



DIPARTIMENTO
AMBIENTE E SALUTE



CENTRO NAZIONALE PER LA PREVENZIONE
E IL CONTROLLO DELLE MALATTIE
Network per la prevenzione e la sanità pubblica



Mario Carere ***La valutazione ecotossicologica nella VIS***

*Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Salute,
Reparto Ecosistemi e Salute*

*29-30 novembre 2022
Sala Tergeste, Savoia Excelsior Palace
Riva del Mandracchio, 4 TRIESTE*

Istituto Superiore di Sanità
e
Ministero della Salute
Direzione generale della Prevenzione Sanitaria

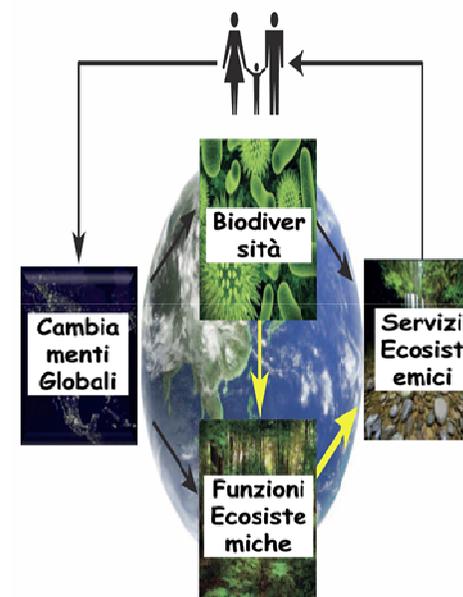


ECOSISTEMI E SALUTE

L'evoluzione socio-economica e le conseguenti attività produttive comportano il rilascio e l'immissione nell'ambiente di molteplici contaminanti emergenti la cui diffusione, interazione ed effetti sulla salute umana sono spesso ignoti o poco conosciuti.

Necessità di applicare approcci e metodologie innovative per poter prevenire gli effetti avversi ed i potenziali impatti sulla salute;

Come raccomandato negli obiettivi strategici di sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite (SDG), nel piano di azione europeo ambiente e nell'ambito dell'agenda strategica di ricerca europea (Horizon 2020) è necessario adottare un approccio di prevenzione che si basi sulla conoscenza e lo studio degli ecosistemi nella loro globalità.



IL CONTESTO EUROPEO

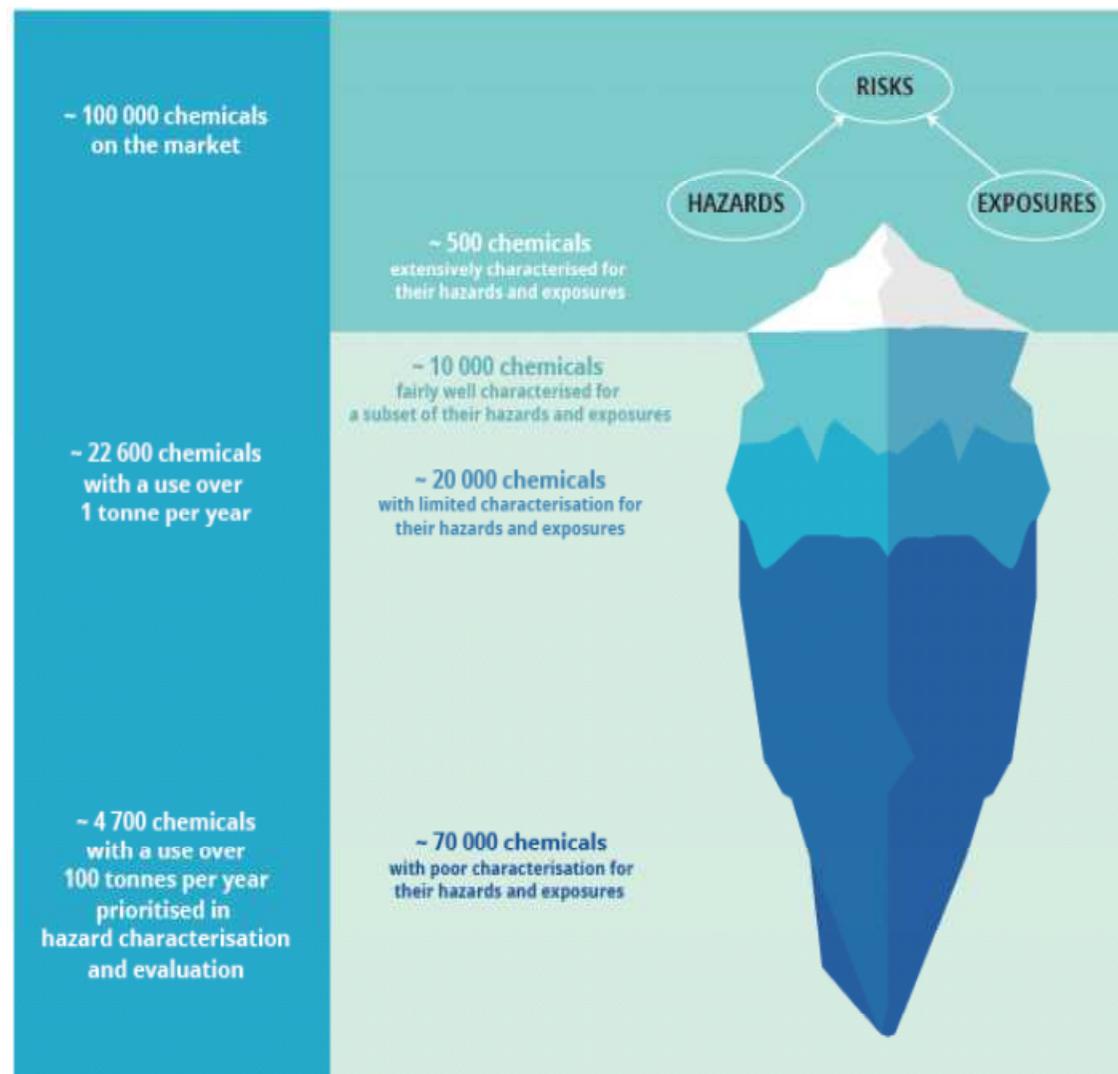
EU Chemicals Strategy for Sustainability-2020

While not all hazardous chemicals raise the same concerns, certain chemicals cause cancers, affect the immune, respiratory, endocrine, reproductive and cardiovascular systems, weaken human resilience and capacity to respond to vaccines and increase vulnerability to diseases.

In addition, chemical pollution is one of the key drivers putting the Earth at risk, impacting and amplifying planetary crises such as climate change, degradation of ecosystems and loss of biodiversity.

People and other living organisms are daily exposed to a wide mix of chemicals originating from various sources.

The safety of chemicals in the EU is usually assessed through the evaluation of single substances, or in some cases of mixtures intentionally added for particular uses, without considering the combined exposure to multiple chemicals from different sources and over time



COSA E' L'ECOTOSSICOLOGIA?

Il termine «Ecotossicologia» è stato coniato da Renè Truhaut nel 1969

«the branch of toxicology concerned with the study of toxic effects, caused by natural or synthetic pollutants to the constituents of ecosystems, animal (including human), vegetable and microbial, in an integral context»

Nel 2022

L'ecotossicologia è la scienza che studia e rileva gli effetti delle sostanze chimiche nell'ecosistema tenendo conto di tutti i livelli di organizzazione biologica: molecolare, cellulare, di organismo, popolazionistico.

RUOLI DELL'ECOTOSSICOLOGIA

- Uso regolatorio autorizzativo per immissione nel mercato di sostanze chimiche (es. pesticidi, farmaci ad uso umano e veterinario, biocidi, sostanze chimiche autorizzate attraverso il regolamento REACH).
- Utilizzo nella derivazione di valori protettivi per gli ecosistemi (esempio standard di qualità ambientali corpi idrici, valori limite sedimenti) e nella valutazione di rischio ambientale (PEC/PNEC)
- Utilizzo nei monitoraggi ambientali (effect based methods), nella valutazione della qualità degli scarichi, nella valutazione della qualità dei sedimenti e....**nella VIS**

PROCEDURA VIS ECOTOSSICOLOGICA (RILEVAMENTO DEGLI EFFETTI)

- L'indagine ecotossicologica rappresenta uno strumento valido e riconosciuto a livello europeo fondamentale per la gestione e la comprensione dei potenziali effetti avversi derivanti dall'esposizione multipla a contaminanti inclusi quelli non contemplati dalla normativa (emergenti).
- Gli effetti rilevati negli ecosistemi (es. genotossici, embriotossici, neurotossici) possono poi manifestarsi anche nell'uomo e di conseguenza tale metodologia può essere utilizzata come un sistema di allerta precoce ed anche di screening.

METODI ECOTOSSICOLOGICI (EFFECT-BASED)

- Saggi Biologici *In Vivo*: studio degli effetti delle sostanze chimiche su organismi viventi in studi di laboratorio (es. alghe, daphnia, embrioni di pesci).
- Saggi Biologici *In Vitro*: Studi degli effetti delle sostanze chimiche effettuati su colture cellulari o batteriche (es. test di Ames, test luciferasi)
- Biomarkers: Studi su biomarcatori in organismi nativi e/o stabulati (es. metallothioneine, imposex, micronuclei)

PROCEDURA VIS ECOTOSSICOLOGICA (SELEZIONE DEI SAGGI)

- L'indagine ecotossicologica dovrebbe prevedere una scelta appropriata e sito specifica di test (almeno su tre livelli trofici) comprendenti saggi di ecotossicità acuta/cronica e saggi di eco-genotossicità in quanto gli effetti mutageni/genotossici sono strettamente correlati alla salute umana.
- Per le acque dolci si suggeriscono saggi su alghe, invertebrati, embrioni di pesce
- Per i suoli test su lombrico (test di riproduttività) e di fitotossicità
- Per l'ambiente marino si suggeriscono in genere i saggi previsti dal decreto dragaggi 173/2016
- Biomarkers e Saggi in vitro sono anche accettati



Ecotossicità

Acuta

- Per tossicità acuta si intende l'insorgenza dell'effetto, dopo un breve lasso di tempo, a seguito di un'esposizione ad una sostanza chimica.
- L'obiettivo dei test di tossicità acuta è quello di misurare l'effetto dovuto all'esposizione di sostanze pure o miscele la cui durata sia compresa, di norma, tra 15 minuti e 96 ore.
- Tipico esempio è il microtox che riguarda la soppressione dell'emissione di luce in batteri luminescenti, mentre saggi con crostacei e pesci durano in media 24-96 ore.
- L'approccio maggiormente impiegato è la stima dell' EC_{50} che è la concentrazione di una sostanza che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per esposizione ambientale.

Cronica

Esposizioni lunghe, relativamente alla durata della vita delle specie in esame, vengono impiegate nei saggi per la misura delle risposte a lungo termine.

La NOEL (no observed effect level) è il più alto livello di concentrazione al quale non si è manifestato alcun effetto. Di norma si riferisce a saggi di tossicità cronica.

La LOEL (lowest observed effect level) rappresenta il più basso livello al quale è stato possibile evidenziare un effetto.

Obiettivi degli studi eco-genotossicologici

**Individuare segnali precoci di
contaminazione con studi
sugli effetti sul DNA (causati
da agenti mutageni), prima
che ci sia un impatto sugli
ecosistemi e sulla salute
umana**

**Esempi: Comet assay,
micronucleus test, Ames**

PROCEDURA VIS ECOTOSSICOLOGICA (SCELTA DEI SAGGI e MATRICI)

La scelta sarà effettuata:

- Sulla base della tipologia di ciclo industriale e potenziali inquinanti emessi
- Sulla base di informazioni riguardanti l'ecosistema in cui verrà realizzata l'opera (ambiente naturale, ambiente costruito, tipologia degli ecosistemi acquatici o terrestri)
- I test possono essere effettuati sulle acque marino costiere (anche sedimenti), su suoli (anche elutriati), acque superficiali, sotterranee, aria.



Procedura ecotossicologica nella VIS

Procedura VIS Ecotossicologia (Risultati)

Sulla base dei risultati ottenuti attraverso l'indagine ecotossicologica, si possono verificare diverse situazioni:

- 1) Nessuna presenza di ecotossicità e eco-genotossicità e quindi nessun avviso di allerta per la VIS.
- 2) Ecotossicità o eco-genotossicità rilevata: necessità di integrare nell'ambito della VIS le informazioni acquisite o investigare con maggior dettaglio gli inquinanti emessi; in caso di ecotossicità acuta il livello di allerta è maggiore.
- 3) Ecotossicità e eco-genotossicità rilevata: fase di massima allerta, necessità di messa a punto/rimodulazione di misure di riduzione del rischio adeguate.

Interpretazione dei risultati dei Test

I criteri di valutazione ed interpretazione dei test ecotossicologici sono variabili

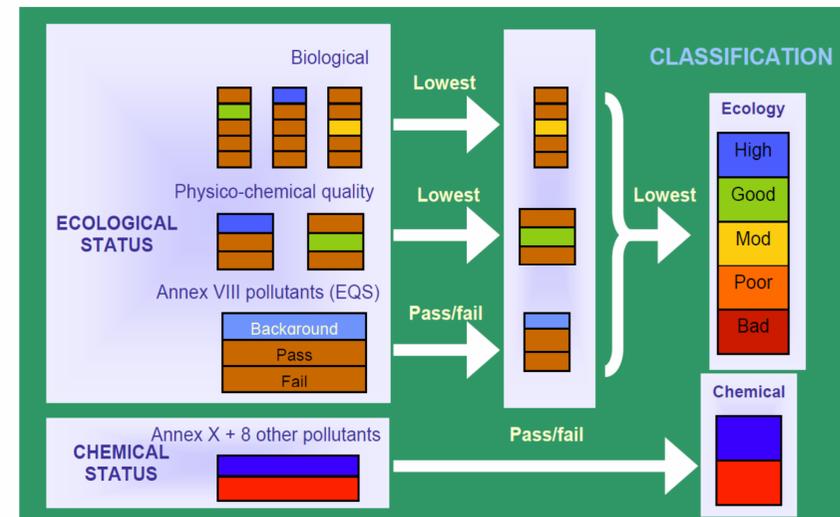
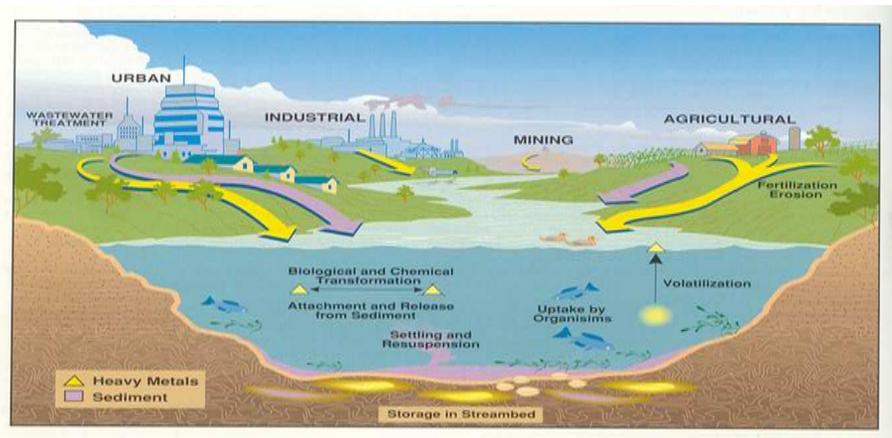
- 1) I test «in vivo» hanno criteri di valutazione che si basano ad esempio su percentuali di effetti (es. mortalità) e di presenza/assenza di specifici effetti subletali (es. malformazioni in embrioni). Per i test in vivo è spesso utile effettuare una valutazione complessiva della batteria di test.
- 2) I test di ecogenotossicità si possono valutare in relazione ad esempio al dato del controllo interno del test, comparando il dato con quello di altri siti (es. di bianco), o anche attraverso presenza/assenza dell'effetto (considerata l'importanza della genotossicità).
- 3) I test in vitro con colture cellulari possono essere interpretati attraverso «trigger values» numerici (simili ai valori normativi chimici) utilizzando fattori di tossicità equivalenti (es. recettore arilico o estrogenico) tenendo in considerazione un composto di riferimento (es. beta-estradiolo, 2,3,7,8 TCDD).

Esempio di Approccio Ecosistemico

- Raggiungimento del buono stato di tutti i corpi idrici superficiali e sotterranei per proteggere la salute umana e l'ambiente attraverso un approccio ecosistemico.

La Direttiva Quadro Acque

- Valutazione dello stato di qualità attraverso il monitoraggio di sostanze prioritarie, inquinanti specifici e chimico-fisici, elementi di qualità biologica, parametri idromorfologici.
- Raggiungimento di obiettivi di qualità attraverso l'approccio combinato (migliori tecnologie disponibili/buone prassi ambientali)

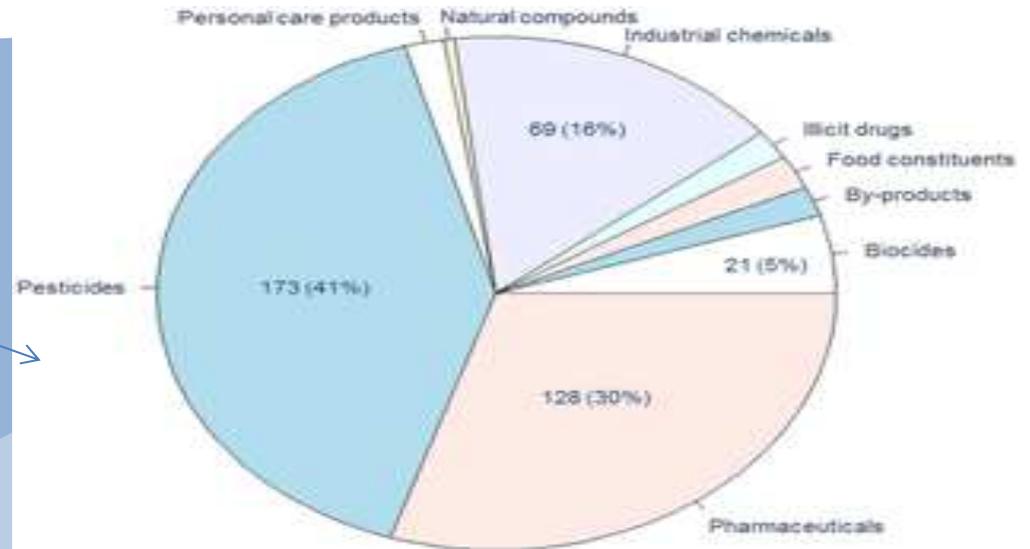


CONTAMINAZIONE CHIMICA DEGLI ECOSISTEMI ACQUATICI: PROBLEMI EMERGENTI

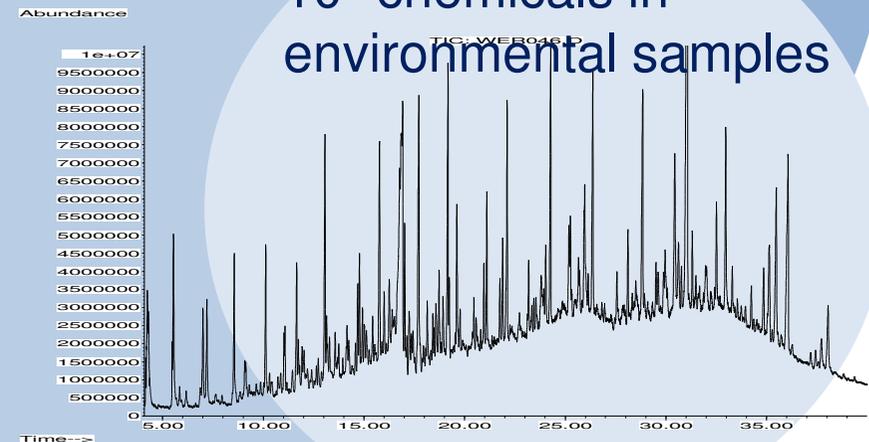
- La legislazione include solo una piccola frazione delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente
- La maggior parte delle sostanze attualmente in uso non sono incluse.
- Effetti avversi spesso inesplorati sia per ambiente che per uomo
- Scarsa conoscenza dei rischi derivanti dalle miscele



Necessità di un nuovo
approccio



10⁵ chemicals in daily use (REACH)
10⁴ chemicals in environmental samples



Contaminanti Emergenti

Elenco di Controllo/Watch list-Direttiva Quadro Acque

1. 17-Alfa-etinilestradiolo (EE2) (pillola contraccettiva)
2. 17-Beta-estradiolo (E2) (ormone estrogenico), Estrone (E1)
3. Diclofenac (antiinfiammatorio-voltaren)
4. 2,6-ditert-butyl-4-metilfenolo (antiossidante)
5. 2-Etilsil 4-metossicinammato (filtri crème solari)
6. Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina (antibiotici)
7. Metiocarb (pesticida)
8. Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam, Clothianidin, Acetamiprid) (pesticidi neonicotinoidi)
9. Oxadiazon (pesticidi)
10. Triallate (pesticidi)

Commission Decision 2015/495/UE

Contaminanti Emergenti presenti in ambienti fluviali europei

- Biocidi
- Disinfettanti
- Droghe
- Ritardanti di Fiamma
- Sostanze chimiche di origine industriale
- Nanomateriali (organici ed inorganici)
- Sostanze Perfluorate
- Prodotti per la cura delle persone (es. cosmetici, creme solari, fragranze)
- Farmaci ad uso umano e veterinario
- Pesticidi e loro metaboliti
- Plastificanti
- Surfattanti
- Microplastiche

***Emerging contaminants in River Ecosystems-
Springer International Volume-2015.***

Ecotossicologia nella direttiva quadro acque: proposta di un nuovo approccio di monitoraggio per la tutela dell'ambiente e della salute umana



Nell'ambito del WG Chemicals della Direttiva Quadro Acque, l'Italia ha coordinato, insieme alla Svezia, un gruppo di esperti che ha elaborato un rapporto tecnico europeo sull' **applicazione di metodi di monitoraggio basati sugli "effetti"** a supporto delle analisi chimiche nei diversi programmi di monitoraggio nei corpi idrici superficiali.

Il gruppo di lavoro è composto da 46 esperti provenienti da diversi Stati Membri, da associazioni industriali europee, dal network europeo Norman e da rappresentanti del JRC della Commissione Europea.

Wernersson AS, Carere M, et al. (2015): The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe*, 2015; 27 (1) DOI:10.1186/s12302-015-0039-4.

PUBLIC RELEASE: 13-MAR-2015

Novel monitoring tools tackle chemical surface waters pollution

New report prepared in the context of the EU water framework directive

SPRINGER



With the socio-economic developments of the last decades, new emerging compounds have been produced, released and discharged through different point and diffuse sources in European rivers, lakes, and marine-coastal and transitional waters. Treated municipal wastewaters contain a multitude of organic chemicals including pharmaceuticals, hormones, and personal care products, which are continuously introduced into aquatic ecosystems. Their possible effects on the environment and human health is often unknown. The exposure of organisms, communities and humans to mixtures of chemical compounds must be considered to be the most common exposure scenario, but for technical and economical reasons, it is not possible to detect and quantify all chemical substances that are present in the aquatic environment.

To tackle the challenge of current and future chemical pollution, new monitoring and diagnostic tools are needed that can integrate and support the chemical monitoring

Media Contact
Joan Robinson
joan.robinson@springer.com
49-622-148-78130
[@SpringerSBM](#)
<http://www.springer.com>

More on this News Release

Novel monitoring tools tackle chemical surface waters pollution
SPRINGER

JOURNAL
Environmental Sciences Europe

KEYWORDS

BIO-CHEMISTRY

BIOLOGY

Environmental Sciences Europe

Technical Report on **Aquatic Effect-Based Monitoring Tools**



**Technical Report on
Aquatic Effect Based
Monitoring Tools.**

Technical Report 2014-
077. EU Commission.
doi: 102779/7260.

Objectives of effect-based tools in **WFD** context:



Screening tools: pressures & impacts
assessment, prioritise water bodies investigation



Early warning systems



Effects from **mixtures** and compounds **not
evaluated by chemical analysis**



Additional support to **chemical & ecological**
monitoring in water and sediment assessment

TECHNICAL REPORT EUROPEO (2021)

(Chairs: Italia, Germania, Svezia, JRC)

Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment in the Water Framework Directive

Report to the CIS WG Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on effect-based methods (EBMs). Mandate 2016-2018.

6.1.5. To assess relevant effects from chemical mixtures in the fresh water environment using a battery of <i>in vivo</i> assays	79
6.2. Assess sediment quality (application 4)	81
6.2.1. <i>In vivo</i> assays to assess sediment quality	81
6.3. EBMs to assess status of regulated substances	82
6.3.1. To assess dioxin activity	82
6.3.2. To assess TBT effects (imposes) in the marine environment	84
6.3.3. To assess secondary poisoning from DDT	85
7. CONCLUSIONS AND PROPOSED ACTIONS	87
7.1. Final Considerations	87
7.2. Possible use of EBM in the WFD monitoring and assessment Programmes	88
7.3. Next steps	89
8. References	91
ANNEX I. MoA examples	95
ANNEX II. Inventory results	103
Lists of EBMs in the inventory	103
Linking biomarker to MoA and WFD relevance	107
Practical aspects of biomarkers	114
Regulatory implementation aspects for biomarkers	118
ANNEX III. Trigger value procedures	128
Proposal of a tiered approach as a general framework to define EBT-values	139
Safety and screening value of tiered EST for surface water assessments – MoA 'estrogen receptor activation'	143
Preliminary results from the ongoing effect-based watch list project	146
Description of sensitivity factor EBT approach (Tier 3)	147
Methods	148
Results	149
Effect-Based Trigger value (EBT) compilation using the tiered EBT approach	152
ANNEX IV. Integrated platform for EBMs and application of Reference Materials	159
Example of a possible EU-wide exercise with Reference Materials	160
ANNEX V. Example of a Battery of EBMs	161
ANNEX VI Neurotoxicity Outlook	163

CONTENTS

1. GLOSSARY AND TERMS AND DEFINITIONS	5
2. SUMMARY	9
3. INTRODUCTION	10
3.1. Current legislative framework and approach	10
3.2. Need for a holistic approach	13
3.2.1. Limitations of the current WFD approach to regulate toxic chemicals	13
3.2.2. Effect-based methods (EBM)-Generality	14
3.2.3. EBMs in regulations and guidance documents	15
3.2.4. Window of opportunity for EBMs	18
4. ACTIVITY OF THE SUB GROUP EBM	20
4.1. Terms of reference	20
4.2. Meetings of the EBM activity	21
5. DELIVERABLES	22
5.1. Mode of Action (objective 1 and 2)	23
5.2. Inventory and selection of EBMs (objective 3, 5 and 7)	26
5.2.1. Biomarker inventory	32
5.2.2. <i>In vivo</i> assays	44
5.2.3. <i>In vitro</i> assays	45
5.3. EBM Assessment criteria (objective 4)	49
5.3.1. Biomarkers	50
5.3.2. <i>In vivo</i> assays	53
5.3.3. Effect-Based Trigger values (EBT) for <i>in vitro</i> assays	54
5.4. Ecological indicators (objective 6)	58
5.4.1. WFD biological quality elements, BQE	58
5.4.2. Metagenomics	60
5.4.3. EBMs as supportive components for ecological status	62
5.5. EBMs vs pressures and measures (objective 8)	62
5.5.1. Identifying water bodies "at risk"	62
5.5.2. Which EBMs?	63
5.5.3. Identifying measures and assessing their effectiveness	64
6. PROPOSAL – Scenarios that require the application of EBMs in support of the WFD	67
6.1. EBMs to cover non-monitored substances and mixtures in WFD and MSFD context (application 1-3)	68
6.1.1. To assess estrogenic activity using <i>in vitro</i> assays	68
6.1.2. To assess genotoxic activity using <i>in vitro</i> assays	71
6.1.3. To assess ecologically relevant effects from chemical mixtures in the marine environment using biomarkers	73
6.1.4. To assess ecologically relevant effects from chemical mixtures in the fresh water environment using biomarkers	77

Proposta di Direttiva Europea



Brussels, 26.10.2022
COM(2022) 540 final

2022/0344 (COD)

Proposal for a

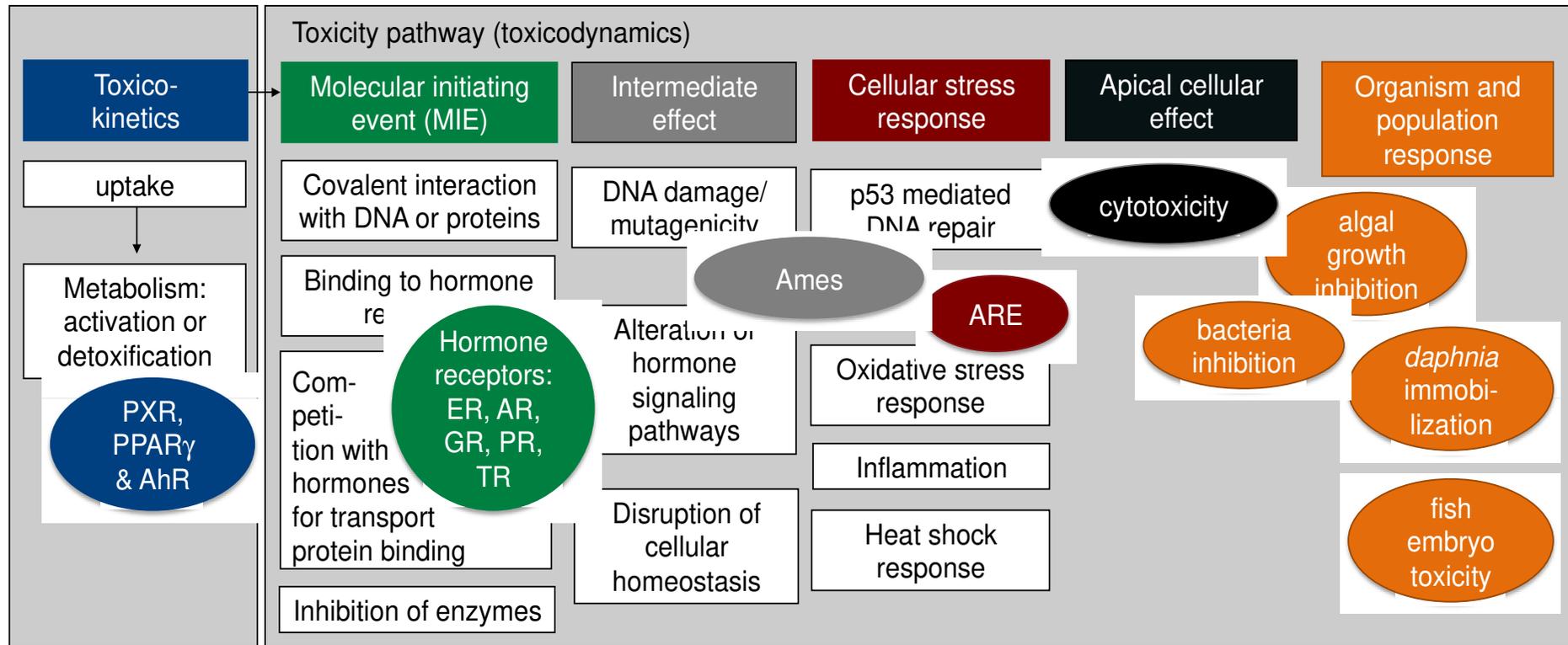
DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy

Nuova definizione di standard di qualità ambientale (Proposta di Direttiva Europea) per la protezione dei corpi idrici

- Environmental quality standard means the concentration of a particular pollutant or group of pollutants in water sediment or biota not to be exceeded in order to protect human health and the environment or a trigger value for the adverse effect on human health or environment of such a pollutant or group of pollutants measured using an appropriate effect-based method

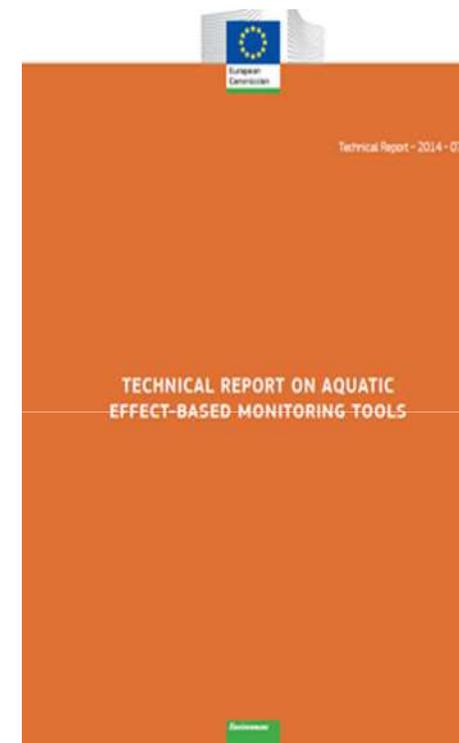
Quali saggi sono utili per valutare la qualità delle acque? (Ad oggi sono stati raccolti 130 metodi)



Saggi che riescono a coprire gli effetti piu rilevanti nell'ambiente

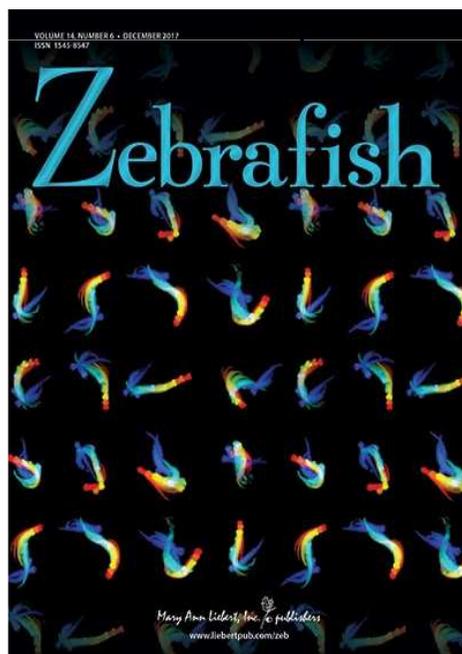
Saggi in vivo utilizzati in Europa

Assay	Test item	Endpoint (unit)	Species	Type of Environment	Exposure
Bacteria	w, ws, e, p	Bioluminescence Enzyme active	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Arthrobacter globiformis</i>	(f/m) (f)	5-10-15 minutes
Algae	w, e, p	Growth	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i> <i>Pseudokirkneriella subcapitata</i> <i>Ceramium tenuicorne</i>	(m) (m) (f) (m)	72 hours 72 hours 72 hours 7 days
Plants	w, e, p ws	Growth Growth	<i>Lemna minor</i> <i>Myriophyllum aquaticum</i>	(f) (f)	7 days 10 days
Rotifera	w, e, p	Mortality	<i>Brachionus plicatilis</i>	(f)	24-48 hours
Crustacea Amphipoda	ws	Mortality	<i>Corophium</i> spp. (and other amphipods)	(m)	10 days
Crustacea Anostraca	w, e, p	Mortality	<i>Artemia franciscana</i>	(m)	24 hours 14 days
Crustacea Copepoda	w, e, p	Mortality	<i>Acartia tonsa</i> <i>Tigriopus fulvus</i>	(m) (m)	96 hours
Crustacea Cladocera	w, e, p	Mobility, mortality, reproduction	<i>Daphnia magna</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i>	(f) (f)	24-48 hours, 21 days
Nematoda	ws	Mortality, fertility, reproduction	<i>Caenorabditis elegans</i>	(f)	96 hours
Anellida	ws	Mortality, reproduction	<i>Lumbriculus variegans</i>	(f)	28 days
Insecta	w, ws	Mortality, reproduction	<i>Chironomus riparius</i>	(f)	48 hours, 28 days
Bivalvia	w, e, p	Development	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Tapes philippinarum</i>	(m) (m) (m)	24-72 hours
Echinodermata	w, e, p	Fertilization Development	<i>Paracentrotus lividus</i> <i>Sphaerechinus granularis</i>	(m) (m)	< 72 hours
Polychaeta	ws	Mortality	<i>Hediste diversicolor</i>	(m)	10 days
Vertebrata (Fish)	w, e, p	Mortality and	<i>Danio rerio</i> (and embryo other species)	(f)	96 hours

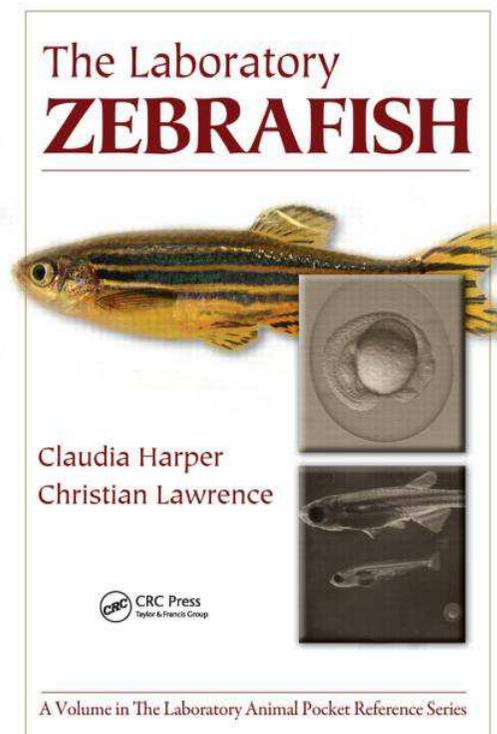


zebrafish negli studi ambiente e salute

- ✓ Sensibile a differenti contaminanti (pesticidi, biocidi, metalli, diossine, farmaci, etc) anche in miscele
- ✓ Indicatore della presenza di inquinanti emergenti e sostanze neurotossiche.
- ✓ Molteplici effetti misurabili (cambiamento di morfologia, genica, comportamento e fisiologia)

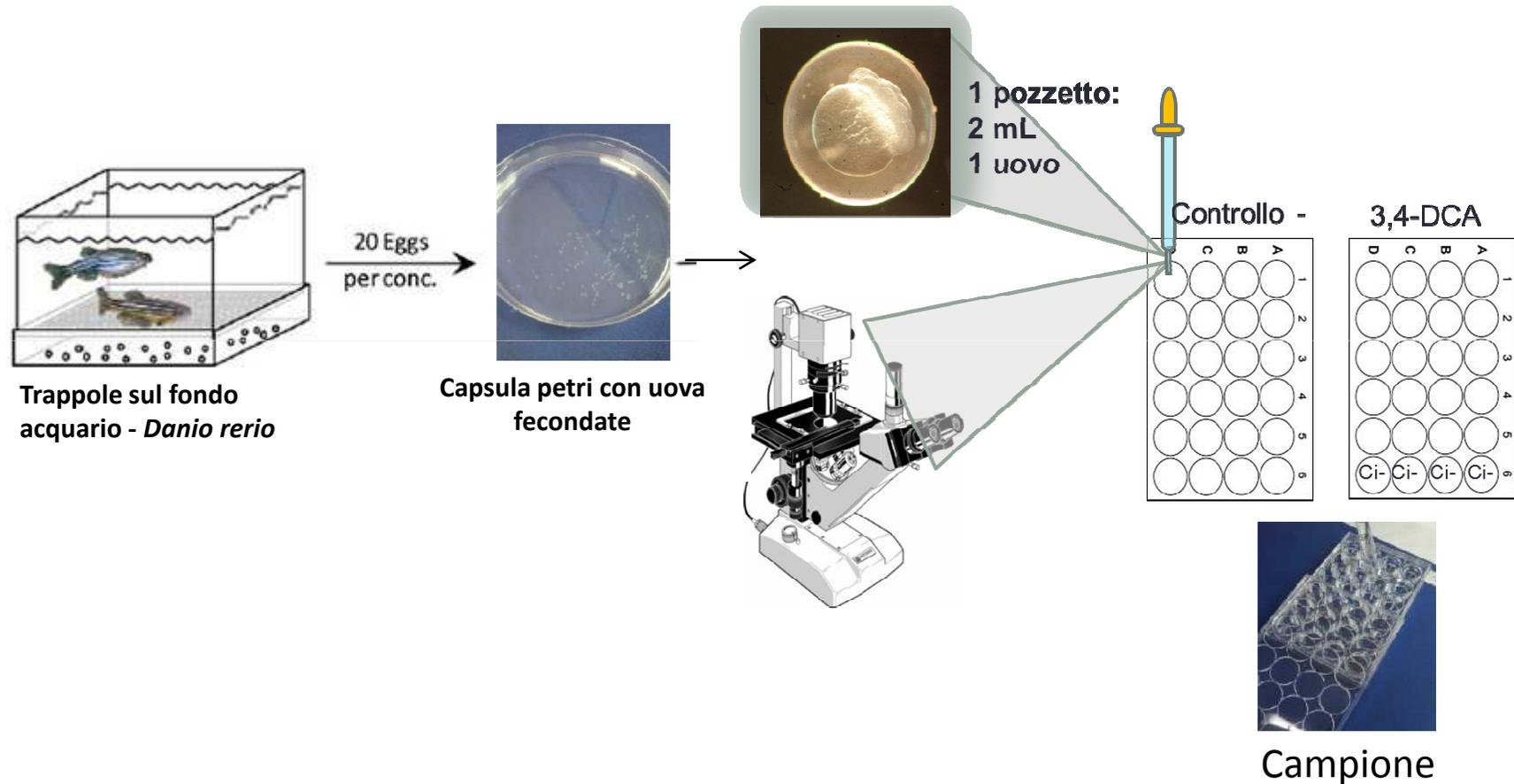


- ✓ Utilizzato in progetti europei per monitoraggi ambientali
- ✓ Inserito nelle batterie ecotossicologiche in studi ambientali
- ✓ Più di 80 pubblicazioni su zebrafish nel Setac Meeting (Copenaghen 2021)
- ✓ OECD 236/2013 - Fish Embryo Acute Toxicity Test



Fish Embryo Acute Toxicity Test

Allestimento del saggio



(Gli effetti rilevati sugli embrioni di zebrafish sono collegati alla protezione della salute umana)

- Effetti sviluppo
- Teratogenicità



Altri endpoints

- Neurotossicità
- Immunotossicità
- Genotossicità
- Cardiotoxicità
- Interferenza endocrina

Table 1

Lethal and sublethal endpoints in the Fish Embryo Test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*)

	Exposure time				
	8 h	24 h	48 h	96 h	108/120 h
Lethal endpoints*					
Coagulation	•	•	•	•	
Tail not detached		•	•	•	
No somite formation		•	•	•	
No heart-beat			•	•	
Lack of hatching					•
Sublethal developmental endpoints					
Completion of gastrula	•				
Formation of somites		•			
Development of eyes		•	•	•	
Spontaneous movement		•	•	•	
Heartbeat/blood circulation			•	•	
Heartbeat frequency			•	•	
Pigmentation			•	•	
Formation of edemata			•	•	
Endpoints of teratogenicity					
Malformation of the head		•	•	•	
Malformation of sacculi/otoliths		•	•	•	
Malformation of tail		•	•	•	
Malformation of heart		•	•	•	
Modified chorda structure		•	•	•	
Scoliosis		•	•	•	
Rachitis		•	•	•	
Yolk deformation		•	•	•	
General growth retardation		•	•	•	
Length of tail **					•



EDITORIAL

***Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research**

Chemosphere 180 (2017) 65–76

H. J



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere



Chemosphere

Volume 186, November 2017, Pages 43–50



CrossMark

Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic

subst

embr

Fabian C



Water Research

Volume 115, 15 May 2017, Pages 9–21



Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing

Sanja Babić ^a, Josip Barišić ^a, Hrvoje Višić ^b, Roberta Sauerborn Klobučar ^c, Natalija Topić Popović ^a,
Ivančica Strunjak-Perović ^a, Rozelindra Čož-Rakovac ^a, Göran Klobučar ^b

Esempi di saggi eco-genotossicologici inclusi nel Technical Report Europeo

Micronucleus assay

The Micronucleus assay is considered a good biomarker of genomic damage and can be used to obtain an indication about the occurrence of permanent and hereditary double DNA strand breaks

- **What is analysed (endpoint; unit):** frequency of MN (FMN‰) and frequency Nucleus Abnormalities (FNA) (with the need to compare results with a blank)
- **Tissue/cells examined:** Can be applied in a range of species (e.g. bivalves and fish). In fish primarily erythrocytes are examined.
- **Method used:** OECD 474 (developed for mammalian cells), Manuali e Linee Guida 32/2005 (APAT). Marine Quality Assurance procedures available through MEDPOL and between particular independent laboratories (Davies & Vethaak 2012)
- **Amount sample needed:** 1000-2000 cells for molluscs (about 20 individual mussels), higher cell numbers for fish (10-20 individual fishes).
- **Possible to use stored samples:** Should be analysed within 3d
- **Possible to use in both limnic and marine environment:** Yes
- **When to take samples:** Seasonal (at least twice a year)
- **Exposure/effect biomarker:** Effect biomarker at early stage with serious potential impact: damage to genetic material of organisms, which could affect their health and potentially also their offspring.
- **Specific/general biomarker:** Specific biomarker in the sense that it measures the effects caused by substances causing permanent and hereditary double DNA strand breaks. Can also respond to water temperature.
- **Costs:** Low



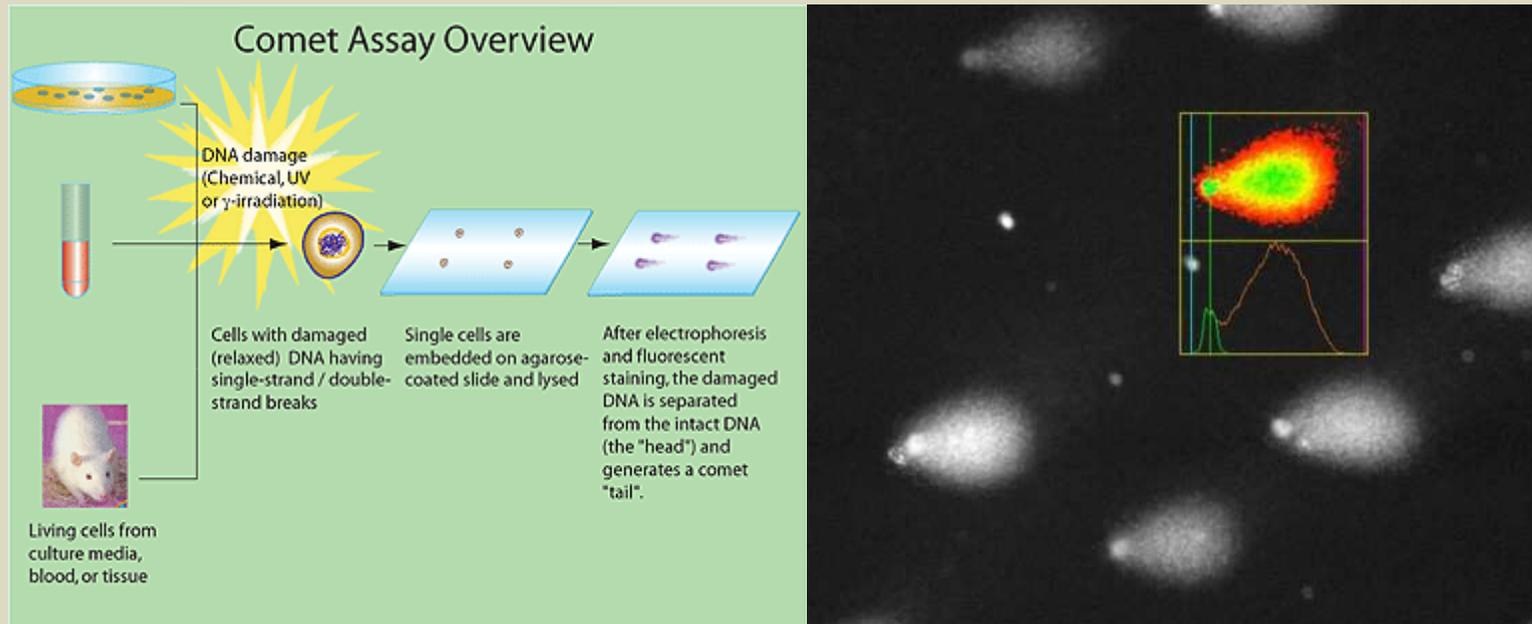
Genetic effects in *Helix aspersa* near a coal plant revealed by the micronucleus test

Silvia Filippi¹ · Roberta Meschini¹ · Sara Spognardi² · Patrizia Papetti³ · Dario Angeletti¹

Accepted: 19 January 2018 / Published online: 5 February 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

In this study we used the common land snail *Helix aspersa*, to detect the mutagenic effect of pollution from a coal plant in central Italy applying the micronucleus test (MN) on snail's haemocytes and evaluating trace elements concentration (As Cd, Pb, Hg, and Zn) in soil and snails

Esempio: Comet assay



Si basa sul principio di elettroforesi su gel a singola cellula (SCGE), è stato sviluppato per valutare la potenzialità di alcuni composti chimici nel determinare danni al DNA.

Dimensioni e numero delle comete sono indice dell'intensità del danno subito.

Innovative replacement methods at the Istituto Superiore di Sanità in the spirit of the 3Rs principle

Edited by
I. De Angelis, L. Ricceri, A. Vitale

Rapporti ISTISAN 22/18

REPLACEMENT STRATEGIES IN FISH ECOTOXICOLOGY

Mario Carere, Ines Lacchetti, Laura Mancini
Department of Environment and Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Introduction

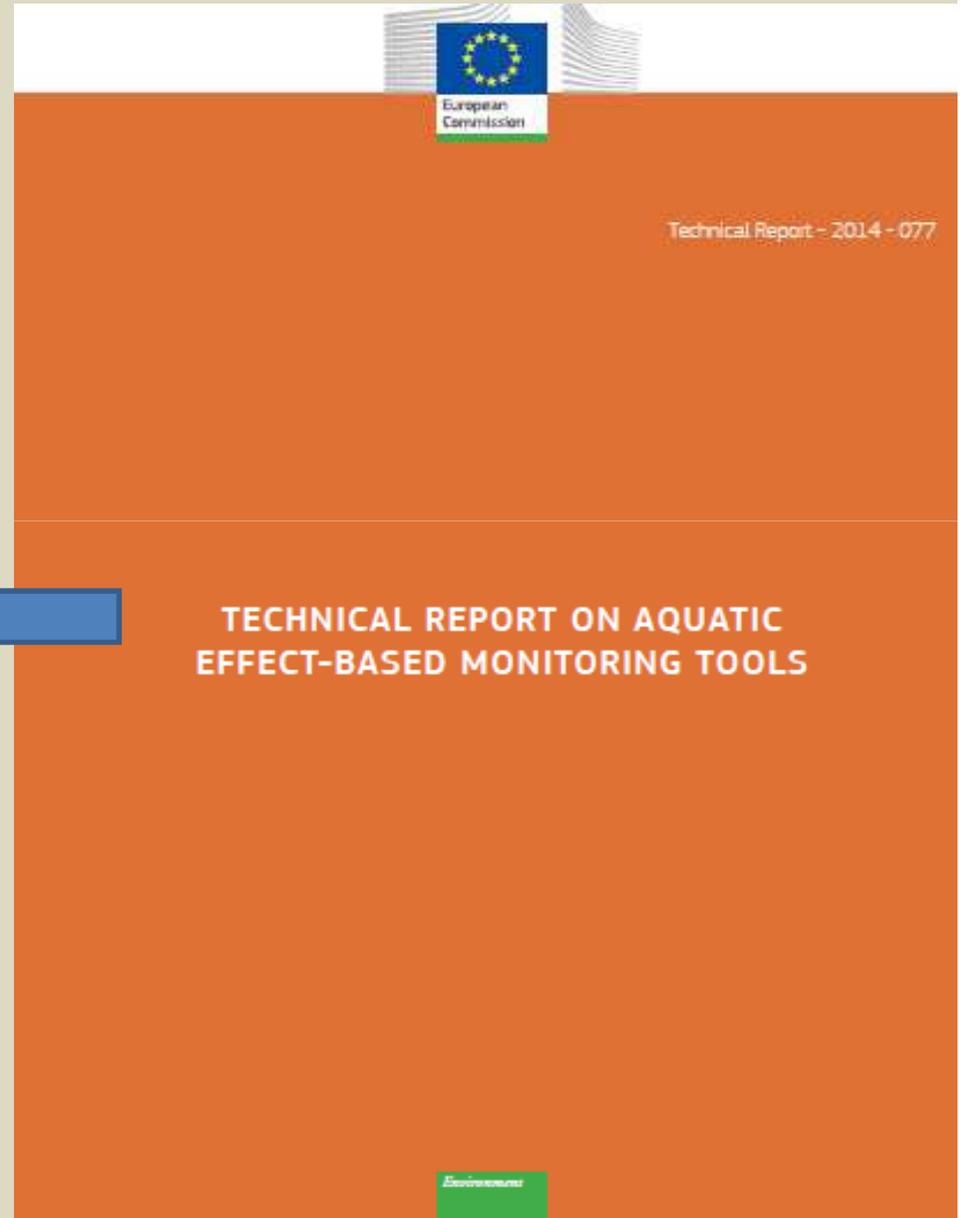
Ecotoxicology represents a relatively young subject that has the aim to study the adverse effects of environmental chemicals at molecular, cellular, individual and population level. There is a growing recognition that for sustainable development it is necessary to ensure prevention of the adverse effects on environment and human health of traditional and emerging chemicals (Mancini & Zapponi, 2002, Bourdeau *et al.*, 1989).

Ecotoxicology will play a key role in the recent European Strategy on chemicals sustainability

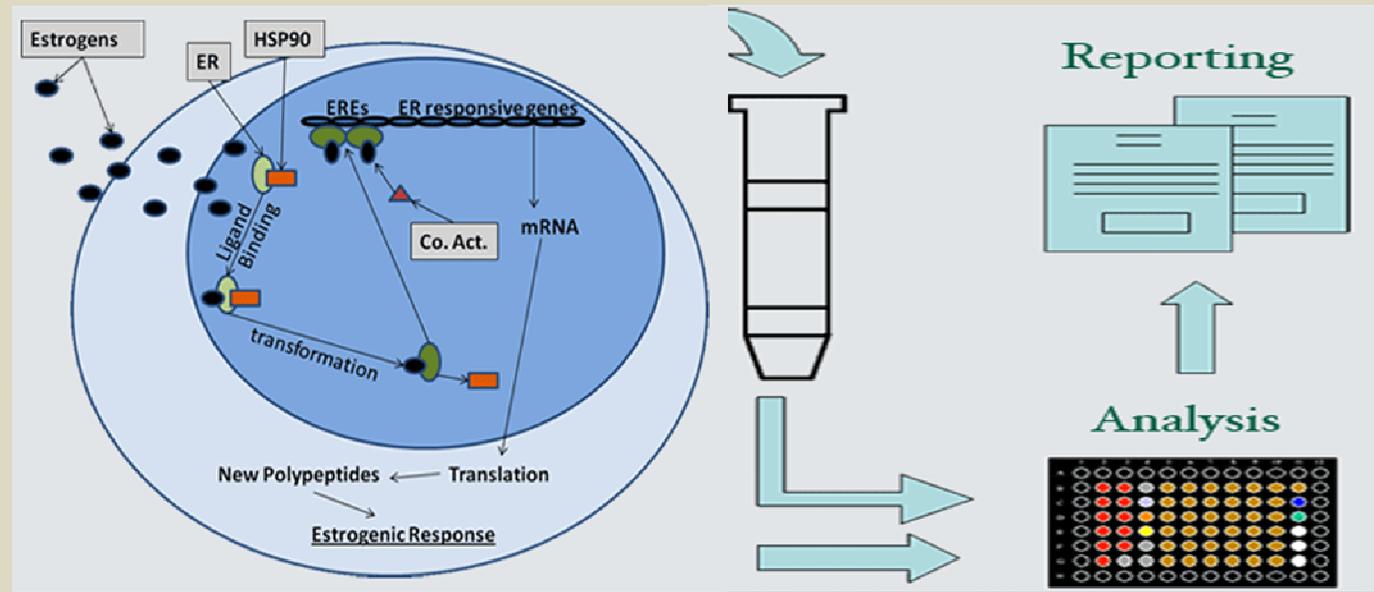
Monitoraggi ambienti acquatici superficiali (Uso saggi in vitro in Europa)

Table 1 *In vitro* assays and their modes of action

Name/s of assay	Mode of action/endpoint
AR CALUX (anti-)	Androgen receptor (activation or blocking)
DR CALUX	AH receptor binding
ER CALUX (anti-)	Alpha and beta/estrogen receptors
GR CALUX (anti-)	Glucocorticoid receptor
PAH CALUX	AH receptor binding
PR CALUX	Progesterone receptor
Acetylcholinesterase inhibition assay	Inhibition of acetylcholinesterase activity
Carboxylesterase inhibition assay	Inhibition of carboxylesterase activity
Ames	Mutagenicity
umuC	Primary DNA damage
TTR-binding	Competition with thyroid hormone for binding to TTR (transport protein)
TRb CALUX	Thyroid receptor beta
EROD	EROD induction
YES	ER receptor
YAS	AR receptor
P-53 accumulation	Genotoxicity
Green screen	Genotoxicity
RYA	ER receptor
ABC assay	Antibiotic activity



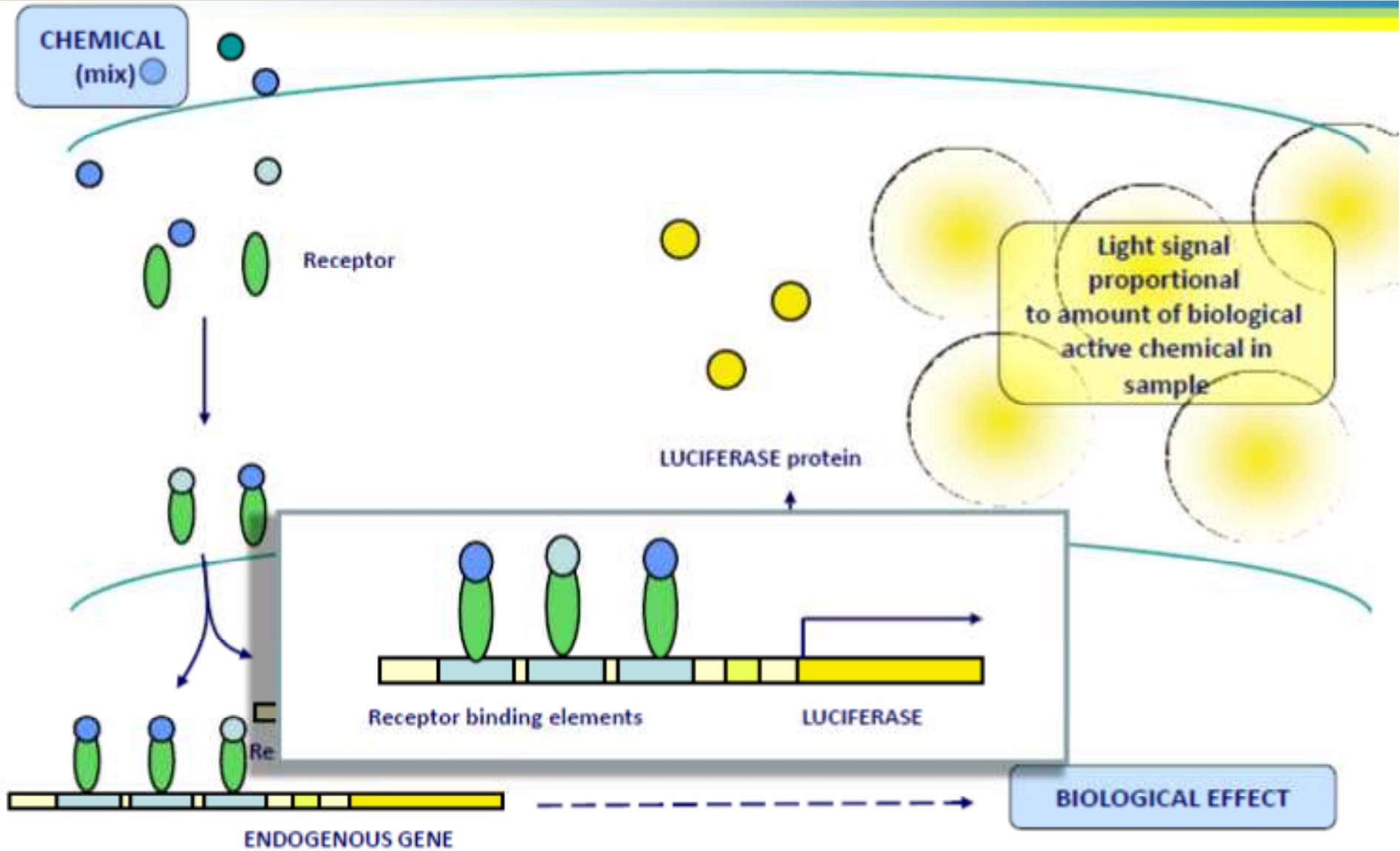
CALUX



L'esempio più noto in Europa è rappresentato dal Calux, un sistema basato su cellule ingegnerizzate con specifici recettori e che utilizzano la luciferasi come gene reporter (chemical-activated luciferase gene expression, CALUX).

Alcuni degli utilizzi attuali sono nell'ambito del monitoraggio ambientale, il CALUX può rispondere ad esempio all'interazione con il recettore arilico (AhR-CALUX) o con il recettore estrogeno alfa (ER-CALUX), per la rilevazione, rispettivamente, della contaminazione complessiva con diossine e PCB-diossina simili oppure con composti ad azione estrogenica.

Principi del reporter gene assays per misurare potenziali tossicità



BREF INDUSTRIA CHIMICA



European
Commission

JRC SCIENCE FOR POLICY REPORT

Best Available Techniques (BAT) Reference Document for Common Waste Water and Waste Gas Treatment/Management Systems in the Chemical Sector

*Industrial Emissions Directive
2010/75/EU
(Integrated Pollution
Prevention and Control)*

Thomas Brinkmann, Germán Giner Santonja,
Hande Yükseler, Serge Roudier,
Luis Delgado Sancho

2016



BREF Industria Chimica- Uso di embrioni Zebrafish

2.4.10.2 Fish or fish egg toxicity

Overview of WWTP performance on fish or fish egg toxicity

Data on toxicity were only gathered during the first survey, but not during the second. Out of a total of 52 directly discharging WWTPs participating in the first survey, fish or fish egg toxicity values in the effluent were reported for 18 WWTPs (or 35 %) (Figure 2.38). Averaging periods are generally not indicated. Average values are based on a number of measurements spanning from 5 to 21.

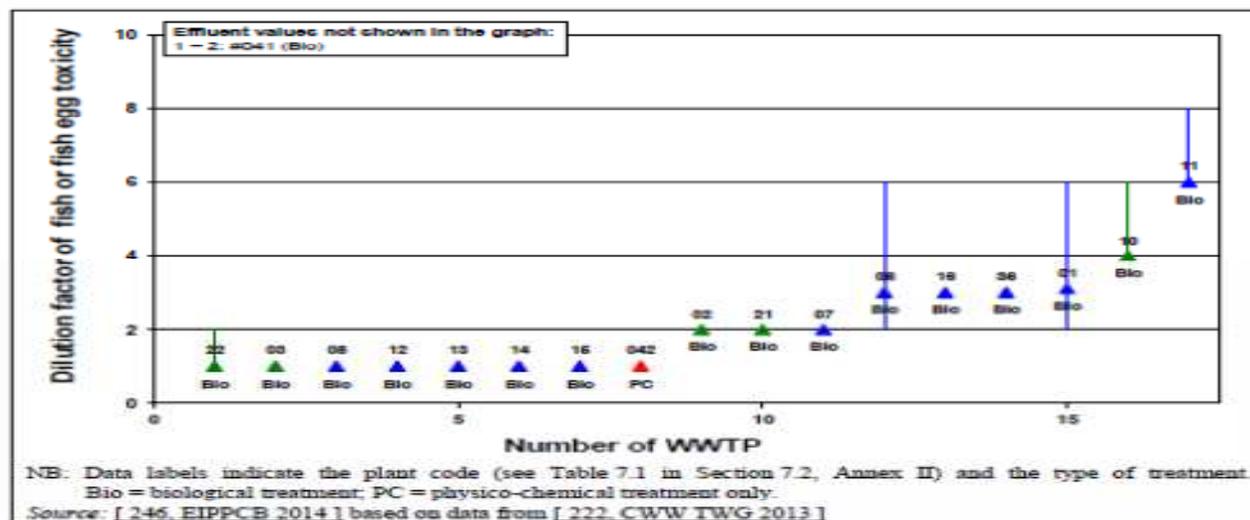


Figure 2.38: Fish or fish egg dilution factors in the effluents of directly discharging WWTPs

BREF Industria Chimica- Uso di daphnia e alga

2.4.10.3 Daphnia toxicity

Overview of WWTP performance on daphnia toxicity

Data on toxicity were only gathered during the first survey, but not during the second. Out of a total of 52 directly discharging WWTPs participating in the first survey, toxicity values in the effluent were reported for 17 WWTPs (or 33 %) (Figure 2.39). Averaging periods are generally not indicated (yearly averages are indicated for two sites). Average values are based on a number of measurements spanning from 5 to 20.

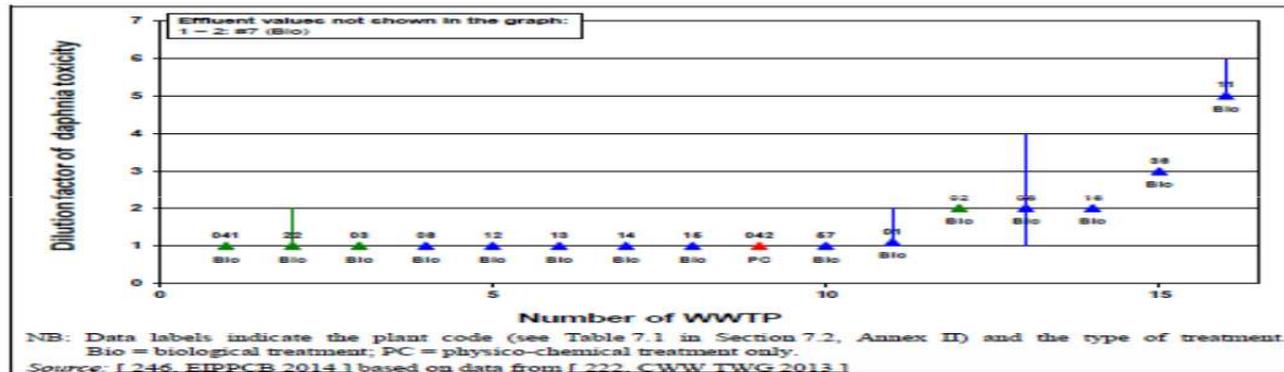


Figure 2.39: Daphnia dilution factors in the effluents of directly discharging WWTPs

2.4.10.4 Algae toxicity

Overview of WWTP performance on algae toxicity

Data on toxicity were only gathered during the first survey, but not during the second. Out of a total of 52 directly discharging WWTPs participating in the first survey, algae toxicity values in the effluent were reported for 16 WWTPs (or 31 %) (Figure 2.40). Averaging periods are generally not indicated (yearly averages are indicated for one site). The number of measurements span from 5 to 22.

DECRETO DRAGAGGI-ESEMPIO DI USO DI SAGGI IN VIVO

Proposta ISPRA-ISS-CNR – Allegati Tecnici art 109, D.Lgs 152/06



*Decreto attuativo dell'art. 109, D.lgs. 152/2006
e ss.mm.ii.*

Proposta di Allegati Tecnici

Ottobre 2015



Nei riferimenti tecnici più recenti vengono dati criteri definiti per la scelta della batteria di saggi biologici (Allegato Tecnico al DM 173/16)



La batteria di saggi biologici deve essere composta comprendendo almeno tre specie diverse, di cui:
 1^a tipologia: un saggio da applicare alla fase solida del sedimento (sedimento tal quale o privato dell'acqua interstiziale);

2^a tipologia un saggio da applicare alla fase liquida (elutriato/acqua interstiziale);

3^a tipologia un saggio con effetti cronici/sub-letali/a lungo termine e di comprovata sensibilità

Gruppo	Batteri		Alghe	Crostei					Molluschi Bivalvi		Echinodermi		
Specie	<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Pheodactylum tricorutum</i> <i>Skeletonema costatum</i>	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	<i>Corophium</i> spp	<i>Acartia tonsa</i>		<i>Tigriopus fulvus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Paracentrotus lividus</i>		
Matrice	fase liquida	fase solida	fase liquida	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	fase liquida	fase liquida	fase liquida		
Endpoint	Bioluminescenza		Crescita algale	Mortalità	Mortalità	Mort . (48 h)	Mor (7 gg)	Sviluppo larvale	Mortalità	Sviluppo larvale	Sviluppo larvale	Fecondazione	Sviluppo larvale
1 ^a tipologia		XA			XA			XC					
2 ^a tipologia	XA		XC	XA		XA			XA			XA	
3 ^a tipologia							XC			XC	XC		XC

A = saggio acuto ; C = saggio cronico/lungo termine/subcronico/risp. subletale

Piani di sicurezza acqua potabile

Journal of Water & Health



© 2022 The Authors

Journal of Water and Health Vol 00 No 0, 1 doi: 10.2166/wh.2022.165

Effect-based monitoring to integrate the mixture hazards of chemicals into water safety plans

Peta Anne Neale ^{a,*}, Beate Escher ^{a,b,c}, Milo de Baat ^d, Magali Dechesne^e, Daniel Deere^f, Jérôme Enault^g, Stefan Kools ^d, Jean-François Loret^g, Patrick Smeets ^d and Frederic Leusch ^a

^a Australian Rivers Institute, School of Environment and Science, Griffith University, Southport, QLD 4222, Australia

^b Department of Cell Toxicology, UFZ – Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig 04318, Germany

^c Environmental Toxicology, Department of Geoscience, Eberhard Karls University Tübingen, Tübingen 72076, Germany

^d KWR Water Research Institute, Nieuwegein, The Netherlands

^e Veolia Research & Innovation, 765 rue Henri Becquerel, Montpellier 34965, France

^f Water Futures, NSW, Australia

^g SUEZ CIRSEE, 38 rue du President Wilson, Le Pecq 78230, France

*Corresponding author. E-mail: p.neale@griffith.edu.au

 PAN, 0000-0002-4418-1654; BE, 0000-0002-5304-706X; Md, 0000-0002-1559-322X; SK, 0000-0001-7257-0000; PS, 0000-0002-6442-9581; FL, 0000-0002-6934-4587



- Total Water Management Strategy
- Water Resources
- Operation and Maintenance of Waterworks
- Water Safety
 - > [Action Plan for Enhancing Drinking Water Safety in Hong Kong](#)
 - > [Drinking Water Quality](#)
 - > [Water Use Tips](#)
 - > [Drinking Water Quality Management System](#)
 - > [Quality Water Supply Scheme for Buildings](#)
 - > [Current Progress of Follow-up Work on Various Recommendations of Commission of Inquiry into Excess Lead Found in Drinking Water](#)
- Major Infrastructure Projects

Biosensing Alert System

Drinking water quality is stringently controlled and monitored by the Water Supplies Department (WSD). All raw (untreated) water undergoes rigorous treatment processes and disinfection at the water treatment works before supplying to the public. Water samples are taken regularly for detailed analysis but testing results for most trace analyses take time to obtain.

With a view to enhancing the capability of rapid and preventive monitoring, the Water Supplies Department (WSD) has developed an innovative Biosensing Alert System which can monitor the water quality continuously and also enable us to determine rapidly and accurately whether the water quality is safe for drinking. The systems are currently installed at the Sheung Shui and Tai Po Water Treatment Works for monitoring of incoming raw water consisting mainly of Dongjiang water.

The system integrates biological, computer, telecommunication and automation technologies.

Zebrafish, a new model organism used in the study of human diseases and genetics, has been selected because of its high sensitivity to contaminants which may be present in water. Through information technology and internet, the responsible officers can observe in real-time the movement of the zebrafish in the specially designed aquarium, download previously recorded videos and data, monitor and control the computer programme anytime and anywhere.



Once any abnormal activity or death of zebrafish is detected, an alert will be raised. The system not only can send alert e-mails and SMS automatically, it can also make direct phone calls to the responsible officers and at the same time trigger an autosampler to start taking water samples at preset intervals.



An integrated approach for chemical water quality assessment of an urban river stretch through Effect-Based Methods and emerging pollutants analysis with a focus on genotoxicity

Mario Carere ^{a,*}, Antonio Antocchia ^b, Annamaria Buschini ^c, Giada Frenzilli ^d, Francesca Marcon ^a, Cristina Andreoli ^a, Gessica Gorbi ^c, Antonio Suppa ^c, Serena Montalbano ^c, Valentina Prota ^a, Francesca De Battisti ^a, Patrizia Guidi ^d, Margherita Bernardeschi ^d, Mara Palumbo ^d, Vittoria Scarcelli ^b, Veronica D'Ezio ^b, Tiziana Persichini ^b, Massimiliano Scalici ^b, Antonella Sgura ^b, Federica Spani ^b, Ion Udroui ^b, Martina Valenzuela ^b, Ines Lacchetti ^a, Kevin di Domenico ^a, Walter Cristiano ^a, Valentina Marra ^a, Anna Maria Ingelido ^a, Nicola Iacovella ^a, Elena De Felip ^a, Riccardo Massei ^c, Laura Mancini ^a

^a Italian Institute of Health, Department: Environment and Health, Viale Regina Elena 299, Rome, Italy

^b Department of Science, University "Roma Tre", Viale Guglielmo Marconi 446, I-00146, Roma, Italy

^c University of Parma, Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, Parco Area Delle Scienze, 11/a, 43124, Parma, Italy

^d University of Pisa, Department of Clinical and Experimental Medicine, Unit of Applied Biology and Genetics, Via A. Volta 4, Pisa, Italy

* UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research, Department Bioanalytical Ecotoxicology, Permoserstr. 15, 04318, Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Genotoxicity
Water quality
Ecotoxicity
Aquatic ecosystems
Effect-based methods
Emerging pollutants

ABSTRACT

The impact of emerging chemical pollutants, on both status and functionality of aquatic ecosystems is worldwide recognized as a relevant issue of concern that should be assessed and managed by researchers, policymakers, and all relevant stakeholders. In Europe, the Reach Regulation has registered more than 100,000 chemical substances daily released in the environment. Furthermore, the effects related to the mixture of substances present in aquatic ecosystems may not be predictable on the basis of chemical analyses alone. This evidence, coupled with the dramatic effects of climate changes on water resources through water scarcity and flooding, makes urgent the application of innovative, fast and reliable monitoring methods. In this context, Effect-Based Methods (EBMs) have been applied in the urban stretch of the Tiber River (Central Italy) with the aim of understanding if detrimental pressures affect aquatic environmental health. In particular, different eco-genotoxicological assays have been used in order to detect genotoxic activity of chemicals present in the river, concurrently characterized by chemical analysis. Teratogenicity and embryo-toxicity have been studied in order to cover additional endpoints. The EBMs have highlighted the presence of diffuse chemical pollution and ecotoxicological effects in the three sampling stations, genotoxicological effects have been also detected through the use of different tests and organisms. The chemical analyses confirmed that in the aquatic ecosystems there is a diffuse presence, even at low concentrations, of emerging contaminants such as pharmaceuticals, not routinely monitored pesticides, personal care products, PFAS. The results of this study can help to identify an appropriate battery of EBMs for future studies and the application of more appropriate measures in order to monitor, mitigate or eliminate chemical contamination and remediate its adverse/detrimental effects on the ecosystem health.

Tiber river-Methods



The following methods have been applied.

- Comet assay (Single Cell gel Electrophoresis) on: *Dreissena polymorpha*, *Daphnia magna*, *Danio rerio* embryos, *Hydra vulgaris*
- NRRT (neutral red retention time) assay on *Dreissena polymorpha*
- Cytome assay on *Dreissena polymorpha*
- SOD mRNA on *Hydra vulgaris*
- *Daphnia* sp. Acute Immobilization assay
- Fish Embryo Toxicity (FET) test on *Danio rerio*
- Teratogenicity assay on *Hydra vulgaris*
- Targeted Chemical analysis (only in the 3rd campaign)
- PFAS Chemical analysis (only in the 3rd campaign)

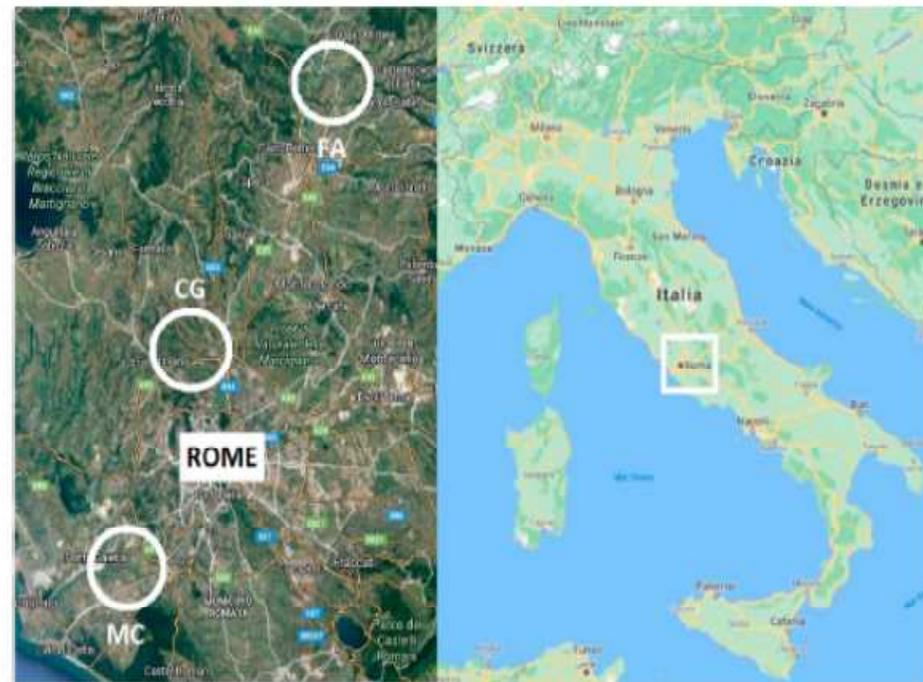


Fig. 1. Sampling sites of the study.

Tiber river study

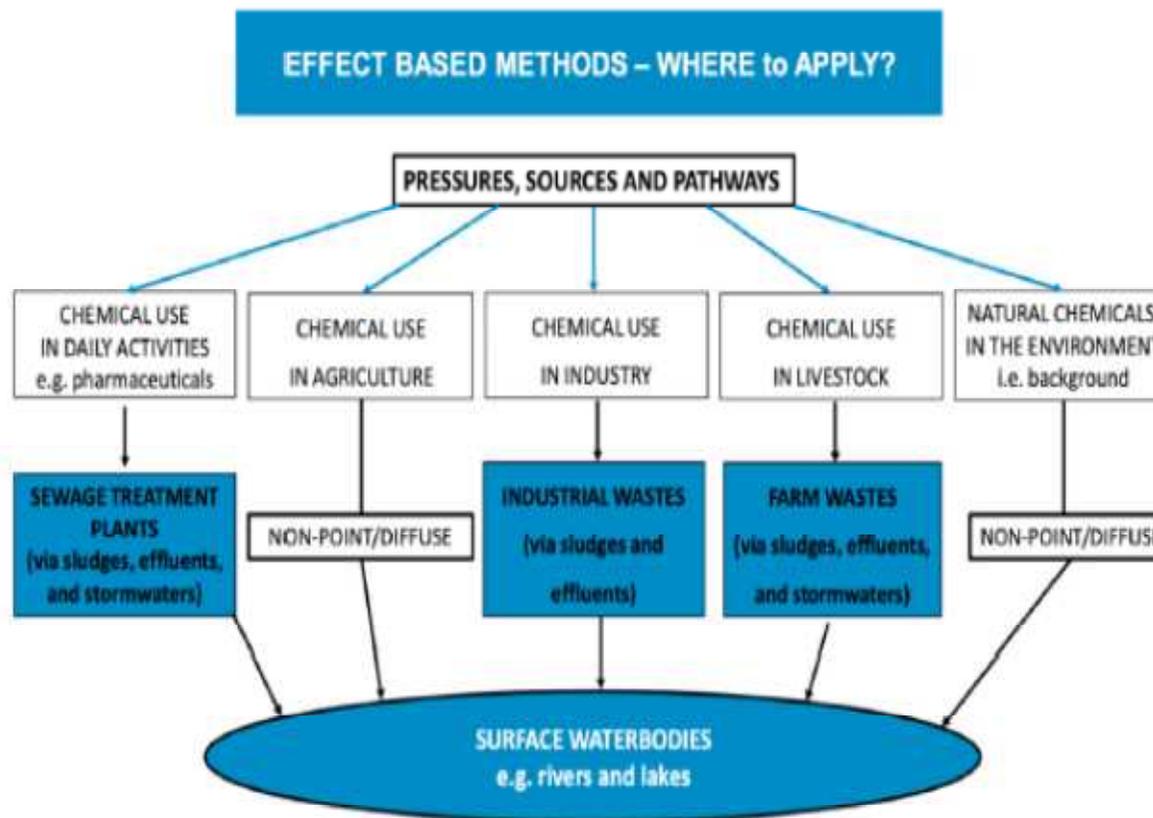


Fig. 15. Application of Effect-Based methods and link to the pressures and sources.

POSTER SETAC MEETING 2021

ESEMPIO PRATICO

RAVENNA RIGASSIFICATORE

- Nell'ambito delle iniziative legate alla realizzazione di nuove capacità di rigassificazione regolate dall'art.5 del DL n.50 del 17/5/2022 e mirate a diversificare le fonti di approvvigionamento di gas ai fini della sicurezza energetica nazionale, la Società Snam FSRU Italia in data 8 Luglio 2022 ha sottoposto l'istanza autorizzativa per l'ormeggio di un mezzo navale tipo FSRU (Floating Storage and Regasification Unit) da ormeggiarsi in corrispondenza della piattaforma offshore esistente di Petra (Gruppo PIR) posta a circa 8,5 km a largo di Punta Marina (c.d. Progetto FSRU Ravenna) e delle connesse infrastrutture per l'allacciamento alla rete di trasporto esistente
- L'FSRU (Floating Storage and Regasification Unit) sarà in grado di stoccare fino a 170 mila metri cubi di Gas Naturale Liquefatto (GNL), rigassificarlo e trasferirlo in una nuova condotta che lo convoglierà nel punto di connessione alla Rete Gasdotti posto a circa 42 km dal punto di ormeggio presso la piattaforma esistente offshore Petra.

Opere connesse

- Tratto di metanodotto a mare (sealine) e relativo cavo telecomando denominato Metanodotto Allacciamento FSRU Ravenna (Tratto a mare) DN 650 (26") DP 100 bar, di lunghezza pari a circa 8,5 km.
- La condotta “Met. Collegamento PDE FSRU Ravenna al Nodo di Ravenna” DN 900 (36") DP 75 di lunghezza pari a circa 31 km

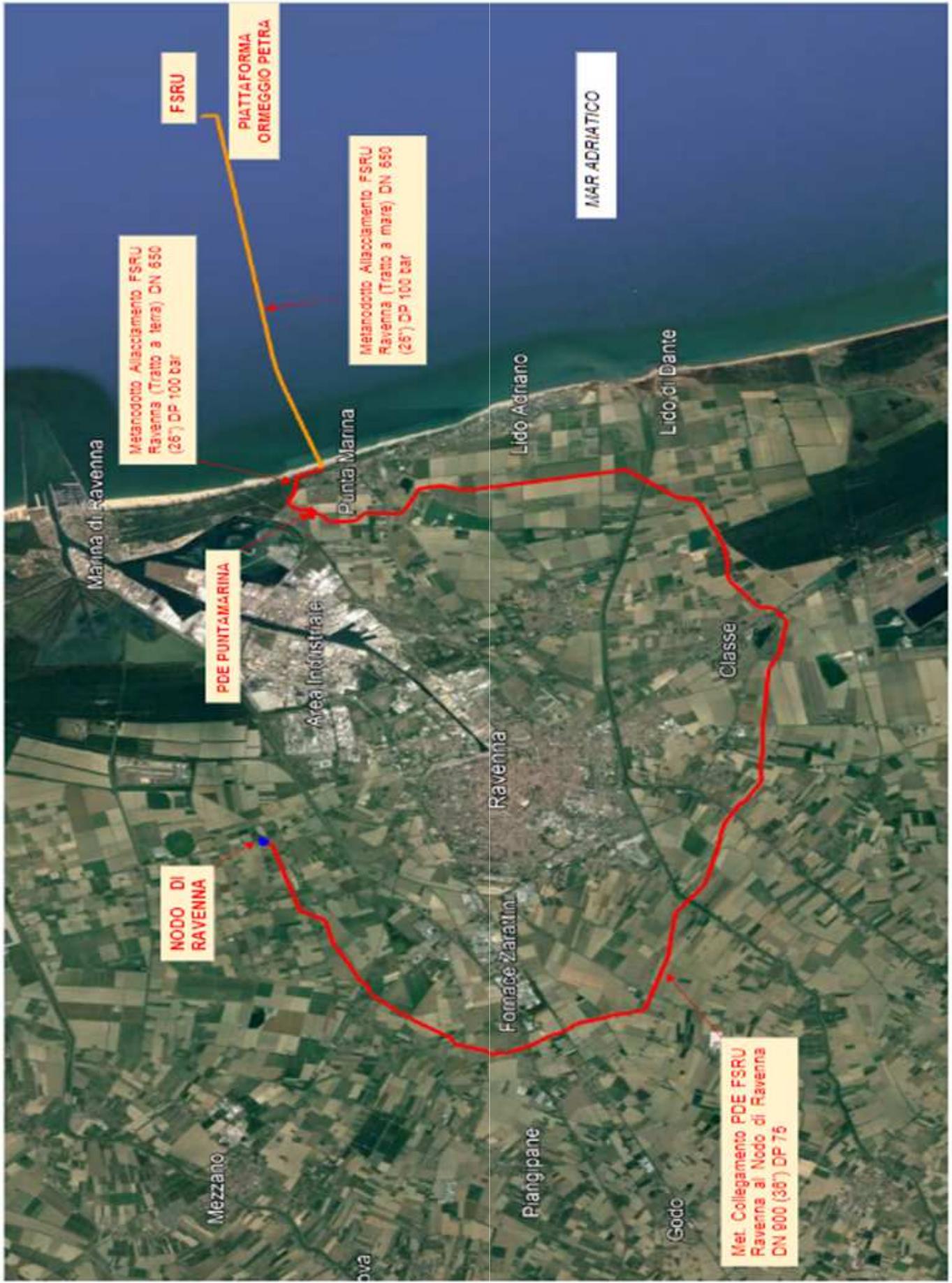


Figura 2-1 – Inquadramento area intervento di progetto

Valutazione ecotossicologica

- Acque marino-costiere?
- Suoli?
- Acque Superficiali?

Quali metodi applicare??

Matrici

- Per la componente acque marine/sedimenti si prevedono prelievi nell'area in cui verranno effettuate le attività di dragaggio previste nel progetto ipotizzando gli stessi punti di prelievo previsti
- Per la matrice suoli/acque superficiali: le valutazioni saranno effettuate nelle aree interessate dai lavori di scavo del metanodotto.

Piano di Monitoraggio (fase di scoping e di monitoring)

- Con riferimento alla matrice acqua marina sono previsti un minimo di 3 saggi ecotossicologici mediante l'esecuzione di una batteria di test di organismi rappresentativi di diversi livelli trofici (ovvero con diversi gradi di organizzazione e complessità) nonché di diversi endpoint (tossicità acuta, cronica e genotossicità), in accordo alle metodologie di riferimento (ISS Rapporti ISTISAN 20/6 – Giugno 2020)
- La componente sedimenti marini sarà caratterizzata con un minimo di 3 saggi secondo quanto previsto dal DM 173/2010 mediante una batteria di minima di test ecotossicologici (composta da almeno 3 organismi appartenenti a gruppi tassonomici ben distinti)
- Per il suolo saranno applicati saggi di tossicità acuta e cronica e saggi di genotossicità
- La componente acqua superficiale sarà caratterizzata mediante un'apposita batteria di 4 saggi per sito di organismi rappresentativi di diversi livelli trofici (ovvero con diversi gradi di organizzazione e complessità) nonché di diversi endpoint (tossicità acuta, cronica e genotossicità):

Acqua marina:

- Test ecotossicologici di tossicità acuta: Saggio di tossicità acuta con il batterio marino luminescente *Vibrio fischeri* (ISO 11343-3:2019),
- Test ecotossicologici di tossicità cronica: Inibizione di crescita algale con *Pheodactylum tricornutum* (UNI EN ISO 10253:2006)
- Test di genotossicità: saggi Comet Assay e del micronucleo (MN test) che rappresentano i più rilevanti biomarcatori di effetto per organismi esposti a contaminanti chimici come gli IPA o metalli , e saggi Salmonella/microsome test (Ames test) che consentono di tenere sotto controllo la formazione di sottoprodotti durante il processo di clorazione dell'acqua (OECD 471:1997).

Sedimenti marini:

- Saggio sulla fase solida: Bioluminescenza con *Vibrio fischeri* su sedimento privato dell'acqua interstiziale;
- Saggio su fase liquida: Inibizione di crescita algale con *Pheodactylum tricornutum* su elutriato;
- Saggio con effetti cronici/sub-letali/a lungo termine: Embriotossicità con *Paracentrotus lividus* (*Mytilus galloprovincialis*), su elutriato

Suoli:

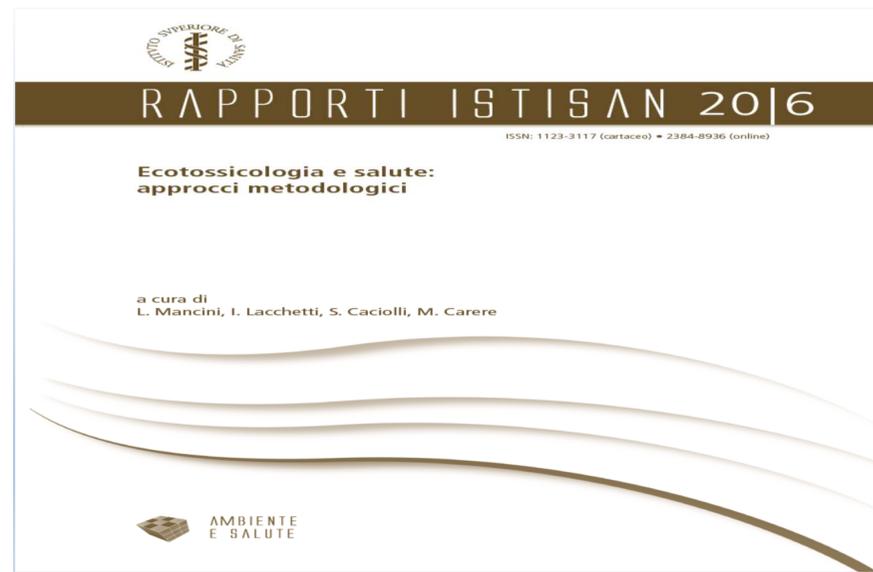
- un saggio ecotossicologico sul suolo tal quale (TQ): - Test di fitotossicità con *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* e *Sorghum saccharatum* (UNI 11357:2010);
- un saggio su elutriato del suolo (estratto acquoso dei suoli -EA): - Saggio di tossicità acuta con il crostaceo *Daphnia magna* (ISO 6341:2013);
- Saggio di tossicità cronica con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692:2012);
- un saggio di genotossicità: - sull'estratto organico del suolo (EO) mediante saggi *Salmonella*/microsome test (Ames test).

Acque superficiali interne:

- Test ecotossicologici di tossicità acuta: - Saggio di tossicità acuta con il crostaceo *Daphnia magna* (ISO 6341:2013),
- Saggio di tossicità con embrioni di pesce (OECD 236:2013);
- Test ecotossicologici di tossicità cronica: - Saggio di tossicità cronica con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692:2012),
- Test di genotossicità: - saggi Comet Assay o saggi *Salmonella*/microsome test (Ames test) (OECD 471:1997).

CONCLUSIONI

- ✓ L'introduzione della valutazione ecotossicologica nella VIS rappresenta un elemento innovativo strategico di collegamento tra ambiente e salute.
- ✓ Esistono alcune criticità nella procedura che erano attese alla luce della novità introdotta.
- ✓ L'elaborazione di una futura linea guida (GDL VIS) specifica è necessaria per poter suggerire le metodiche adatte e fornire elementi necessari per l'interpretazione dei risultati.



- ✓ 2023-Future Linee Guida VIS



RAPPORTI ISTISAN 22|26

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Mercurio nei sedimenti lagunari e marini nella Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia: aspetti ambientali e sanitari

A cura di M. Carere, S. Marcheggiani, E. Testai, C. Maggi, F. Onorati,
D. Pellegrini, E. Romano, K. Crovatto, P. De Alti, A. Lutman, M. Mariuz,
G. Trani, L. Mancini

Grazie per l'attenzione !!!



mario.carere@iss.it