

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

ECOTOSSICOLOGIA, IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO PER L'AMBIENTE E VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI

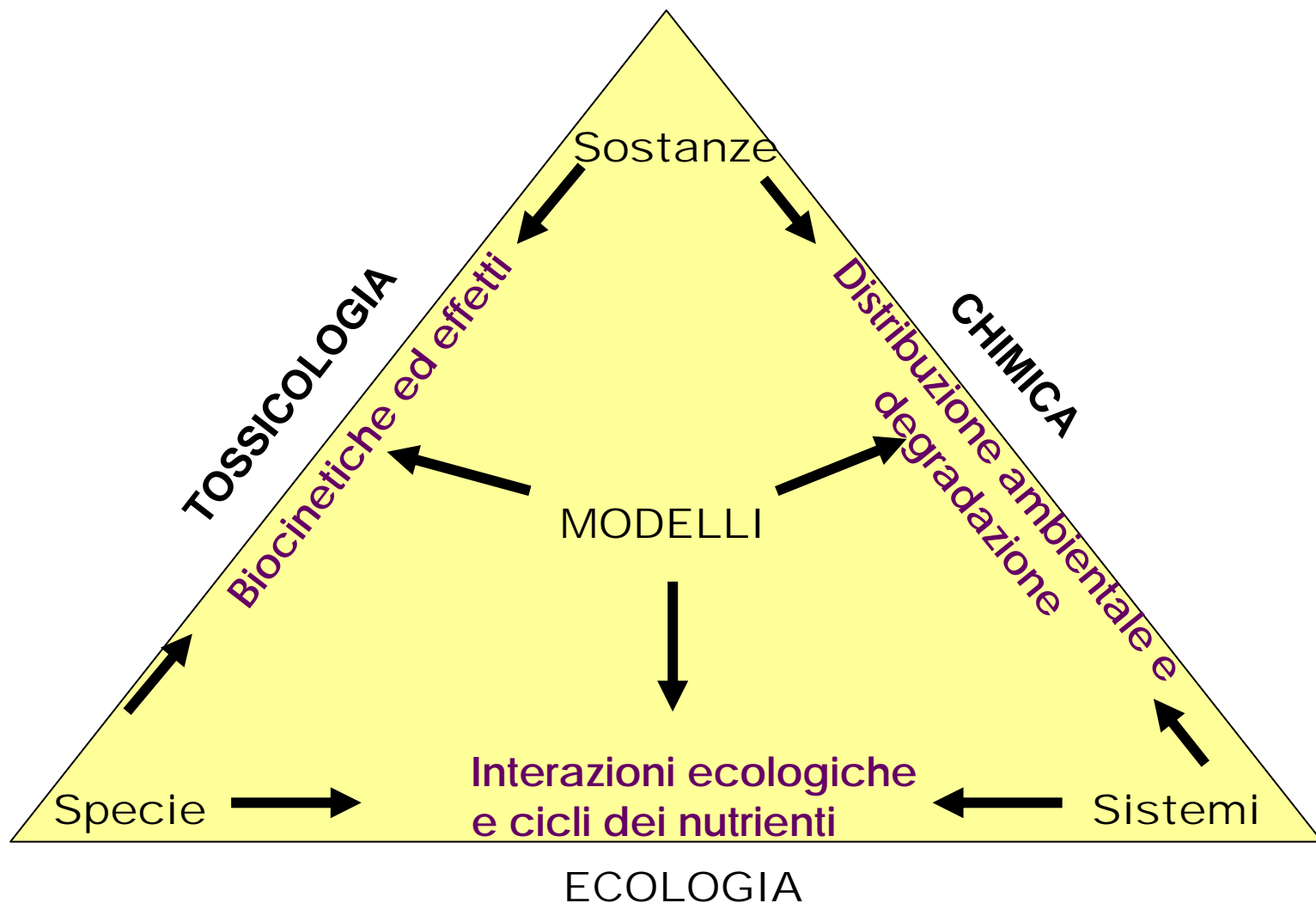
Silvia Marchini

ISS

Indice capitoli

1. Definizioni
2. Distribuzione di una sostanza nell'ambiente
3. Stima dell'esposizione realistica (biodisponibilità)
4. Bioaccumulo
5. Valutazione degli effetti ambientali
6. Valutazione degli effetti su specie singole

1. Definizioni - Ecotossicologia



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)

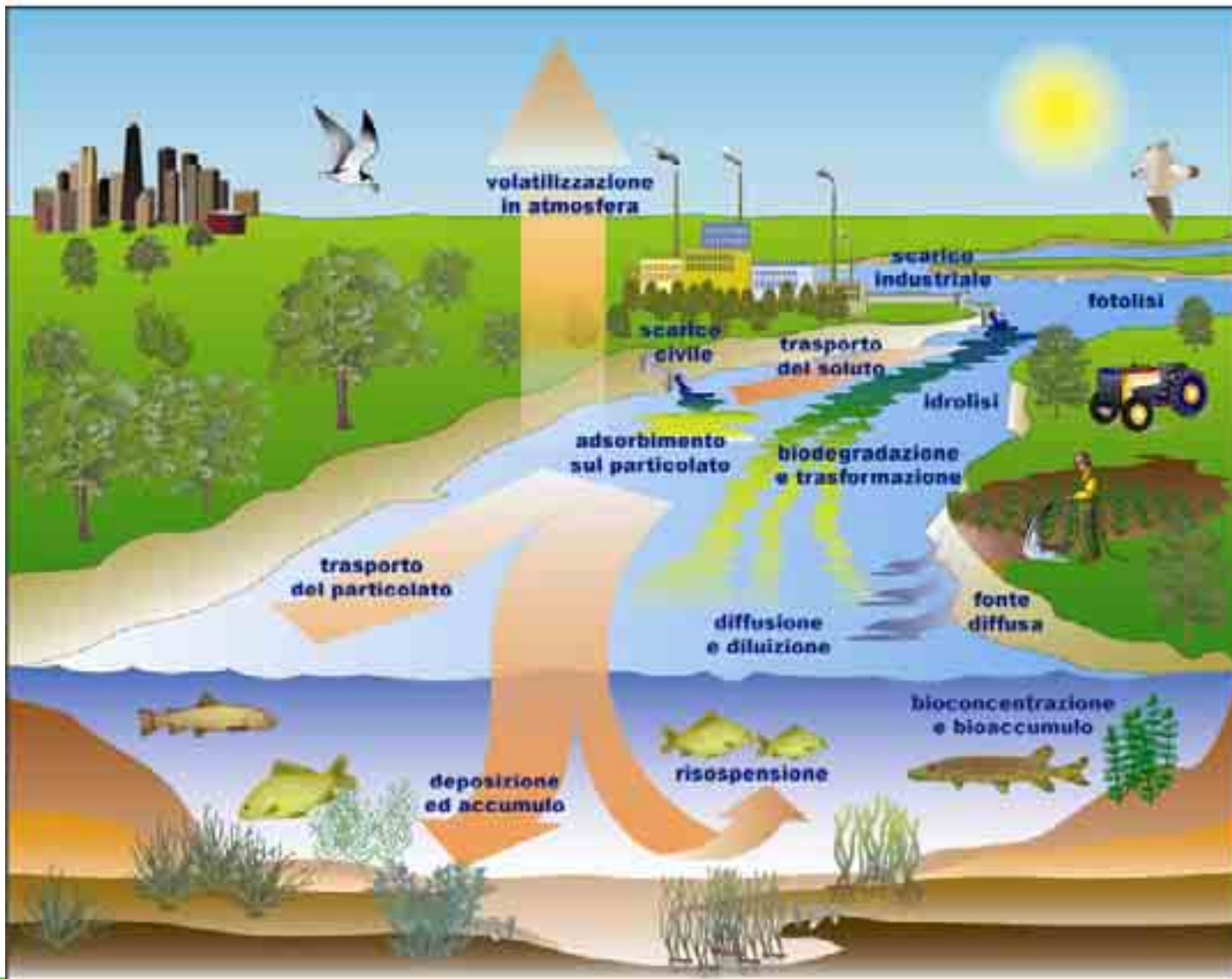
Valutazione del pericolo

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)

2 - Distribuzione di una sostanza nell'ambiente



Contaminazione

conseguenza del rilascio di sostanze antropogeniche tale da modificare le proprietà o la disponibilità e la qualità delle risorse in un determinato intervallo di spazio e di tempo.

Inquinamento

la contaminazione diviene inquinamento quando si verifica un effetto deleterio sugli organismi viventi

3 - Stima dell'esposizione realistica

Concentrazione ambientale predetta (PEC)

=

Concentrazione a cui sono esposti gli organismi?

3.1 - Vie di esposizione

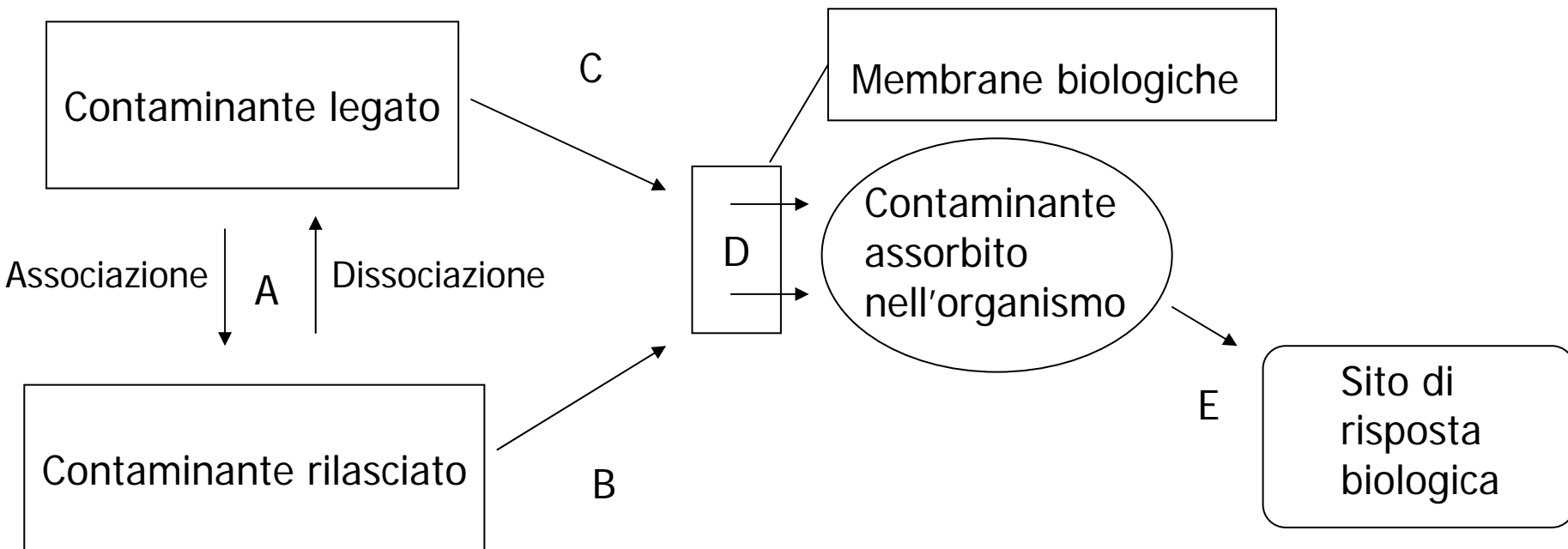
- Respirazione
- Contatto con le superfici corporee
- Ingestione di sedimento e acqua contaminata
- Consumo di cibo contaminato

3.2 - 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)

3.2.1 - Processi di Biodisponibilità'

Modificato da: National Research Council – Bioavailability of contaminants in soils and sediments (2003)



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

3.2.2 - Fattori di Biodisponibilità'

- ripartizione e mobilità della sostanza
- presenza di altre sostanze
- caratteristiche dell'acqua e dei sedimenti
- condizioni chimico-fisiche sito-specifiche
- tipo di organismo
- via di esposizione
- abitudini alimentari
- In laboratorio : raccolta, conservazione e manipolazione

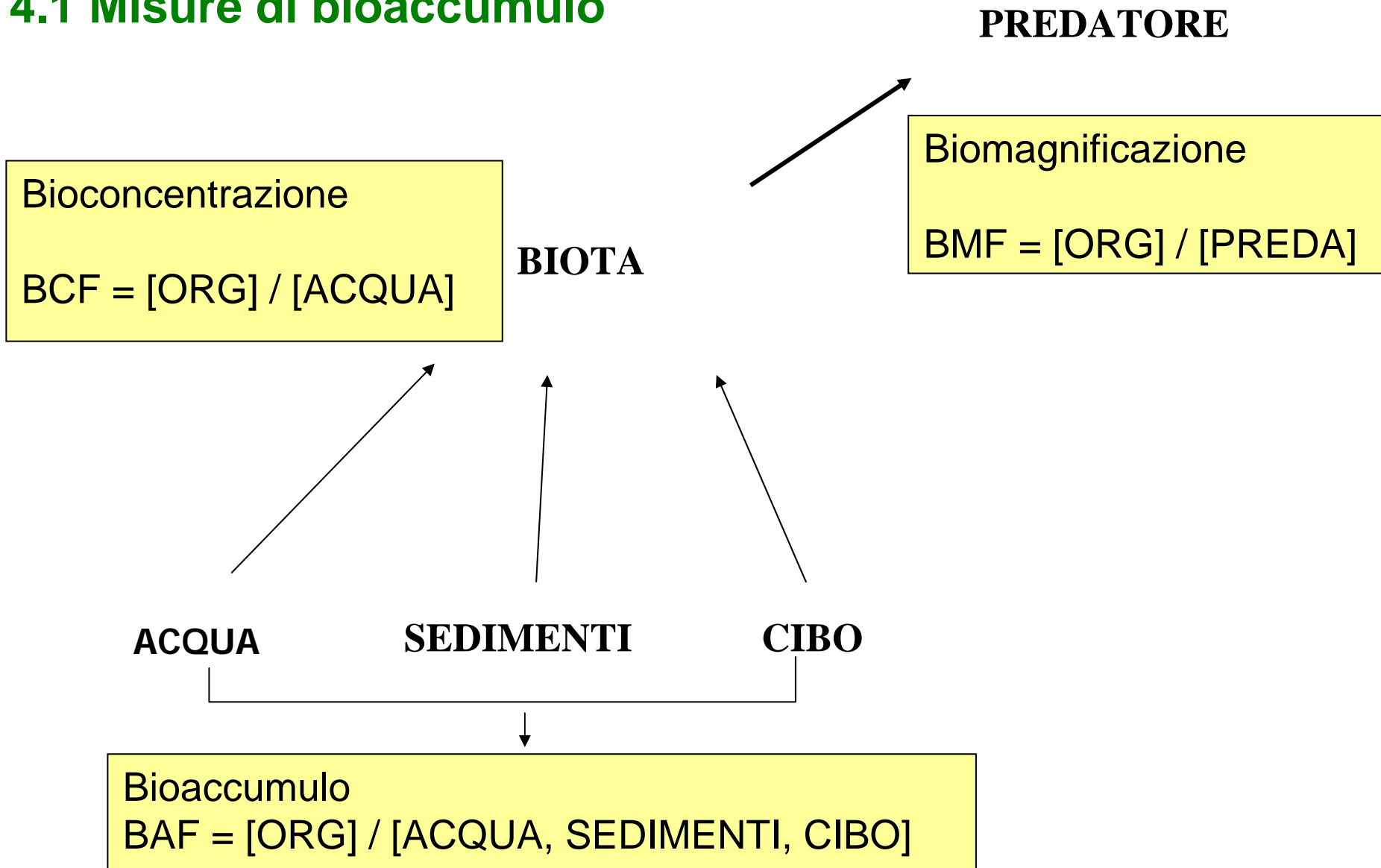
4 - Bioaccumulo

Lipofilia (Log Kow > 3)

Persistenza ambientale

Lenta eliminazione nell'organismo

4.1 Misure di bioaccumulo



5 – Valutazione degli effetti ambientali

Effetti:

Variazioni nella **struttura e funzione** dell'ecosistema

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**)

5 (continua) - Valutazione degli effetti ambientali

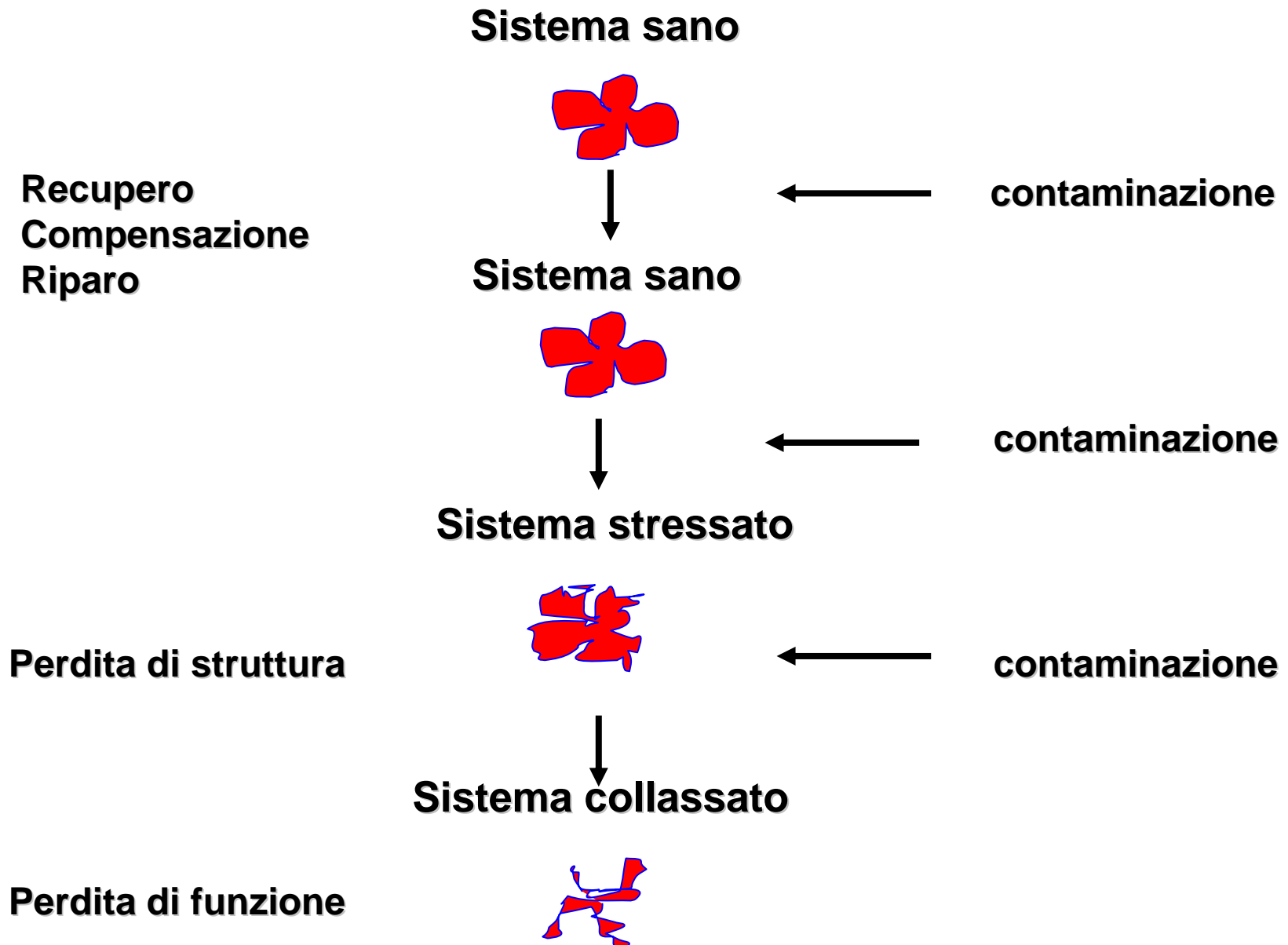
Obiettivi

conservazione della struttura e funzione dell'ecosistema

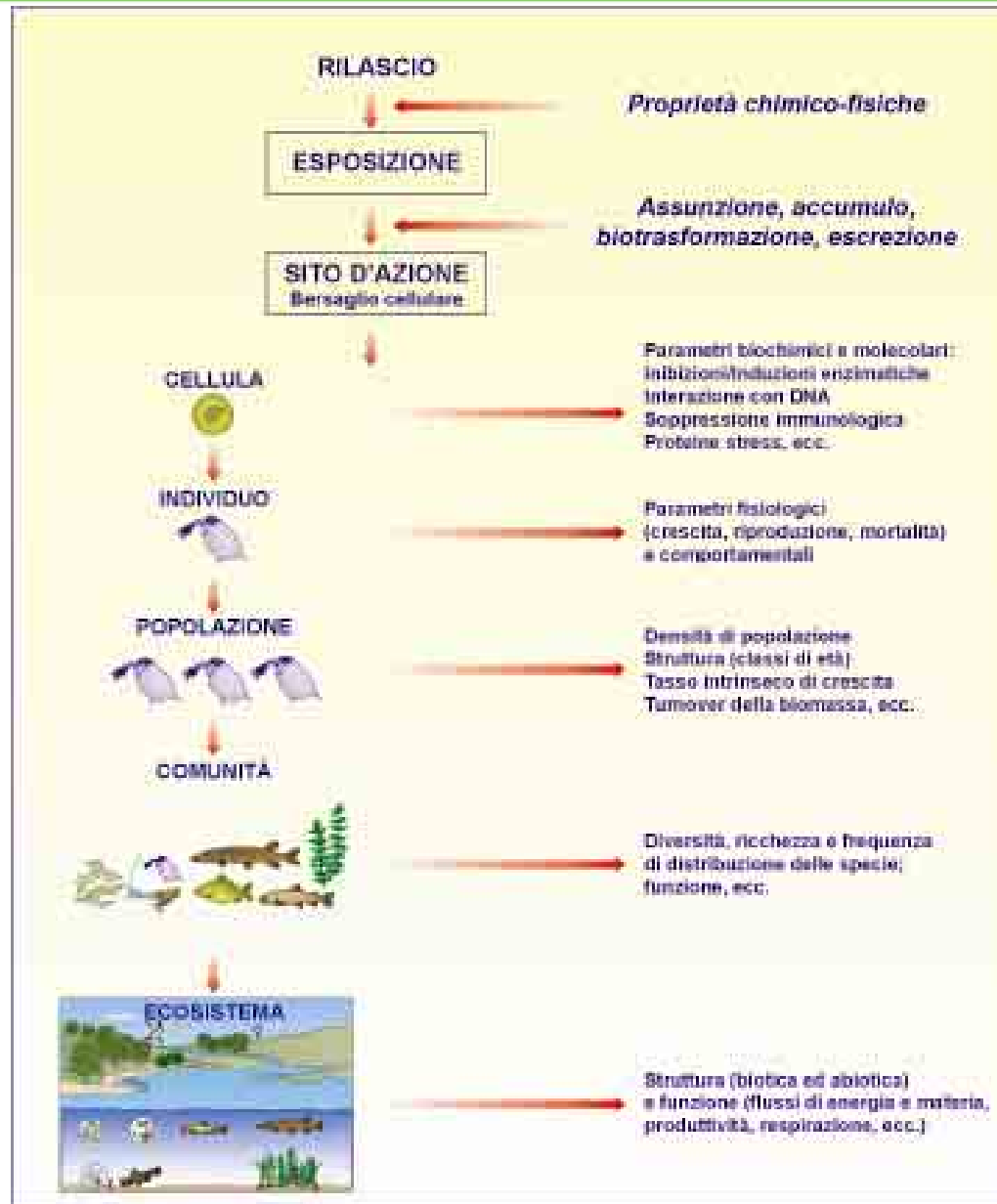
Assunzioni

Proteggere l'ecosistema significa proteggere la specie più sensibile

Proteggere la struttura dell'ecosistema vuol dire proteggere la sua funzione



5.1 – effetti a diversi livelli di integrazione



Rilevanza ecologica

- Effetti rilevanti (significativi) devono essere 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.

6 - Valutazione degli effetti su specie singole

Saggi su poche specie rappresentative



Estrapolazione all'intera biosfera

6.1 - 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

6.2 - 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)

6.3 - Test acuti / cronici

serie di diluizioni

concentrazione unica

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

.....

6.4 - 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**).

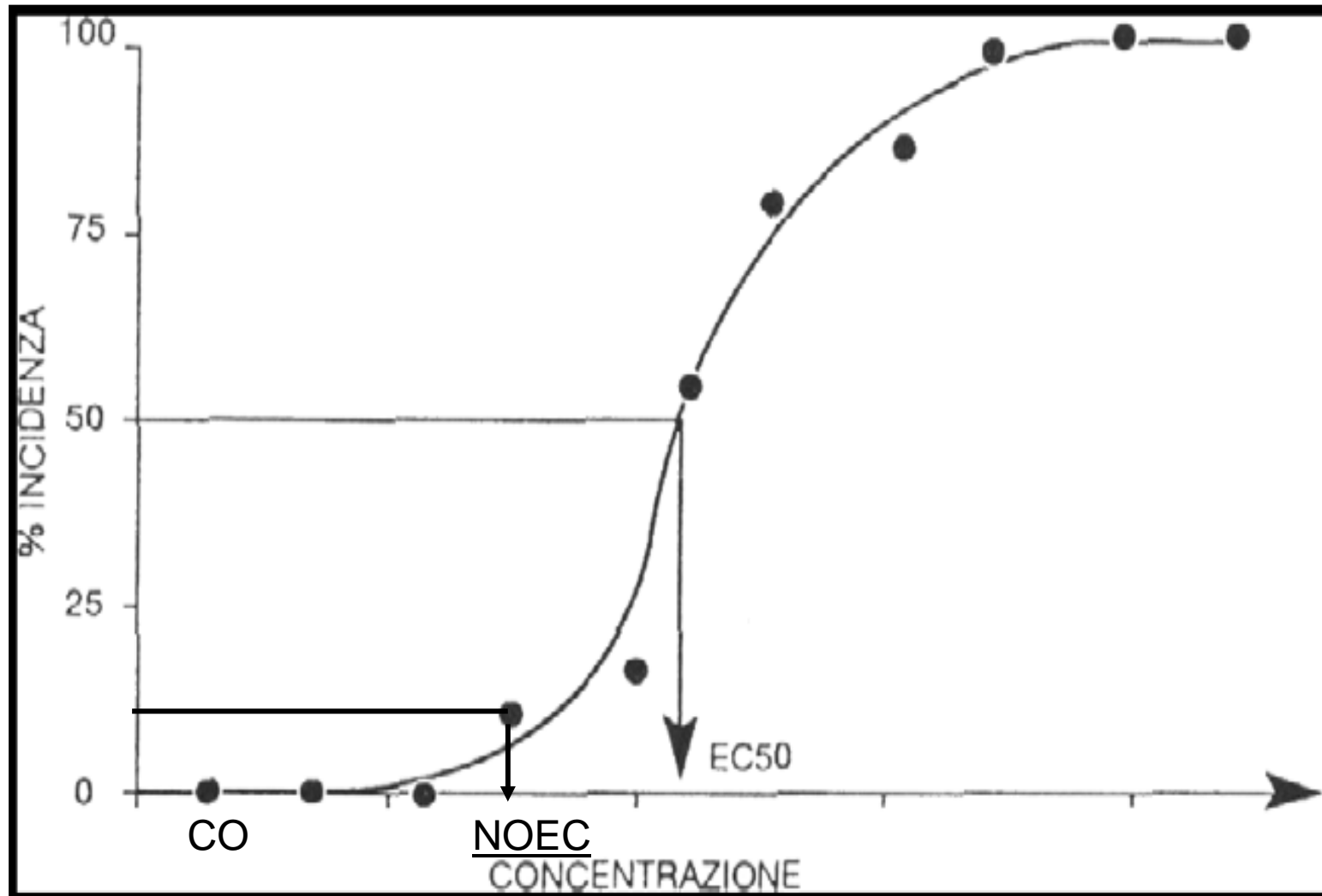
HC5 (Hazardous concentration 5)

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).

6.4.1– Derivazione della E(L)C50

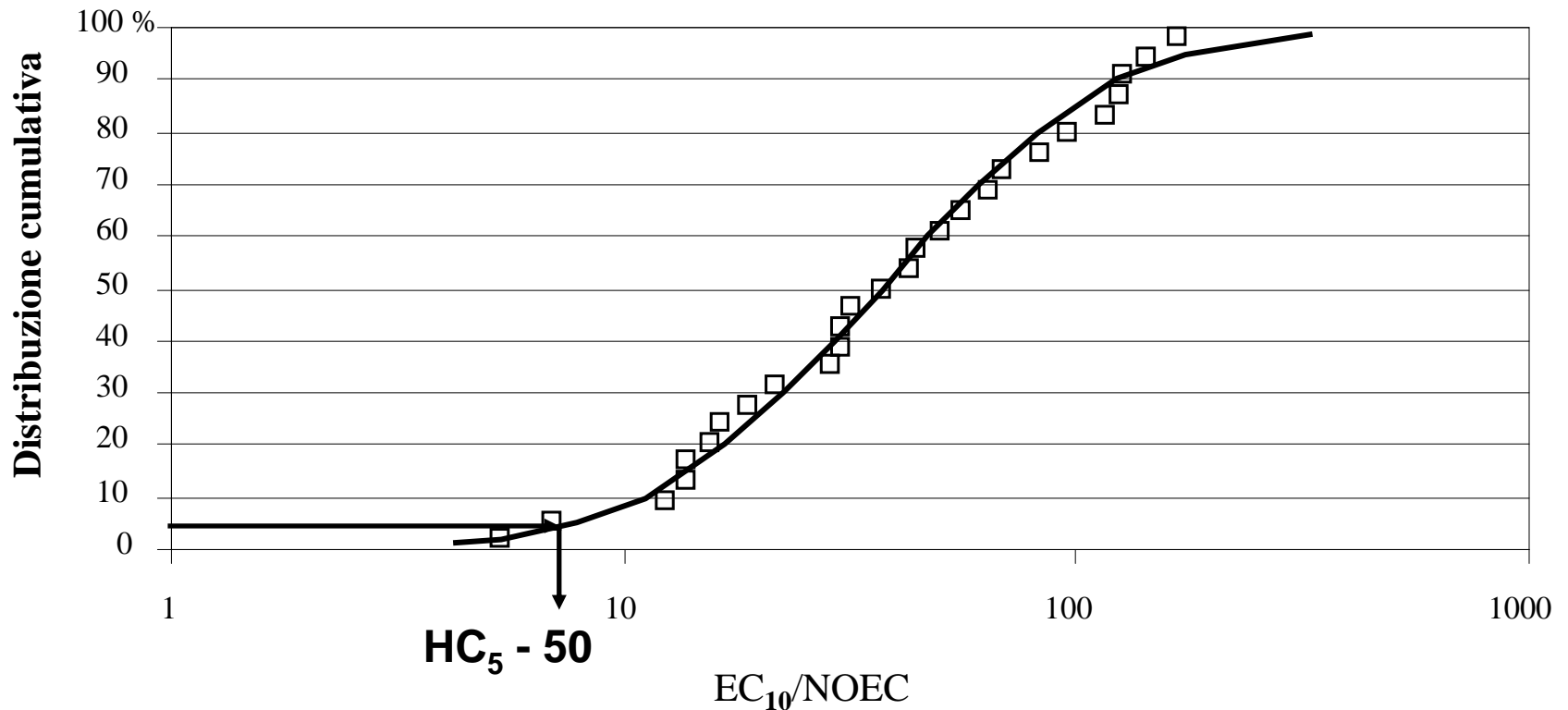


6.4.2 - Derivazione della HC5

Raggruppamento dati (specie e endpoint)

Normalizzazione (parametri fisico-chimici)

Scelta del modello di distribuzione



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

VALUTAZIONE DEL PERICOLO PER L'AMBIENTE NEL SISTEMA REACH

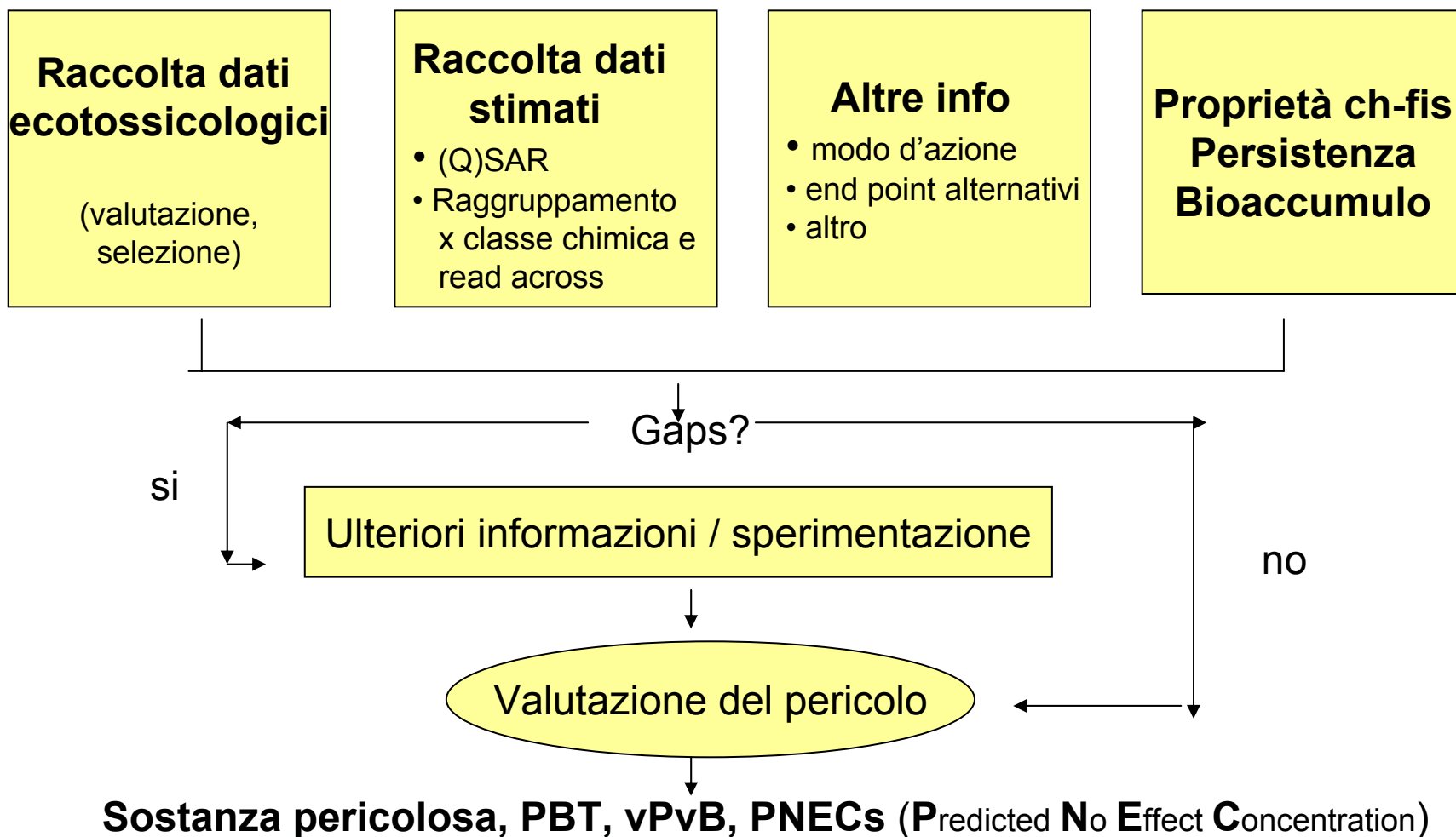
Silvia Marchini

ISS

Indice capitoli

1. Valutazione del pericolo per l'ambiente nel sistema REACH
2. Valutazione del pericolo per il comparto acqua dolce
3. Derivazione della PNEC - Acqua dolce
4. Valutazione del pericolo per il comparto mare
5. Comparto sedimenti
6. Micro-organismi negli impianti di trattamento delle acque reflue (STP)
7. Conclusioni

1 - Valutazione del pericolo per l'ambiente nel sistema REACH



1.1 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)
- **Regulatory acceptability** (adeguati agli scopi della valutazione del pericolo e del rischio)

‘Solna principles’ (OECD 1996a)

1.2 Strategie integrate di sperimentazione Test alternativi ?

- **Replace**
- **Reduce**
- **Refine**

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

Test alternativi

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

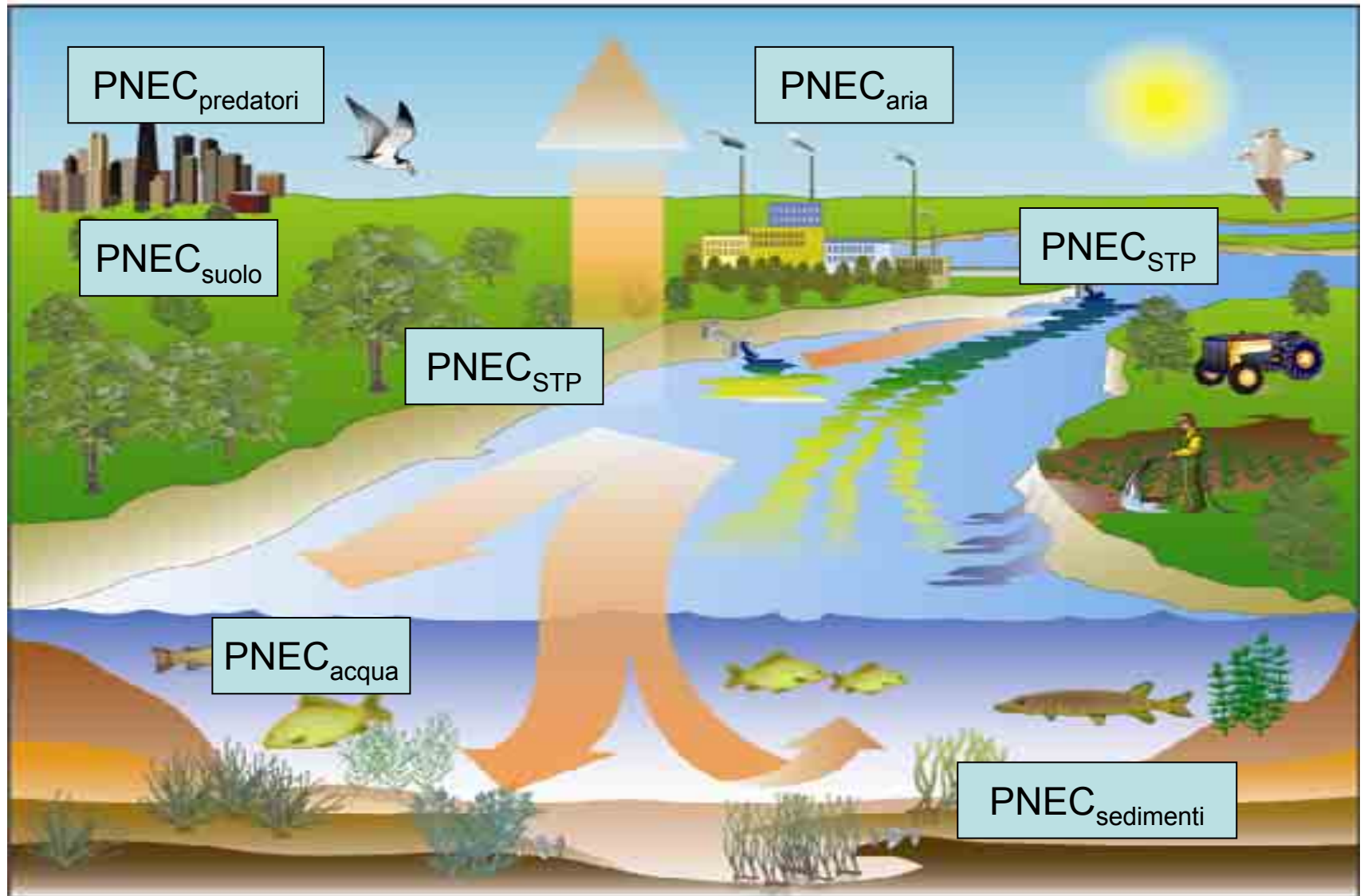
Linee cellulari di pesci (OK per effetti acuti ma mancano di tossicocinetiche realistiche. In corso di validazione)

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

Misura di BCF in vitro

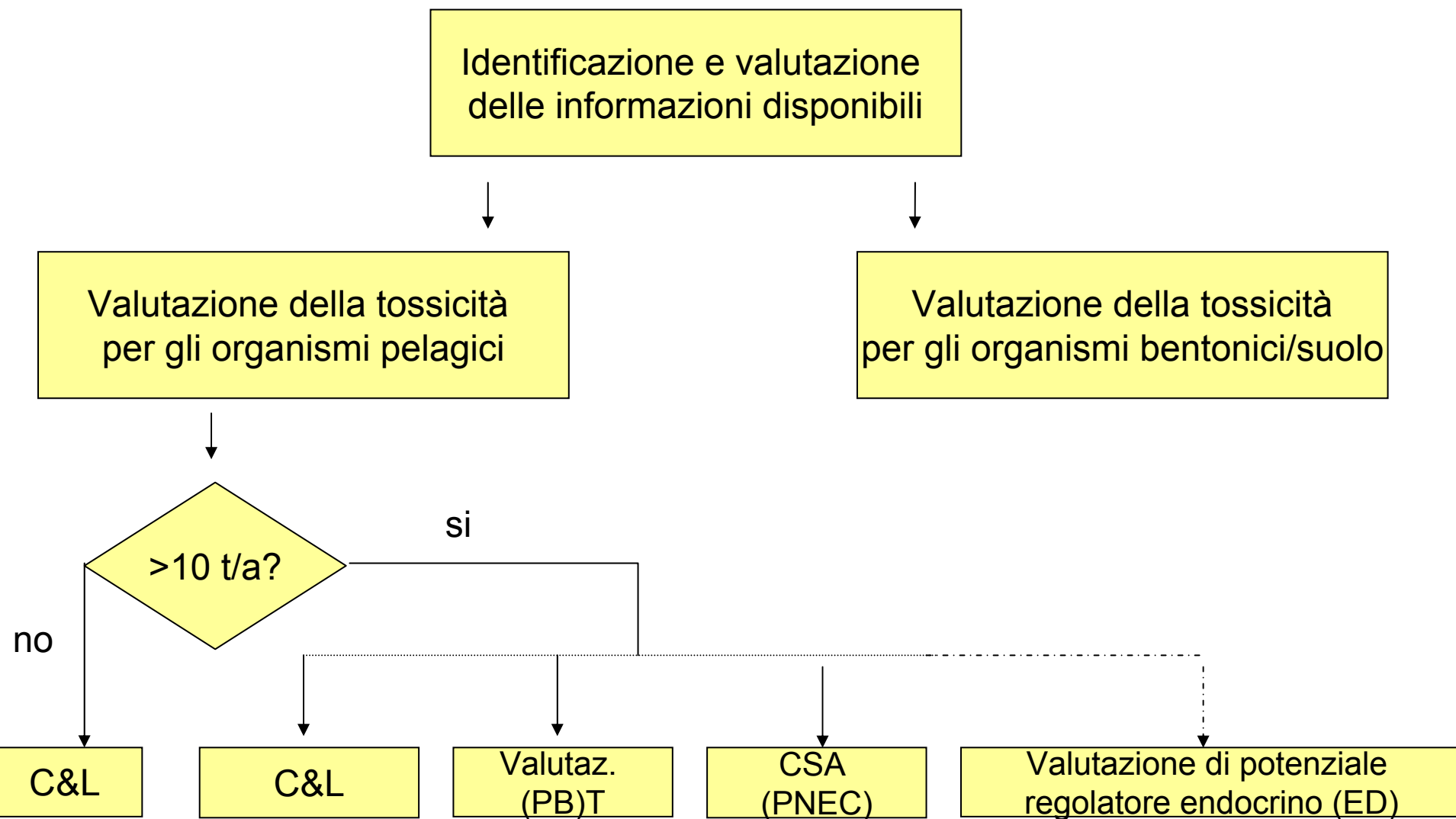
.....

Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



PNEC = Predicted No Effect Concentration

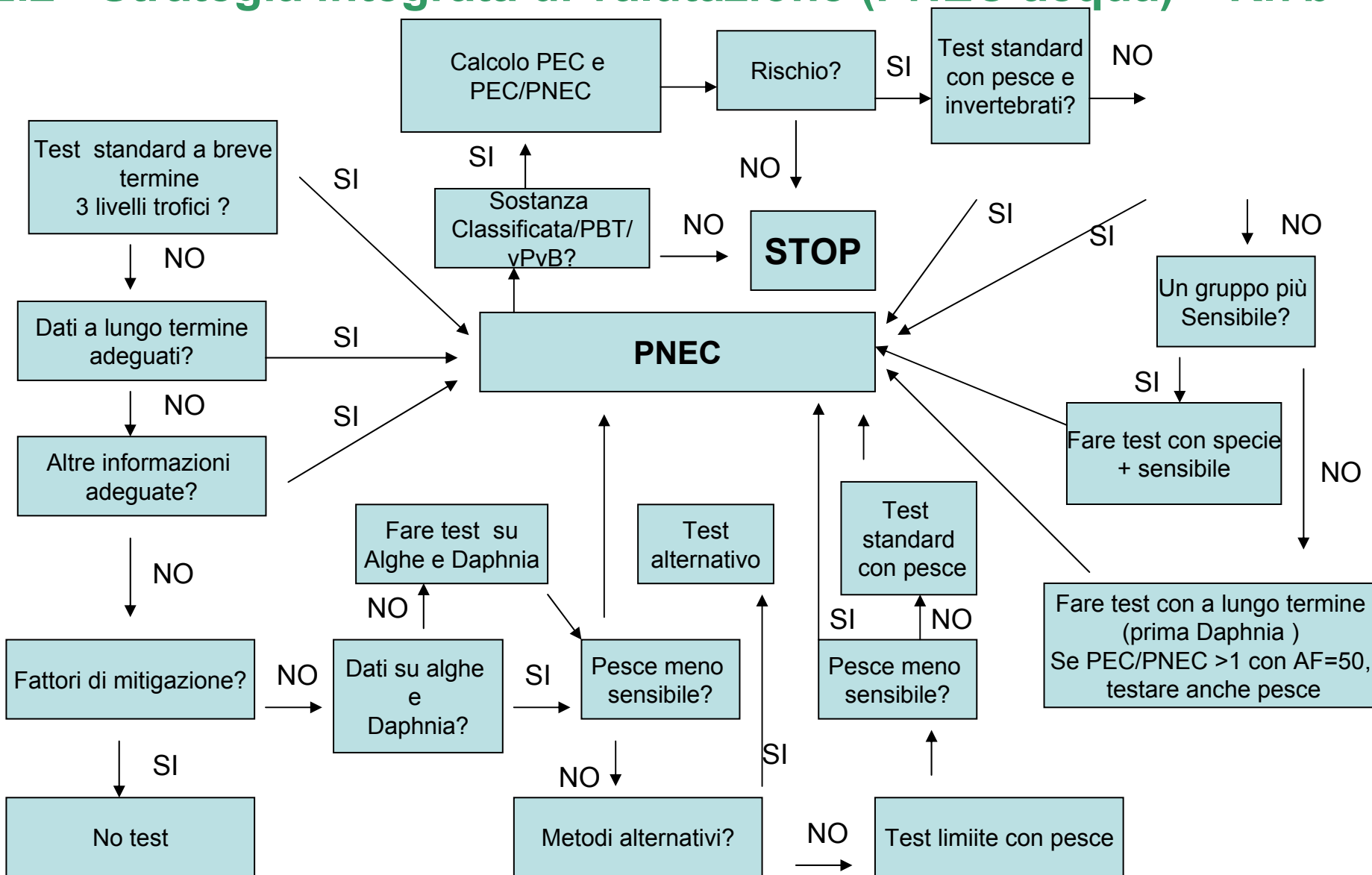
2 - Valutazione del pericolo per il comparto acqua



2.1 - Studi richiesti per il comparto acqua

- **≥ 1 t/a**
(Annex VII) tossicità a breve termine su invertebrati (Daphnia, 48h EC50)
inibizione della crescita nelle piante (alghe, 72h EC_r50)
- **≥ 10 t/a**
(Annex VIII) + tossicità a breve termine sui pesci (96h LC50)
- **≥ 100 t/a**
(Annex IX)
Annex I + tossicità a lungo termine su invertebrati (Daphnia, NOEC)
e pesci (NOEC) - a seconda dei risultati del CSA,
- **≥1000 t/a**
(Annex X) -----

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

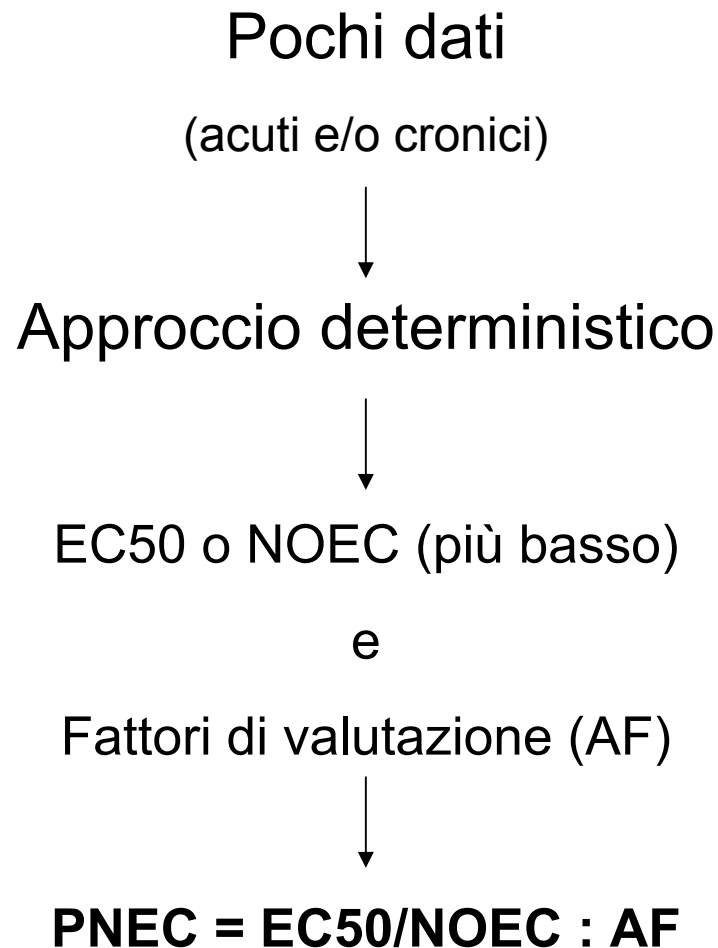


Pesci -Test a lungo termine

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

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

3 – Derivazione della PNEC



3.1 - 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
- Relazione tossicità - tempo

3.2 - PNEC – approccio probabilistico

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*

3.2.1 - 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*)

3.2.2 - HC5 – Criteri per valutare l'incertezza

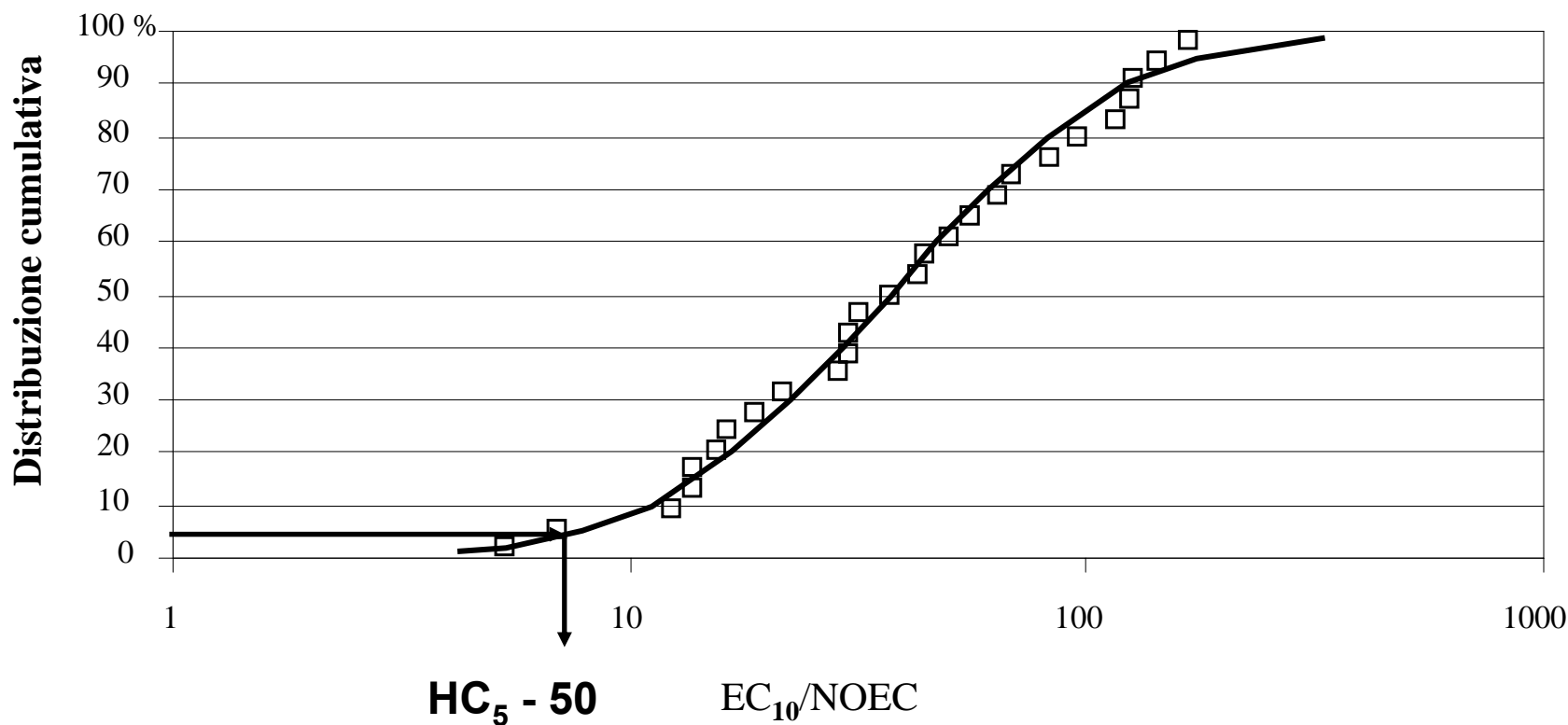
- Qualità della base di dati
- Diversità e rappresentatività dei taxa
- Modo d'azione
- Incertezza statistica della stima HC5 (variabilità inter-specie)
- Analisi dei punti che cadono al di sotto dell'HC5
- Confrontabilità delle singole NOEC con dati di mesocosmo/campo
- Influenza del tipo di medium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

3.2.3 Derivazione della HC5

Diversità e rappresentatività dei taxa

Incertezza statistica della stima HC5 (variabilità inter-specie)

Analisi dei punti che cadono al di sotto dell'HC5



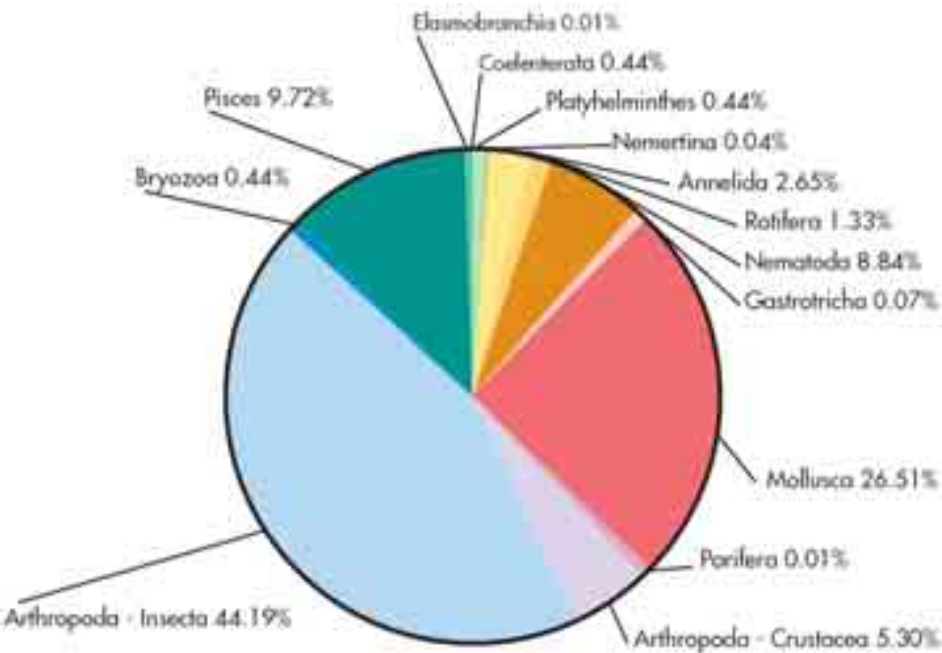
$$\text{PNEC} = \text{HC5-50} : \text{AF (1-5)}$$

4 - Comparto mare

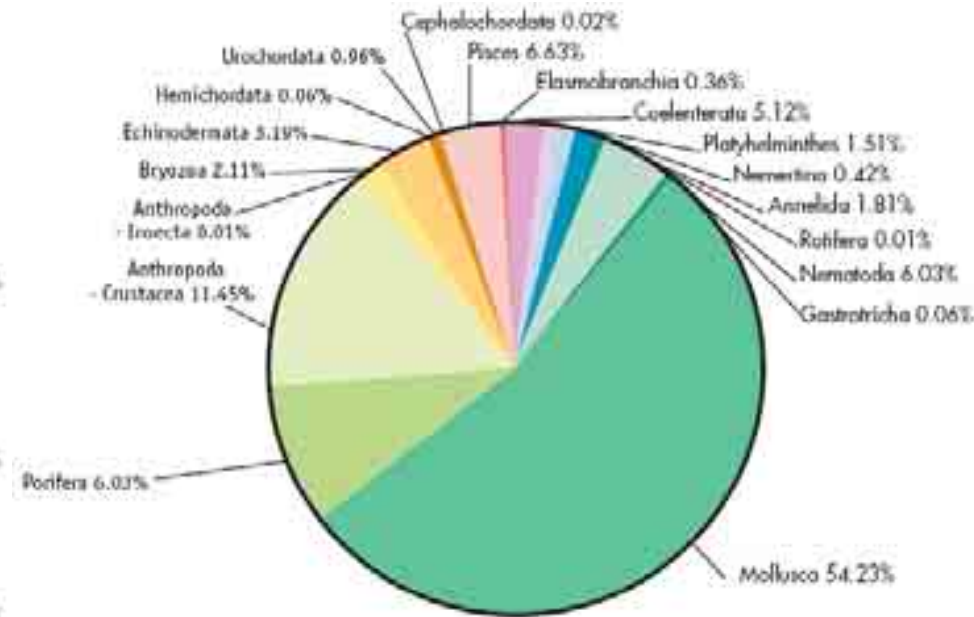
- Sensibilità paragonabile di specie d'acqua dolce e marine
- Dati tossicologici di specie d'acqua dolce possono essere usati al posto o in aggiunta a quelli di specie marine
- Alcuni taxa marini poco o non rappresentati tra gli organismi di acqua dolce (anellidi, molluschi, echinodermi)

Da: Review ECETOC(2001)

Acqua dolce



Mare



Da: European Center for Ecotoxicology and Toxicology of chemicals (ECETOC), (2001)– Risk assessment in marine environments

5 - 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.

5.1 - PNEC sedimenti

- EPM (metodo di ripartizione)

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

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

- Approccio deterministico
- Approccio probabilistico

*) densità dei solidi sospesi umidi

5.1.2 - 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)

Dati di campo

6 - 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

6.1 - 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

7 - 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