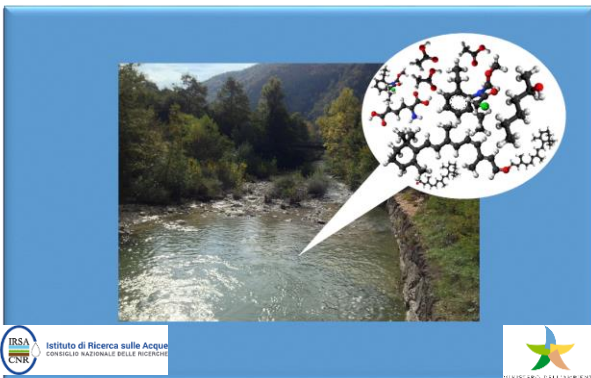


Materiali di Riferimento a supporto dei metodi ecotossicologici (EBM) per la classificazione delle acque superficiali

Stefania Balzamo, Monica Potalivo
(ISPRA)



VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital Workshop

25 giugno 2020

Normativa europea sulle acque

- Direttiva 2000/60/CE Direttiva Quadro Acque
- Direttiva 2008/105/CE Direttiva figlia sulle sostanze prioritarie
- Direttiva 2009/90/CE
- DIRETTIVA 2013/39/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 12 agosto 2013 che modifica le direttive 2000/60/CE e 2008/105/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital Workshop

25 Giugno 2020

Normativa italiana

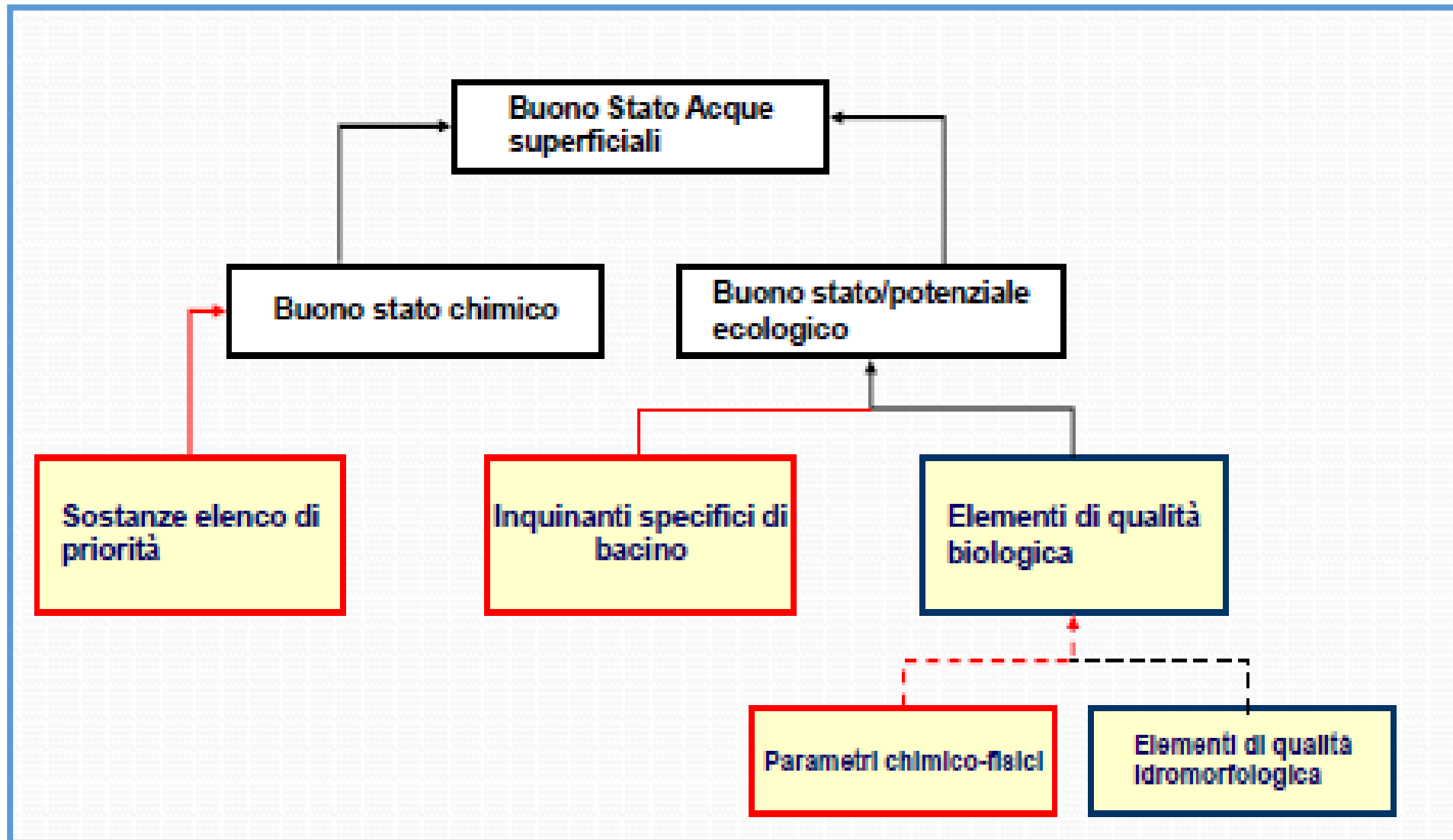
- DM 56/2009 (Monitoraggio dei corpi idrici – SQA)
- DM 260/2010 (Classificazione corpi idrici ed SQA)
- D.Lgs.219/2010 attuazione della Direttiva 2008/105/CE e della Direttiva 90/2009/CE specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque
- D.Lgs. 172/2015 Attuazione della Direttiva 2013/39/UE che modifica le Direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital Workshop

25 Giugno 2020

Classificazione dello stato dei corpi idrici



Digital workshop

25 Giugno 2020

Il monitoraggio “Effect based”

- Integrazione con l’analisi degli effetti biologica livello di bacino: partendo dall’evidenza di effetti ecologici/ecotossicologici si giunge all’identificazione dell’inquinante che causa questi effetti

- Correlazione tra qualità ecologica e chimica

Impieghi degli EBM in Europa

- ❑ Repubblica Ceca: impiega gli EBM per individuare rischi annessi all'ambiente acquatico
- ❑ Danimarca: utilizza gli EBM nel monitoraggio delle acque
- ❑ Germania: gli EBM vengono impiegati per la caratterizzazione dei sedimenti nei dragaggi
- ❑ Olanda: utilizza gli EBM da diversi anni sia nei monitoraggi che nella caratterizzazione dei sedimenti
- ❑ Regno Unito: è in fase di sviluppo un approccio per la caratterizzazione dei sedimenti che prevede l'impiego sia di metodi chimici che di EBM
- ❑ Norvegia: gli EBM vengono utilizzati nella caratterizzazione dei sedimenti

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital Workshop

25 Giugno 2020

Impieghi degli EBM in Italia

- ❑ Gli EBM sono utilizzati nella valutazione dello stato di qualità nelle acque marino-costiere e di transizione quando si registrano dei superamenti nei sedimenti
- ❑ Sono anche impiegati a supporto della WFD nei programmi di monitoraggio e richiesti prima di effettuare l'immissione in mare dei sedimenti dragati
- ❑ Vengono utilizzati nella caratterizzazione e classificazione dei rifiuti e scarichi urbani ed industriali (caratteristica di pericolo HP14 – ecotossico).

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital Workshop

25 Giugno 2020

Materiali di Riferimento

- ❑ **Materiale di riferimento certificato** Materiale di riferimento caratterizzato da una procedura metrologicamente valida per una o più proprietà specificate, accompagnato da un certificato di materiale di riferimento che fornisce il valore della proprietà specificata con l'incertezza associata e riporta una dichiarazione di riferibilità metrologica (ISO Guide 30:2015)
- ❑ **Materiale di riferimento** Materiale sufficientemente omogeneo e stabile rispetto ad una o più proprietà specificate, che si è stabilito essere idoneo per uno scopo definito in un processo di misura (ISO Guide 30:2015)

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital Workshop

25 Giugno 2020

RM prodotti per “Testing comparability of existing and innovative bioassays for water quality assessment: the 2012 Europe-wide exercise” organizzato dal JRC

	ISPRA RM040	ISPRA RM041	ISPRA RM042	ISPRA RM043	ISPRA RM044
<i>Sostanze Prioritarie organiche</i>	Concentrazione µg/L (10000xSQA)	Concentrazione µg/L (1000xSQA)	Concentrazione µg/L (1000xSQA)	Concentrazione µg/L (10000xSQA)	Concentrazione µg/L (1000xSQA)
Atrazina	6000	600	600		
BaP	1.7	0.17	0.17		
Clorfenvinfos	1000	100			
Clorpirifos	300	30	100		
DEHP	13000	1300	30		
Diclofenac	1000	100	1300		
Diuron	2000	200	100		
17 beta-estradiolo	4	0.4	200		
Fluorantene	63	6.3	0.4		
Isoproturon	3000	300	6.3		
4-Nonilfenolo	3000	300	300		
Simazina	10000	1000	300		
<i>Sostanze Emergenti</i>					
Carbamazepine			500		
Sulfametossazolo			600		
Triclosan			20		
DEET			44000		
Bisphenolo A			1500		
<i>Metalli</i>				40000	4000
Ni				8000	800
Cd					
<i>Solvente</i>	Metanolo	Metanolo	Metanolo	Acqua, 2% HNO3	Acqua, 2% HNO3

RM prodotti per «2nd World-wide exercise» organizzato dal JRC nel 2018-2019 (1)»

	ISPRA RM076	ISPRA RM077	ISPRA RM078	ISPRA RM081	ISPRA RM082
<i>Sostanze Prioritarie organiche</i>	Concentrazione µg/L (10000xSQA)	Concentrazione µg/L (10000xSQA)	Concentrazione µg/L (10000xSQA)	Concentrazione µg/L (10000xSQA)	Concentrazione µg/L (10000xSQA)
Atrazina	6000	6000		6000	6000
BaP	1.7	1.7		1.7	1.7
Clorfenvinfos	1000	1000		1000	1000
Clorpirifos	300	300		300	300
DEHP	13000	13000		13000	13000
Diclofenac	1000	1000			
Diuron	2000	2000		2000	2000
17 beta-estradiolo	4	4			
Fluorantene	63	6.3		63	6.3
Isoproturon	3000	3000		3000	3000
4-Nonilfenolo	3000	3000		3000	3000
Simazina	10000	10000		10000	10000
<i>Sostanze Emergenti</i>					
Carbamazepine		500			500
Sulfametossazolo		600			600
Triclosan		20			20
DEET		44000			44000
Bisphenolo A		1500			1500
<i>Metalli</i>					
Ni			40000		
Cd			8000		
<i>Solvente</i>	Metanolo	Metanolo	Acqua, 2% HNO3	Metanolo	Metanolo

RM prodotti per «2nd World-wide exercise” organizzato dal JRC nel 2018-2019 (2)»

Selettività EBM

	ISPRA RM083	ISPRA RM084
<i>Sostanze Prioritarie organiche</i>	Concentrazione µg/L (10000xSQA)	Concentrazione µg/L (10000xSQA)
Estrone (E1)	4	0.4
17 beta-estradiolo (E2)	4	0.4
17 alfa-etinilestradiolo (EE2)	0.35	0.035
<i>Solvente</i>	Metanolo	Metanolo

Saggi testati nell' ambito del "2nd World-wide exercise" organizzato dal JRC nel 2018-2019 " organizzato dal JRC (1)

Saggio
<i>Brachionus calyciflorus</i> : Inibizione della riproduzione (ISO 20666)
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematode): inibizione della crescita, accumulo lipidico, attività e pompaggio faringeo
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematode): stimolazione della risposta proteica a diversi fattori di stress
CALUX (AR-CALUX, ER-CALUX, AhR-CALUX e PPAR-CALUX)
<i>Chironomus riparius</i> : letalità acuta secondo OECD 235
<i>Chironomus riparius</i> : letalità a 10 giorni secondo OECD 219
<i>Chlamidomonas reinhardtii</i> : inibizione della crescita e della fotosintesi
<i>Daphnia magna</i> EN ISO 6341: saggio acuto di immobilizzazione
<i>Daphnia magna</i> CSN ISO 10706: saggio di riproduzione
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish): FET (EN ISO 15088)
<i>Dictyostelium discoideum</i> : mortalità, riproduzione e stabilità della parete lisosomiale
EASZY (saggio) su embrioni transgenici di zebrafish
ER-binding/attivazione mediante saggio MELN e GeneBLAzer
<i>Escherichia Coli</i> : stimolazione dei bio markers
Induzione della luciferasi nelle linee cellulari MDA-kb2 e AREc32

Saggi testati nell' ambito del "2nd World-wide exercise" organizzato dal JRC nel 2018-2019 " organizzato dal JRC (2)

Saggio
LIBER Assay: diminuzione della fluorescenza dovuta alla competizione di legame verso il recettore estrogenico
Microcosmi in acqua marina: produzione batterica e concentrazione dei pigmenti.
Neutral Red (NR): Saggio di citotossicità
<i>Oncorhynchus mykiss</i> : valutazione della vitalità cellulare del sistema branchiale della trota iridea
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (ISO 8692): inibizione della crescita
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : effetti sulla fotosintesi
<i>Thalassiosira pseudonana</i> : inibizione della crescita
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Saggio acuto di tossicità, inibizione della crescita e genotossicità
<i>Salmo salar</i> : valutazione di citossicità su epatociti delle forme giovanili del salmon atlantico (xCELLigence systems)
<i>Salmo salar</i> : ELISA (valutazione di Vtg e Zrp); qRT-PCR (valutazione di Vtg, ERa, Zrp)
TLC: analisi ormoni
<i>Vibrio fischeri</i> Microtox EN ISO 11348-3: inibizione della bioluminescenza
<i>Xenopus laevis</i> : FETAX (ASTM E 1439), teratogenicità e malformazioni negli embrioni
YES e YAS: attività estrogenica e androgenica

Metrology for monitoring endocrine disrupting compounds under the Water Framework Directive (18NRM01 EDC-WFD) (1)

Scopo del progetto

Sviluppo, ottimizzazione e validazione di metodi di misura sia chimici (e.g. basati sulla spettrometria di massa) che biologici (i.e. EBM) per la determinazione degli estrogeni interferenti endocrini (EDC, Endocrine Disrupting Chemicals). Ai metodi corrisponderà un LOQ $< 1/3$ SQA ed un'incertezza di misura inferiore al 50% al livello dell' SQA.

Valutazione della distribuzione degli EDC nei vari comparti ambientali (i.e. SPM e frazione disciolta).

Produzione di materiali di riferimento certificati in matrice reale o in matrice sintetica contenenti EDC

Confronto delle prestazioni di metodi validati nell'ambito del progetto mediante un circuito di interconfronto

Metrology for monitoring endocrine disrupting compounds under the Water Framework Directive (18NRM01 EDC-WFD) (2)

Saggio

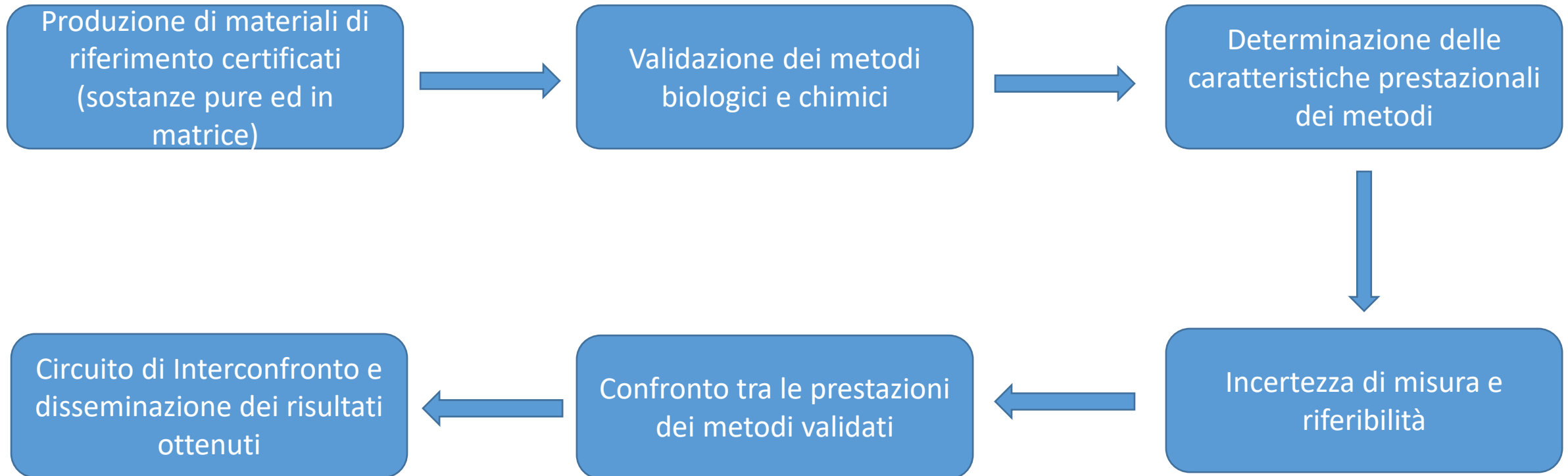
CALUX secondo la ISO 19040:3 (2018) “Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay”

Ligand Binding Estrogen receptor (LIBER) Assay

mYES (mutated Yeast): saggio basato su lieviti modificati per aumentare l'affinità verso E2 ed EE2

Saggio in vitro del recettore estrogenico (ERA) mediante linee cellulari modificate MELN

Metrology for monitoring endocrine disrupting compounds under the Water Framework Directive (18NRM01 EDC-WFD) (3)



Validazione del saggio E α -CALUX (1)

Ripetibilità:

Verrà valutata la ripetibilità intermedia nel corso delle analisi complete. Ogni sostanza verrà analizzata in triplicato. Inoltre per garantire indipendenza dei risultati ogni analisi verrà ripetuta per 3 giorni distinti

Recupero:

- ❑ **Singole sostanze**, il recupero può essere calcolato come il rapporto tra la media delle concentrazioni misurate (n=3) e il valore della concentrazione nominale.
- ❑ **Miscela**, il recupero viene valutato come il rapporto tra le EEQ misurato e l'EEQ nominale, ma poiché le attività estrogeniche della miscela derivano dall'azione sinergica di tutte le sostanze presenti, è necessario calcolare le attività estrogeniche nominali previste attraverso l'uso del fattore di equivalenza dello standard di riferimento specifico (EEF). Le attività estrogeniche previste per una miscela sono calcolate come la sommatoria delle concentrazioni nominali di ciascun composto presente nella miscela moltiplicate per il proprio EEF:

$$EEF = \frac{EC50_{Estradiolo}}{EC50_{Composto}}$$

$$EEQ_{nominale} = \sum Conc_{Composto} \cdot EEF_{Composto}$$

Validazione del saggio E α -CALUX (2)

LOQ:

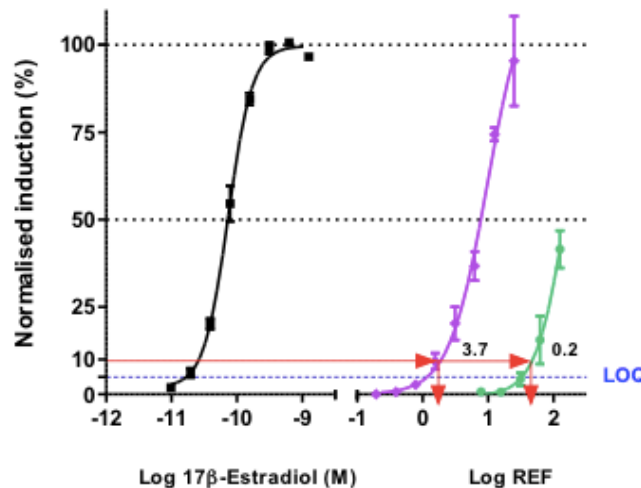
I dati del riferimento e dei campioni vengono normalizzati attraverso la seguente equazione:

$$\text{Induzione}_{\%} = \frac{\text{Risposta} - \text{Bottom}}{\text{Top} - \text{Bottom}}$$

La curva dose-risposta dei dati normalizzati viene impostata dallo 0% (riferito alla risposta del solvente) e il 100% (riferito alla massima risposta dello standard di riferimento).

Il LOQ viene quindi calcolato come 10 volte lo scarto tipo della media dell'induzione del solvente di controllo per ogni piastra del test.

Kunz et al. 2017,
Water Research 110
(2017) 378-388



Validazione del saggio E α -CALUX (3)

Specificità:

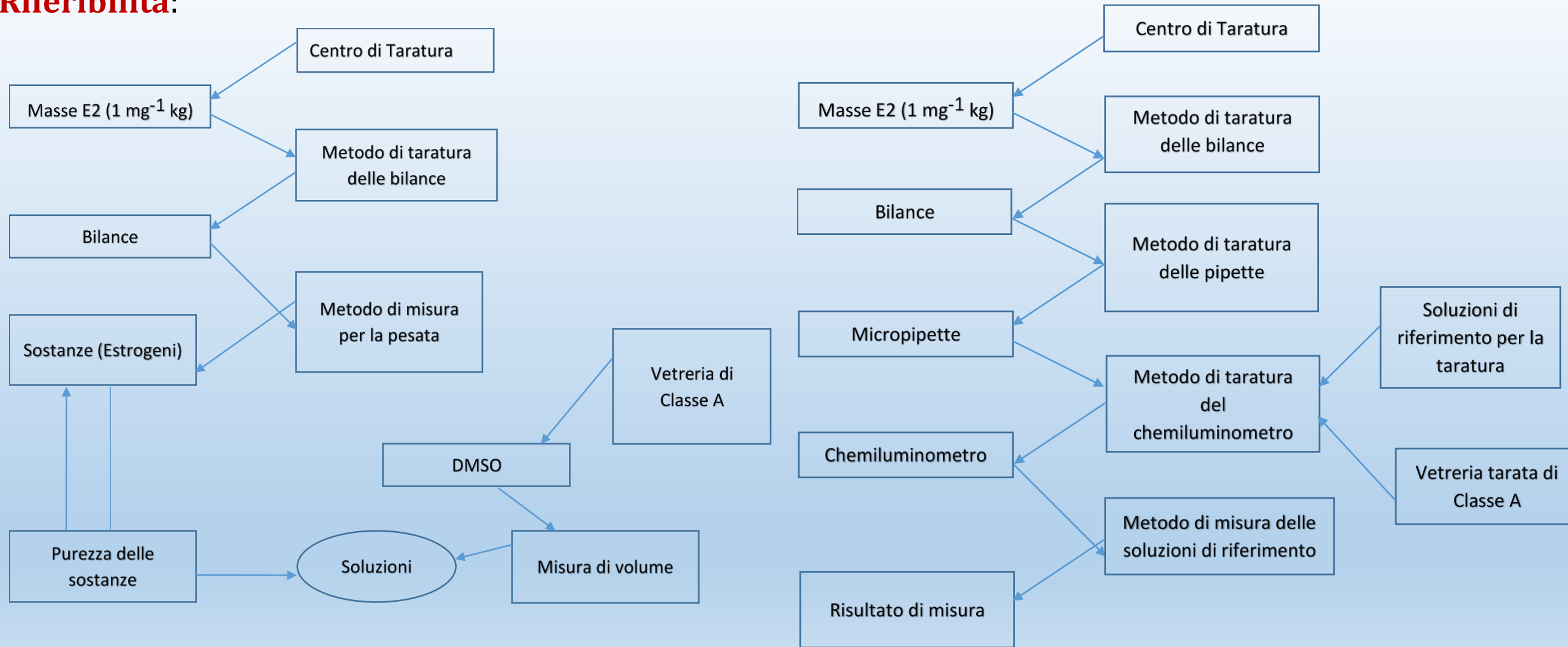
Quando si analizzano le miscele attraverso l'uso del saggio E α -CALUX, la risposta che si ottiene si riferisce all'attività estrogenica complessiva delle sostanze coinvolte. Quando si parla *EEQ concentration*, infatti, si intende la concentrazione di estradiolo che provoca lo stesso effetto dell'attività combinata di tutti i composti aventi proprietà estrogeniche agoniste e antagoniste presenti in un determinato campione. Non è, quindi, possibile determinare una specificità in termini di capacità del metodo di poter distinguere una determinata sostanza (in una miscela) da un'altra avente comportamento simile, in quanto le sostanze che possono avere affinità per il recettore estrogenico sono molto numerose.

Sensibilità:

Viene seguito l'approccio riportato nella guida OECD del 2009 in cui la sensibilità del metodo viene dimostrata usando 3 sostanze di riferimento. Vengono stabiliti i valori di accettabilità in base al metodo utilizzato coinvolgendo l'uso di: un estrogeno forte (E2), un estrogeno molto debole (17 α -metiltestosterone) e un composto molto debole (corticosterone), preparati ad opportune concentrazioni. Le seguenti 3 sostanze di riferimento possono garantire la sensibilità del saggio in quanto i limiti di accettabilità sono tabellati nella guida OECD.

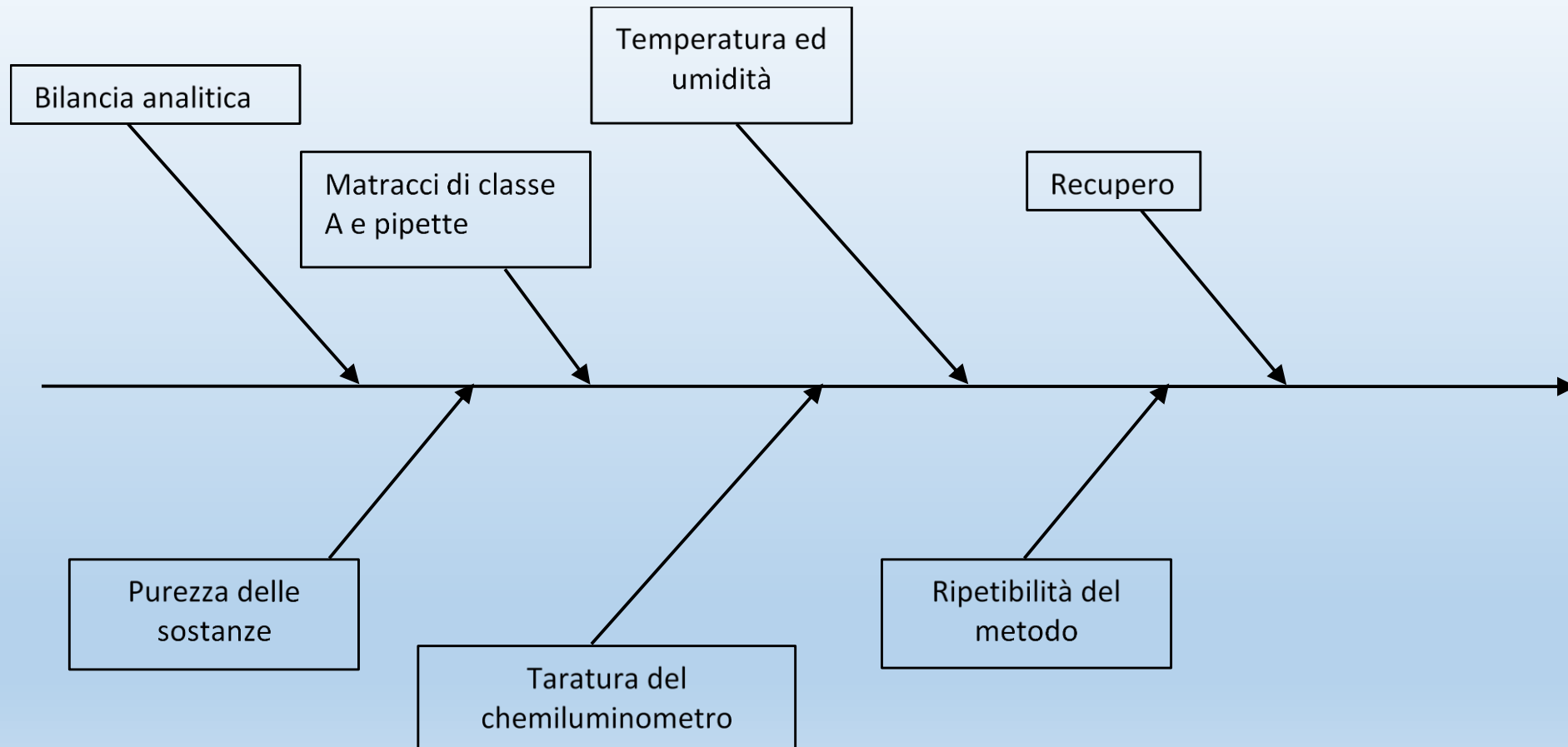
Validazione del saggio Er α -CALUX (4)

Riferibilità:



Validazione del saggio Er α -CALUX (5)

Incertezza di misura:



Grazie dell'attenzione