli osservati nei test standard.

Pochi sono i taxa adottati nei protocolli standard, pertanto non tutti i possibili effetti sul comparto sono caratterizzati. I test non standard possono in molti casi completare il campo di osservazione.

## Calcolo della PNEC terrestre

- 1) Normalizzazione rispetto alla sostanza organica
- 2) Inquadramento della disponibilità di dati
- 3) Calcolo PNEC

## Calcolo della PNEC terrestre

### Normalizzazione rispetto alla sostanza organica

$$NOEC \text{ or } L(E)C_{50(standard)} = NOEC \text{ or } L(E)C_{50(exp)} \cdot \frac{Fom_{soil(standard)}}{Fom_{soil(exp)}} \quad \text{Equation R.10-4}$$

#### Explanation of symbols

NOEC or L(E)C50 <sub>exp</sub>	NOEC or L(E)C50 in experiment	[mg · kg <sup>-1</sup> ]	
Fom <sub>soil(standard)</sub>	fraction organic matter in standard soil	[kg · kg <sup>-1</sup> ]	0.034
Fom <sub>soil(exp)</sub>	fraction organic matter in experimental soil	[kg · kg <sup>-1</sup> ]	
NOEC or L(E)C50 <sub>standard</sub>	NOEC or L(E)C50 in standard soil	[mg · kg <sup>-1</sup> ]	

### Calcolo della PNEC terrestre

#### Inquadramento della disponibilità di dati

Nessun dato disponibile: PNEC calcolata da EPM (screening approach)

Dati disponibili su più livelli trofici: PNECsoil calcolata con gli AF

Un solo dato disponibile: Si applicano le due opzioni precedenti e prevale il caso peggiore

## Calcolo della PNEC terrestre

EPM

$$PNEC_{soil} = \frac{K_{soil-water}}{RHO_{soil}} \cdot PNEC_{water} \cdot 1000$$

Equation R.10-5

### Explanation of symbols

$PNEC_{water}$	Predicted No Effect Concentration in water	$[mg \cdot l^{-1}]$	
$RHO_{soil}$	bulk density of wet soil	$[kg \cdot m^{-3}]$	1150
$K_{soil-water}$	partition coefficient soil water	$[m^3 \cdot m^{-3}]$	Eq. R.16-14
$PNEC_{soil}$	Predicted No Effect Concentration in wet soil	$[mg \cdot kg^{-1}]$	

Nota:

1. se  $PEC_{soil}/PNEC > 1$ , è necessario disporre di dati con organismi del suolo a conferma/smentita del risultato;
2.  $PEC_{soil}/PNEC_{soil}$  è aumentato di un fattore 10 per sostanze con  $\log Kow > 5$ , per considerare l'inevitabile ingestione di suolo

## Calcolo della PNEC terrestre

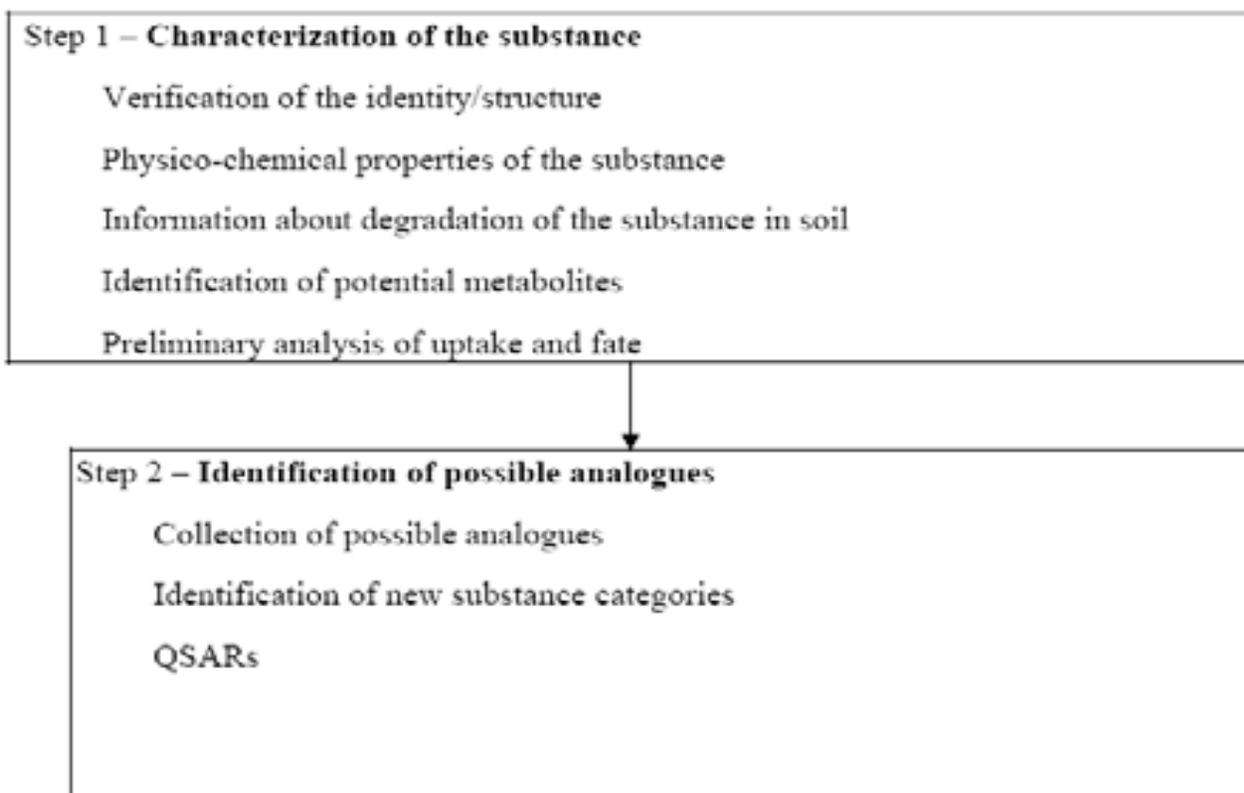
### Assessment factors

**Table R.10-10 Assessment factors for derivation of PNEC<sub>soil</sub>**

Information available	Assessment factor
L(E)C50 short-term toxicity test(s) (e.g. plants, earthworms, or microorganisms)	1000
NOEC for one long-term toxicity test (e.g. plants)	100
NOEC for additional long-term toxicity tests of two trophic levels	50
NOEC for additional long-term toxicity tests for three species of three trophic levels	10
Species sensitivity distribution (SSD method)	5 – 1, to be fully justified on a case-by-case basis (cf. main text)
Field data/data of model ecosystems	case-by-case

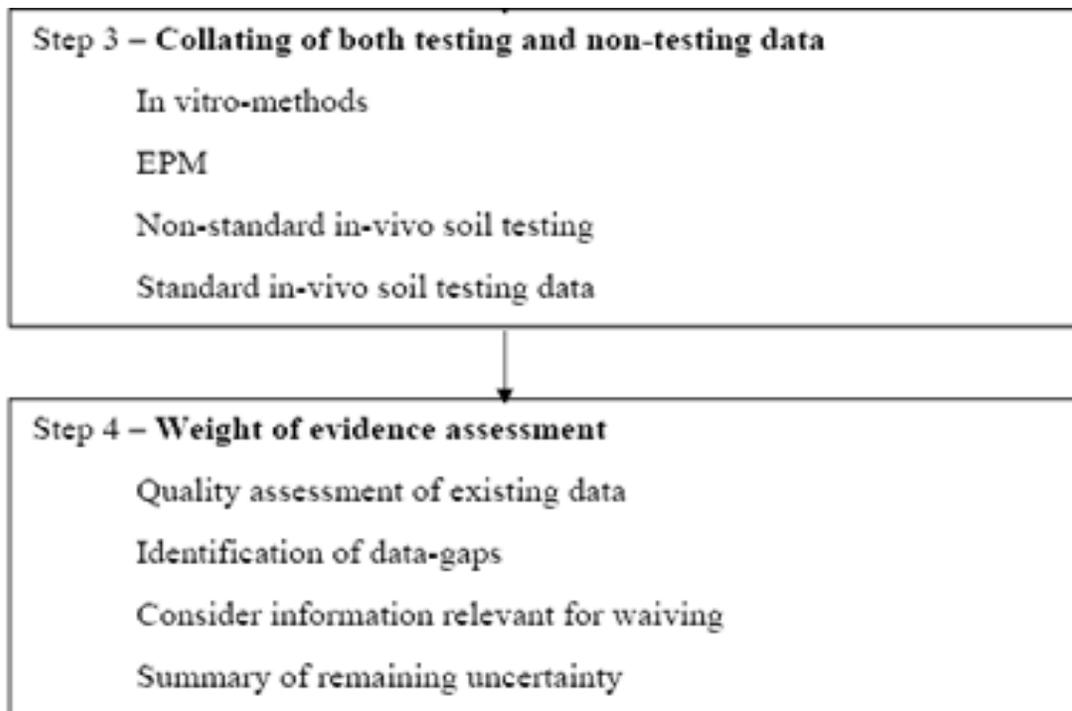
## Calcolo della PNEC terrestre

### Alternativa: l'approccio "weight of evidence"



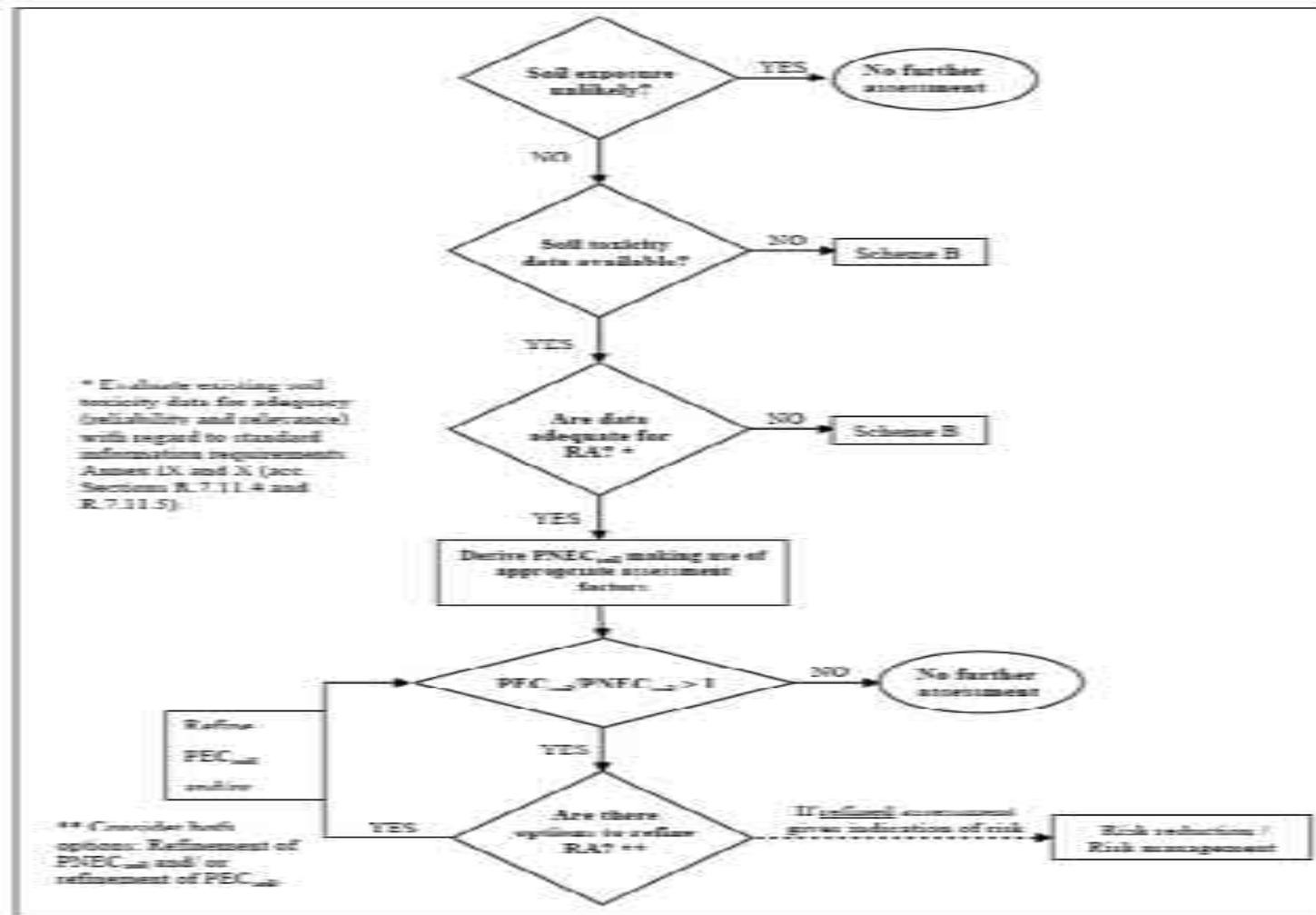
## Calcolo della PNEC terrestre

### Alternativa: l'approccio "weight of evidence"



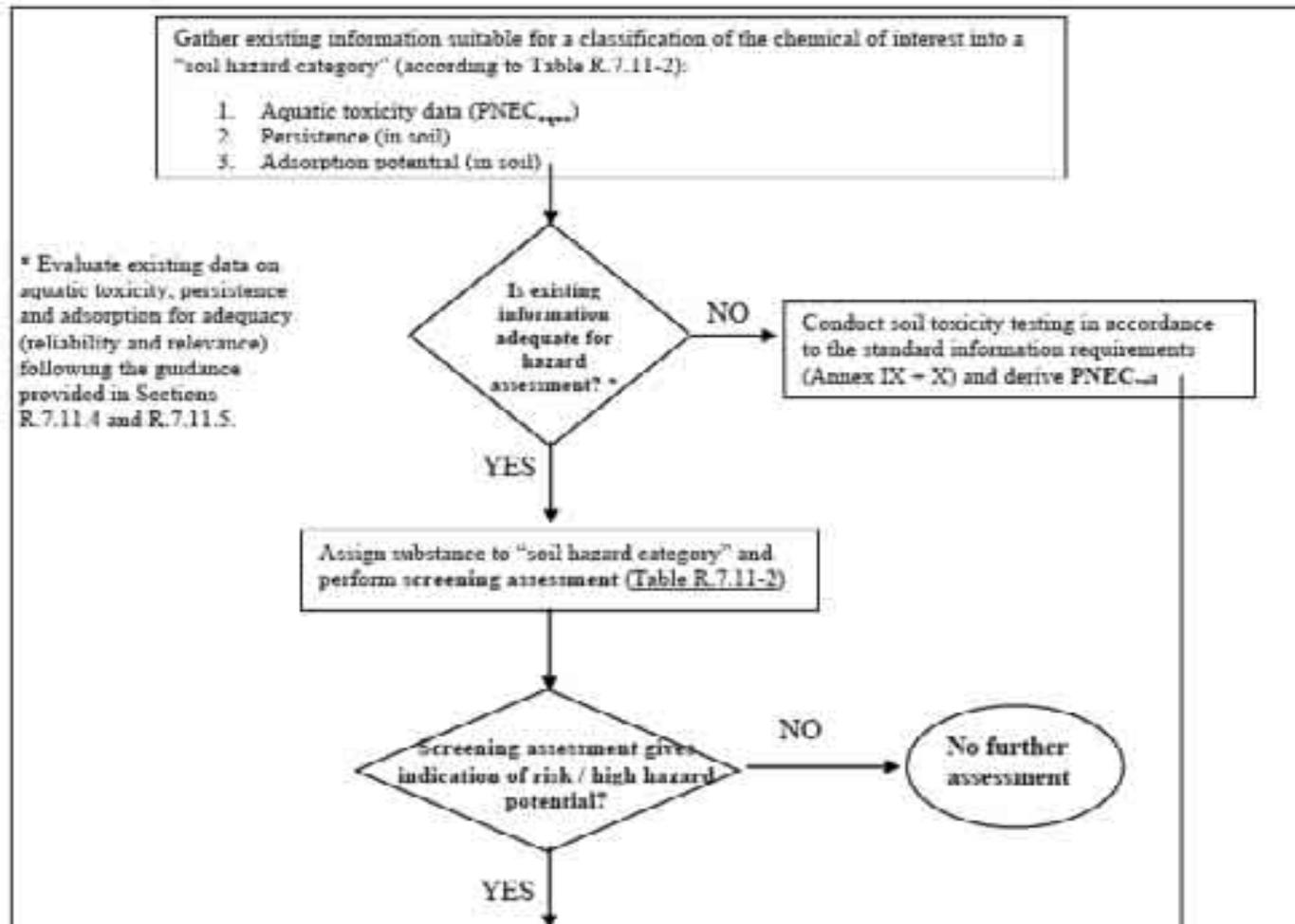
## Calcolo della PNEC terrestre

### Integrated Testing Strategy



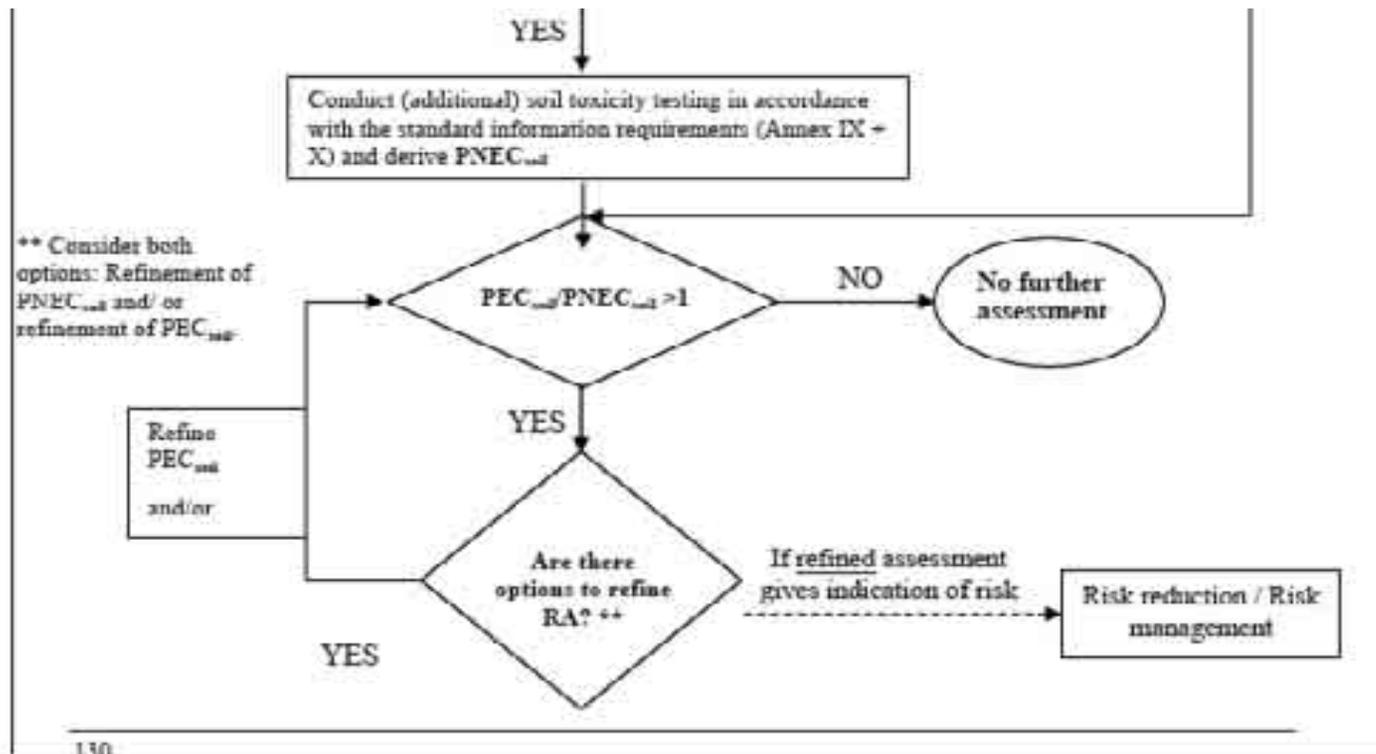
## Calcolo della PNEC terrestre

### Integrated Testing Strategy



## Calcolo della PNEC terrestre

### Integrated Testing Strategy



## Avvelenamento secondario

### Concetti di base del bioaccumulo acquatico

Bioconcentration

Bioaccumulation

Biomagnification

## Avvelenamento secondario

### Stima sperimentale del BCF<sub>fish</sub>

OECD test guideline 305 (1996), ASTM E1022-94 (2003), OPPTS 850.1730 (US-EPA, 1996a)

2 concentrazioni test sub-letali mantenute costanti (flow-through/renewal system) e monitorate. Al raggiungimento dello “steady-state concentration” o al 28 giorno al massimo ha inizio il periodo di depurazione di 14 gg. Preferibile la correzione del BCF per l’assorbimento al materiale organico disciolto o sospeso.

Sistema valido per sostanze con log K<sub>ow</sub> 1.5-6. Difficoltà dovute principalmente a insolubilità/degradabilità volatilità.

Il sistema “flow-through” è sempre preferibile.

Altri metodi: fish dietary bioaccumulation tests, invertebrate tests

## Avvelenamento secondario

### Stima non sperimentale del BCF e BMF -fish

Quantitative structure-activity relationships (QSARs),  
Expert systems, Grouping approaches

BCF MODELS BASED ON LOG KOW:

$$\log \text{BCF} = 0.85 \times \log \text{Kow} - 0.70$$

$$\log \text{Kow range} = 1-6$$

$$\log \text{BCF} = -0.2 \log \text{Kow}^2 + 2.74 \log \text{Kow} - 4.72$$

$$\log \text{Kow range} >6$$

log K <sub>ow</sub> of substance	BCF (fish)	BMF
<4.5	< 2,000	1
4.5 - <5	2,000-5,000	2
5 - 8	> 5,000	10
>8 - 9	2,000-5,000	3
>9	< 2,000	1

## Avvelenamento secondario

### Bioaccumulo terrestre (TGD)

$$BCF_{earthworm} = (0.84 + 0.012K_{ow}) / RHO_{earthworm}$$

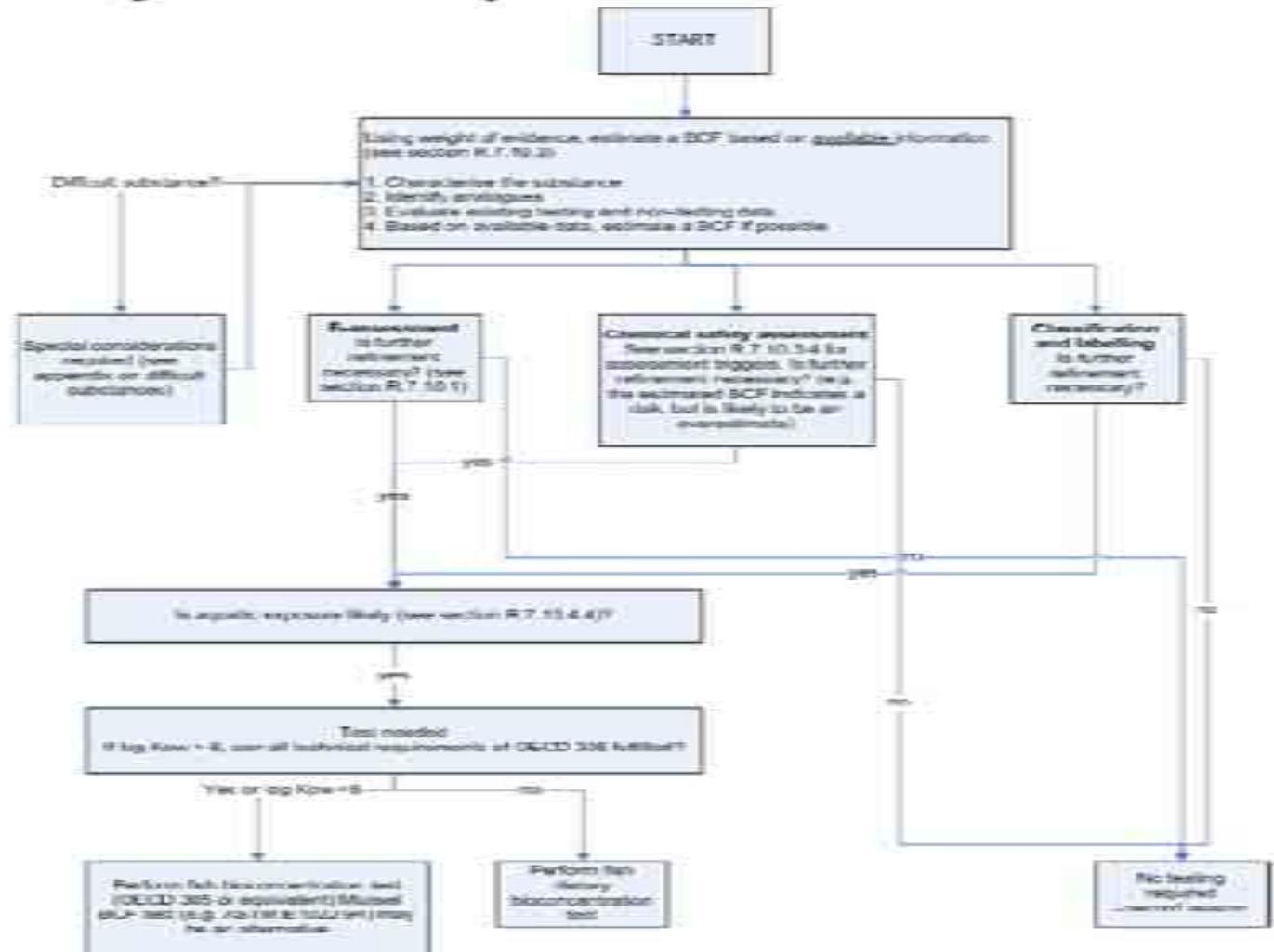
$$C_{earthworm} = \frac{BCF_{earthworm} \cdot C_{porewater} \cdot W_{earthworm} + C_{soil} \cdot W_{gut}}{W_{earthworm} + W_{gut}}$$

$$W_{gut} = W_{earthworm} \cdot F_{gut} \cdot CONV_{soil}$$

$$CONV_{soil} = \frac{RHO_{soil}}{F_{solid} \cdot RHO_{solid}}$$

## Avvelenamento secondario

### Integrated Testing Strategy



## Avvelenamento secondario

### PNEC<sub>oral</sub>

$$NOEC_{bird} = NOAEL_{bird} \cdot CONV_{bird} \quad NOEC_{mammal, food\_chr} = NOAEL_{mammal, oral\_chr} \cdot CONV_{mammal}$$

$$PNEC_{oral} = \frac{TOX_{oral}}{AF_{oral}}$$

TOX <sub>oral</sub>	Duration of test	AF <sub>oral</sub>
LC50 <sub>bird</sub>	5 days	3,000
NOEC <sub>bird</sub>	chronic	30
NOEC <sub>mammal, food, chr</sub>	28 days	300
	90 days	90
	chronic	30

## Caso studio: grouping delle sostanze

### “chemical category approach”

#### vantaggi

- Riduzione del carico sperimentale per inter ed extrapolazione dei dati tra sostanze “affini”;
- Valutazione basata su gruppi di dati piuttosto che su dati isolati;
- Raggruppamento in categoria (utile per sostanze difficili o per previsioni dell’effetto sull’uomo);
- Completamento dei “missing data points”;
- Utile per la stima degli effetti su organismi di sostanze con analogo modo d’azione.

## Caso studio: grouping delle sostanze

### “chemical category approach”

#### Concetti di base: categoria chimica

- Analogo gruppo funzionale (es.: aldeide, epossido, estere, ione metallico);
- Costituenti o classi chimiche comuni, simile n° di carboni;
- Cambiamento crescente e costante nella categoria (es.: categoria “chain-length”), molto spesso nelle proprietà chimico-fisiche;
- Possibilità di precursori o metaboliti comuni che riflettono somiglianza chimico strutturale (es.: caso delle vie metaboliche).

## Caso studio: grouping delle sostanze

### “chemical category approach”

#### read-across e trend analysis

Within a chemical category, data gaps may be filled by read-across, trend analysis and QSARs.

- *Read-across* is a technique used to predict endpoint information for one chemical by using data from the same endpoint from another chemical which is considered to be *similar* in some way (on the basis of structural similarity and similar properties and/or activities)
- For a given category endpoint, the category members are often related by a trend (e.g. increasing, decreasing or constant) in an effect, and a *trend analysis* can be carried out using a model based on the data for the members of the category.

## Caso studio: grouping delle sostanze

“chemical category approach”

Colmare il dato mancante con la category approach

	Chemical 1	Chemical 2	Chemical 3	Chemical 4
Structure	xxxxxxxxx	xxxxxxxxx	xxxxxxxxx	xxxxxxxxx
Property 1	● → ○	○ → ●	● → ○	○ → ●
Property 2	● → ○	○ → ●	○ → ●	● → ○
Property 3	○ → ●	● → ○	● → ○	○ → ●
Activity 1	● → ○	○ → ●	● → ○	○ → ●
Activity 2	● → ○	○ → ●	○ → ●	● → ○
Activity 3	○ → ●	● → ○	● → ○	○ → ●

## Caso studio: grouping delle sostanze

### “chemical category approach”

Colmare il dato mancante

1. Read across
2. Trend Analysis
3. Modelli

## Caso studio: grouping delle sostanze

### “chemical category approach”

Colmare il dato mancante: Read across  
qualitativo/quantitativo

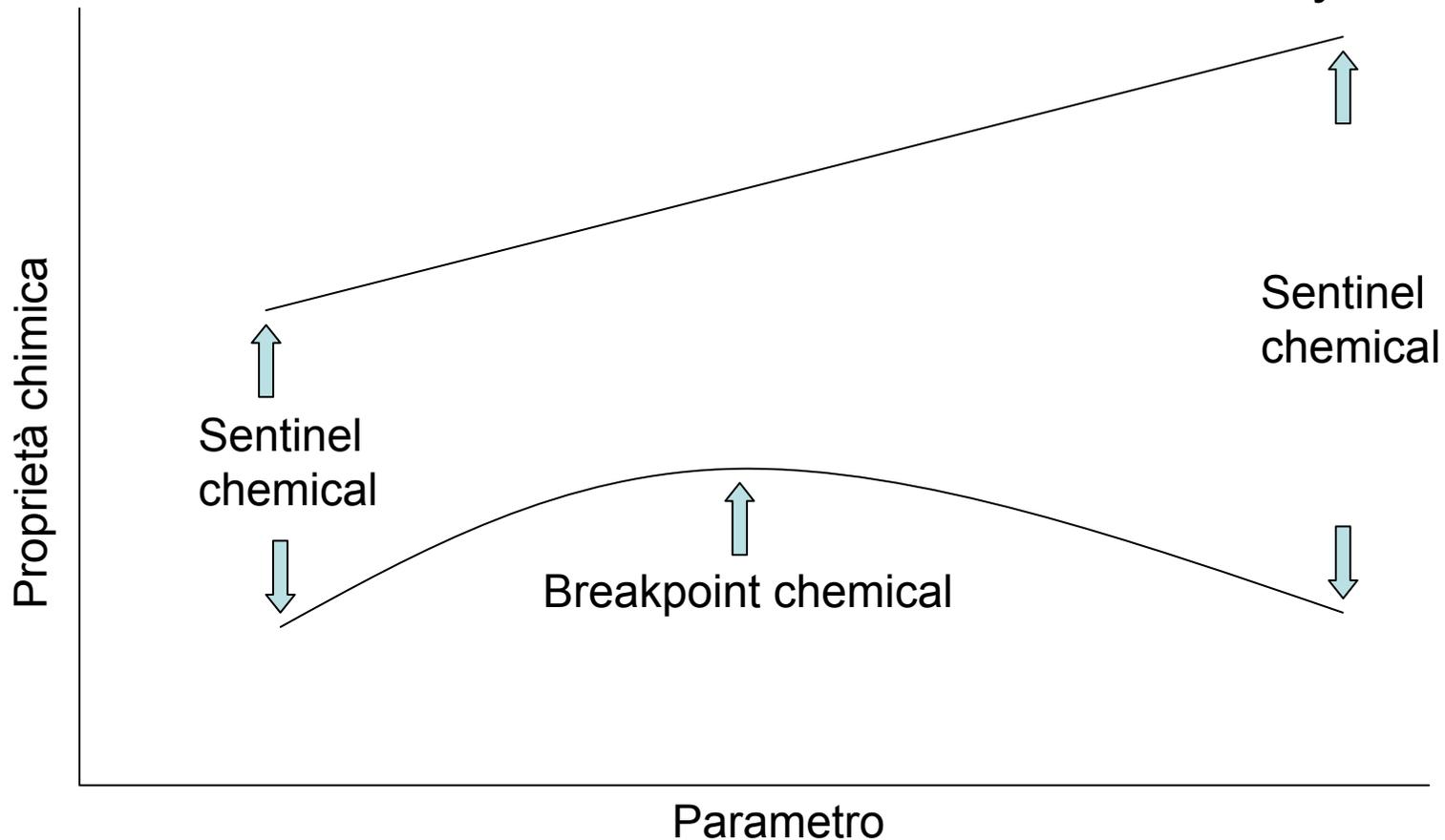
All'interno di un gruppo di sostanze:

- One to one
- Many to one
- One to many
- Many to many

## Caso studio: grouping delle sostanze

### “chemical category approach”

Colmare il dato mancante: Trend analysis



## Caso studio: grouping delle sostanze

### “analogue approach”

#### Criteria

L'informazione sull'endpoint di una sostanza è usata per predire il valore dello stesso endpoint su una sostanza simile (generalmente per struttura, proprietà e/o attività)

## Caso studio: grouping delle sostanze

“analogue approach”

