

## VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE



### Miscele di sostanze chimiche nell'ambiente: una sfida per la salvaguardia della salute dell'uomo e dell'ambiente

Ogni giorno sia l'ambiente che l'uomo sono esposti a livelli residuali di centinaia di diverse sostanze chimiche di origine antropica presenti, ad esempio, nelle acque o nei prodotti che consumiamo. La valutazione del rischio dovuto alla presenza di singole sostanze chimiche, senza tenere conto che la reale contaminazione degli ecosistemi sia multipla, potrebbe non garantire un'adeguata valutazione del loro stato di qualità e una sufficiente protezione ambientale. I singoli contaminanti, infatti, possiedono caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche che possono essere differenti e gli effetti combinati di due o più sostanze possono portare ad effetti avversi diversi, e talvolta più gravi, sul biota. Emerge, pertanto, la necessità di una valutazione complessiva dell'esposizione combinata a più sostanze chimiche, che la legislazione attuale sulla tutela della salute umana e dell'ambiente non considera ancora. La valutazione del rischio da esposizione simultanea ad una miscela di sostanze presenta notevoli difficoltà, principalmente a causa del grande numero di contaminanti coinvolti e della quantità di dati necessari per descrivere i profili tossicologici e i *pattern* di esposizione delle sostanze presenti in miscela.

L'Unione Europea ha, tra i suoi obiettivi principali quello di sviluppare una strategia per un

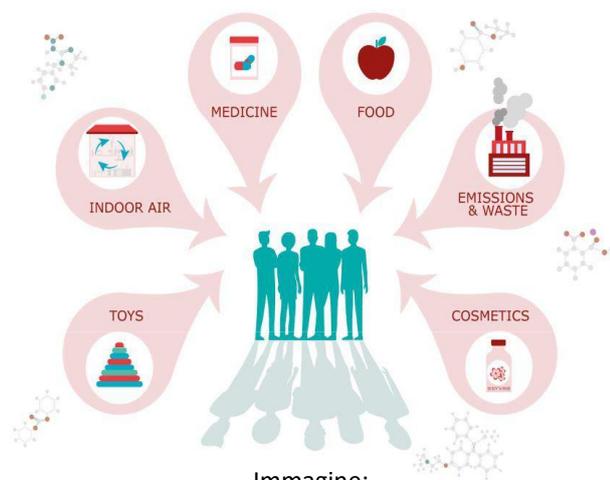


Immagine:

<https://ec.europa.eu/jrc/en/news/chemical-mixtures-safety>

ambiente migliore attraverso azioni volte a sviluppare approcci adeguati per limitare gli effetti combinati delle sostanze<sup>1</sup>, anche in relazione agli obiettivi di tutela ambientale e sanitaria stabiliti dal Regolamento REACH (CE n. 1907/2006).

Solo recentemente, nell'ambito del REACH, è stata adottata nel 2018 una restrizione riguardante gli ftalati DIBP, DBP, BBP e DEHP

<sup>1</sup> Environment Action Programme to 2020: <http://ec.europa.eu/environment/action-programme>

che tiene in considerazione anche gli effetti combinati di queste quattro sostanze<sup>2</sup>. Dai più attuali documenti di riferimento realizzati dalle maggiori organizzazioni scientifiche internazionali (OECD, WHO, JRC, EFSA, SCHER)<sup>3</sup>, nonché pubblicazioni scientifiche internazionali inerenti al problema delle miscele nell'ambiente, si evince che non esiste un approccio unico che sia sufficiente a garantire un adeguato livello di protezione per l'ambiente e per la salute umana. Inoltre, gli effetti tossici di una miscela possono essere previsti soltanto conoscendone la completa composizione; inoltre, le interazioni tra i componenti raramente possono essere noti a priori, e vanno valutati caso per caso.

Nell'ambito di un Accordo con il Ministero dell'Ambiente, l'IRSA - CNR, in collaborazione con l'Università di Milano-Bicocca, ha individuato un approccio metodologico per la valutazione e gestione del rischio degli effetti combinati delle sostanze chimiche, che possa essere applicato tenendo conto delle informazioni attualmente disponibili. L'attività di ricerca svolta nell'ambito dell'Accordo propone un approccio metodologico utile a fornire dei suggerimenti nell'ambito delle azioni che la Commissione Europea avvierà nei prossimi mesi al fine di migliorare l'armonizzazione legislativa inerente alle esposizioni combinate.

Un aspetto importante è il miglioramento della coerenza degli approcci, tra cui, ad esempio, la logica alla base della scelta di un particolare concetto di tossicità, l'uso di fattori di sicurezza, quando e come tenere conto delle interazioni e l'applicazione di modelli basati sulle emissioni

---

<sup>2</sup> REGOLAMENTO (UE) 2018/2005 DELLA COMMISSIONE del 17 dicembre 2018 che modifica l'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda le sostanze bis(2-etilesil) ftalato (DEHP), dibutilftalato (DBP), benzilbutilftalato (BBP) e diisobutilftalato (DIBP). [https://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/normativa/regolamento\\_UE\\_2005\\_17\\_12\\_2018.pdf](https://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/normativa/regolamento_UE_2005_17_12_2018.pdf)

<sup>3</sup> SCHER, SCCS, SCENIHR (2012), Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), and the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Toxicity and assessment of chemical mixtures. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/environmental\\_risks/docs/scher\\_o\\_155.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf)

OECD (2018), Considerations for Assessing the Risks of Combined Exposure to Multiple Chemicals, Series on Testing and Assessment No. 296, Environment, Health and Safety Division, Environment Directorate.

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>

EFSA Scientific Committee (2019), Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5634>

JRC (2014), Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/assessment-mixtures-review-regulatory-requirements-and-guidance>

JRC (2015), Scientific methodologies for the assessment of combined effects of chemicals - a survey and literature review. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/scientific-methodologies-assessment-combined-effects-chemicals-survey-and-literature-review>

JRC (2016) Review of case studies on the human and environmental risk assessment of chemical mixtures. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/review-case-studies-human-and-environmental-risk-assessment-chemical-mixtures>

per determinare la co-presenza di sostanze chimiche nei comparti ambientali.

**Proposta Metodologica:**

**come affrontare il problema delle miscele dal punto di vista gestionale**

Per prevedere la tossicità di una miscela di sostanze, il modello di Löewe (*Concentration Addition* = Additività di Dose/Concentrazione), è quello generalmente utilizzato (sia dalla letteratura scientifica che a livello europeo) nella valutazione teorica del rischio ambientale poiché riflette un approccio di “caso peggiore” qualora non vi siano informazioni sulla tossicità della miscela. Il modello *Concentration Addition* è un utile “screening” della tossicità potenziale complessiva di una miscela. In questo modello si assume che tutte le sostanze presentino lo stesso meccanismo d’azione. La tossicità della miscela viene calcolata ed espressa in termini di unità di tossicità (TU, *Toxic Unit*), ovvero sommando le concentrazioni misurate o previste di ciascun componente della miscela, normalizzate rispetto ad un *endpoint* ecotossicologico.

Con il modello additività di dose/concentrazione viene valutata la **potenza di tossicità della miscela** (TU) che si calcola come somma delle **frazioni di unità di tossicità delle singole sostanze** (per questo motivo il modello è chiamato additività di dose/concentrazione), secondo la seguente formula:

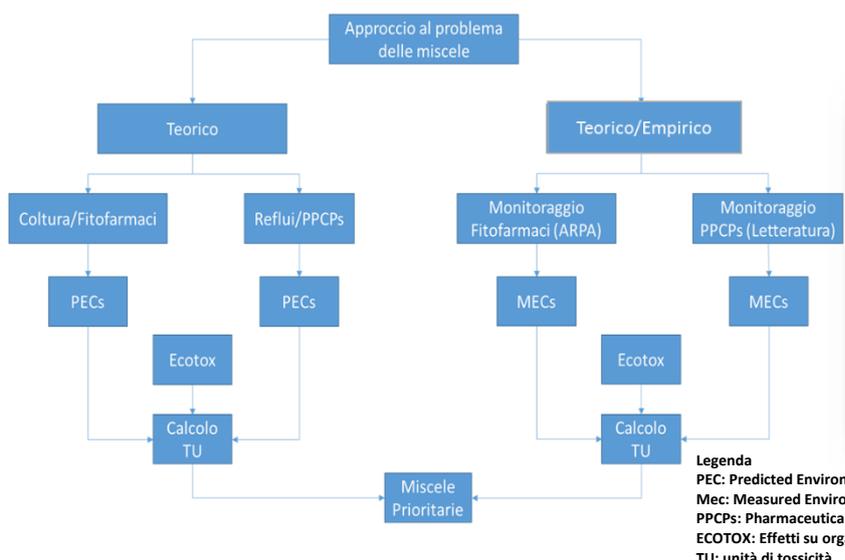
$$TU = \sum_i^n ([Conc_i] / LC50_{i\_org})$$

Le frazioni di unità di tossicità (xTU) per le singole sostanze vengono calcolate come **rapporto tra la concentrazione del singolo contaminante e la relativa EC<sub>50</sub> o LC<sub>50</sub> per ciascuno degli organismi di tre livelli trofici (alga, dafnia e pesce)**.

Il concetto di TU permette dunque il calcolo del rischio di una miscela su ogni singolo organismo considerato e rappresentativo di un livello trofico (es. alga, dafnia, pesce) combinando gli effetti di tutte le sostanze presenti nella miscela. Sommando le frazioni di tossicità, se il valore di TU è =1 (o vicino a questo valore) si considera che la miscela presa in esame abbia un effetto ecotossicologico.

Il modello è stato applicato secondo l’approccio schematizzato nella figura di seguito, a diversi *scenari italiani* di acque superficiali.

## VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE



**Legenda**  
 PEC: Predicted Environmental Concentration  
 Mec: Measured Environmental Concentration  
 PPCPs: Pharmaceuticals and Personal Care Products  
 ECOTOX: Effetti su organismi acquatici  
 TU: unità di tossicità

In particolare, per i dati ambientali misurati (MECs: *Measured Environmental Concentrations*, parte destra dello schema) sono stati considerati i seguenti casi di studio: una parte del bacino del fiume Adda (dati analitici ARPA Lombardia 2015-2017); un tratto del fiume Tevere (da Civiltà Castellana a Roma città con dati ARPA Lazio 2015-2017); un punto specifico del Tevere (Scafa) a valle dell'impianto di depurazione di Roma sud (dati di letteratura<sup>4</sup> tra il 2013 e il 2015); alcuni punti del fiume Ledra (Friuli Venezia Giulia), a monte e a valle di impianti di depurazione civile (dati di letteratura<sup>5</sup> del 2015); alcuni fiumi a monte e a valle di impianti di depurazione civile della città di Milano (Olona, Seveso e Lambro, dati di letteratura<sup>6</sup> del 2011). Il modello è stato applicato anche a dati di contaminazione ambientale previsti (PECs: *Predicted Environmental Concentrations*, parte sinistra dello schema) in altri tre casi di studio (due scenari di colture agrarie quali mais e melo e un impianto di depurazione del Passo del Tonale). Gli scenari di esposizione, relativi sia a contaminanti normati che emergenti, si sono basati su dati di monitoraggio ambientale e quindi misurati da campagne di monitoraggio effettuate dalle ARPA nell'ambito della Direttiva 2000/60/CE "*Water Framework Directive*" o nell'ambito di progetti di ricerca i cui dati sono stati pubblicati in riviste internazionali) o previsti, calcolati mediante modellistica (relativi a scenari agronomici o di un impianto di depurazione). Per quanto riguarda i dati ambientali misurati (MEC), un fattore di cui si è tenuto conto è la concentrazione di monitoraggio e dei limiti di quantificazione strumentale (non sempre

<sup>4</sup> I dati pubblicati provengono dal progetto europeo (Microcokit) di cui l'IRSA-CNR era coordinatore: Saccà ML, Ferrero VEV, Loos R, Di Lenola M, Tavazzi S, Grenni P, Ademollo N, Patrolecco L, Huggett J, Barra Caracciolo A, Lettieri T, 2019. *Chemical mixtures and fluorescence in situ hybridization analysis of natural microbial community in the Tiber River*. *Sci Total Environ*, 673:7-19.  
<sup>5</sup> Raitano G, Goi D, Pieri V, et al. 2018 (*Eco*)toxicological maps: A new risk assessment method integrating traditional and in silico tools and its application in the Ledra River (Italy). *Environ Int*. 119:275-286  
<sup>6</sup> Riva F., Zuccato E., Davoli E., Fattore E., Castiglioni S., 2019. *Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy*. *J. Hazard. Mater*. 361:103-110.

uniformi nei diversi monitoraggi). In molti casi le concentrazioni rilevate avevano un **valore minore del limite di quantificazione (<LOQ)**. Il limite di quantificazione, rappresenta il limite di concentrazione fino al quale è possibile ottenere una misura per lo strumento utilizzato e/o per la metodica applicata, con relativa incertezza. In teoria, una concentrazione <LOQ potrebbe non significare assenza di concentrazione della sostanza, ma semplicemente che il metodo applicato o la strumentazione utilizzata non rilevano una determinata sostanza al di sotto di una certa concentrazione. Tale limitazione può dar luogo ad ulteriore incertezza nella valutazione della tossicità della miscela. Per tale motivo si è deciso di effettuare **una doppia elaborazione** e il modello di additività di dose/concentrazione è stato applicato con due criteri:

- Criterio *Best case*, in cui si è considerato il valore <LOQ =0, e dunque, quella determinata sostanza non è stata considerata facente parte della miscela;
- Criterio *Worst case*, ogni sostanza con un valore di concentrazione <LOQ, è stata considerata nella miscela; pertanto la sua concentrazione è stata considerata come la metà della concentrazione del LOQ (come da TGD europee) ed inclusa nell'elaborazione della tossicità della miscela. È indubbio che questo tipo di elaborazione può mostrare una situazione peggiorativa rispetto a quella reale.

Un'ulteriore considerazione è stata fatta per il "grado di incertezza" dovuto ai pochi dati ecotossicologici considerati (es. solo un valore per ciascun livello trofico o pochi dati ecotossicologici rispetto al numero di contaminanti analizzati) nell'elaborazione del modello applicato. Inoltre i tre organismi target (alga, dafnia, pesce) considerati, sebbene rappresentativi dell'ambiente acquatico, potrebbero anche non essere quelli più sensibili alle singole sostanze considerate. Per superare tale "incertezza", come comunemente previsto dalle linee guida ECHA inerenti al rischio ecotossicologico delle sostanze chimiche, sono stati anche applicati degli **assessment factors** (0,1 per i dati elaborati di tossicità della miscela riguardanti alghe e 0,01 dafnia e pesci).

Il calcolo della TU è stato fatto per **singolo momento** e un **singolo luogo di campionamento** (caratterizzazione spazio-temporale). Al fine di agevolare l'applicazione del modello anche in contesti territorialmente e temporalmente ampi, è stata implementata una procedura semi-automatica di gestione dei dati e di calcolo dei valori di TU che prevede l'utilizzo di sistemi informatici di media complessità come SQL server come base dati relazionale, Microsoft Excel e Microsoft Access.

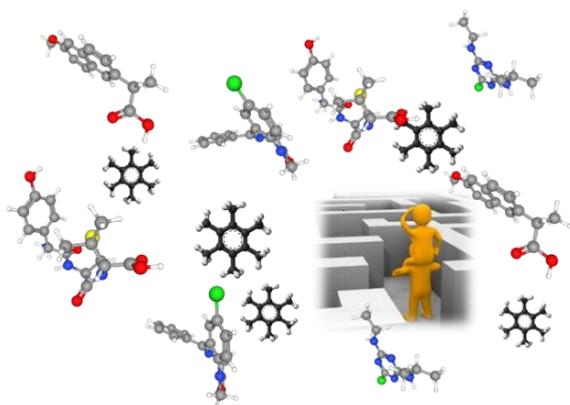
Per quanto riguarda gli scenari quali le coltivazioni di mais e di melo o per un impianto di trattamento di acque reflue urbane, i dati di contaminazione previsti (PEC) per le acque

superficiali, sono stati calcolati attraverso un corposo e dettagliato lavoro di modellistica previsionale.

A valle di una consistente elaborazione e applicazione di differenti valutazioni, sono state prodotte un numero cospicuo **mappe tematiche georeferenziate** (in ambiente GIS) relative alla **potenza delle miscele** (dati di monitoraggio ambientale misurati) che descrivono la potenza di tossicità delle miscele relativi a diversi fiumi Italiani. Inoltre sono stati calcolati e rappresentati graficamente i **trend annuali delle unità di tossicità** delle miscele relative agli scenari agricoli e dell'impianto di depurazione (per i dati di contaminazione calcolati).

### CONSIDERAZIONI GENERALI: VANTAGGI E LIMITI DEL MODELLO APPLICATO E DELL'APPROCCIO DI STUDIO

Ad oggi, i dati ecotossicologici e tossicologici relativi agli effetti delle miscele sono attualmente molto limitati e, includendo anche i contaminati emergenti, le combinazioni degli effetti di



diverse sostanze possono essere molteplici e difficili da stabilire a priori.

Il modello scelto di additività dose/concentrazione o *Concentration addition* (CA) è quello ritenuto più idoneo in assenza di adeguate informazioni relative all'effetto ecotossicologico dell'intera miscela e delle possibili interazioni (sinergiche, antagoniste ecc.)

tra due o più dei suoi componenti. Il modello CA è generalmente riconosciuto nella valutazione del rischio ambientale come *l'approccio di caso peggiore* perché si assume che tutte le sostanze presentino lo stesso meccanismo d'azione (non esistendo informazioni dettagliate di ecotossicità su tutte le sostanze inquinanti esistenti).

Il modello CA è basato sulla sommatoria delle Unità di Tossicità (TU) ed è stato possibile applicarlo a diversi casi di studio secondo un approccio sia teorico/empirico, che teorico, considerando tre livelli trofici (alga, dafnia e pesce) rappresentativi del comparto acquatico e utilizzando sia dati ambientali di contaminazione misurati, che dati previsti. Si vuole sottolineare che l'approccio può essere applicato sia in maniera prospettica (teorico previsionale) per prevedere la formazione di una miscela nell'ambiente, sia in maniera retrospettiva (empirica), utilizzando i dati di monitoraggio disponibili per la valutazione del rischio da miscela. Il modello applicato ha permesso di individuare alcune *miscele prioritarie*

nei casi di studio analizzati. È bene precisare, che con il termine prioritarie non vanno intese quelle miscele in cui siano presenti sostanze prioritarie (come definita dalla regolamentazione UE), ma quelle **combinazioni di sostanze che hanno un'elevata possibilità di formazione nell'ambiente e che rappresentano un pericolo reale per gli ecosistemi**. Tali miscele sono quelle su cui sarebbe necessario approfondire le conoscenze (es. test ecotossicologici o analisi sulla matrice ambientale).

Al tempo stesso, **il modello proposto ha il grande vantaggio di mettere in evidenza nelle miscele considerate quali siano le sostanze che hanno un maggior contributo nella tossicità di una miscela**. Tale aspetto è fondamentale al fine di una gestione del rischio delle miscele, potendo intervenire sulle sostanze che realmente governano la potenza della tossicità, permettendo di potere valutare quali misure di prevenzione/mitigazione del rischio prendere per limitarne la contaminazione in uno specifico contesto ambientale. Dallo studio si evince che solo una o pochissime sostanze contribuiscono in maniera rilevante alla tossicità di miscela. Questa indicazione offre una prospettiva differente dal punto di vista della gestione del rischio da miscela. Infatti, mettendo in atto delle azioni volte a ridurre le concentrazioni ambientali di queste sostanze si abbasserebbe notevolmente anche il rischio della miscela.

Ovviamente sarebbero auspicabili, a valle di ogni screening, ulteriori approfondimenti, soprattutto per quelle miscele che mostrano una potenza di tossicità >1.

### **Ulteriori approfondimenti**

Alcune informazioni inerenti all'approccio applicato sono state pubblicate nel *Notiziario dei metodi Analitici & IRSA news* N. 1/2020 (<http://www.irsa.cnr.it/index.php/ita/prodotti-della-ricerca/notiziario>).

Inoltre a giugno 2020 si è svolto, a cura di IRSA-CNR e MATTM, il Digital Workshop dal titolo "*Valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche*", rivolto ai rappresentanti delle Amministrazioni pubbliche e agli esperti del mondo produttivo, accademico e della ricerca. Il workshop, che ha avuto una partecipazione attiva di oltre 180 iscritti appartenenti a Amministrazioni Pubbliche, Enti di ricerca, Università, Associazioni di categoria e imprese, è stata l'occasione per presentare i risultati dello studio affidato dal Ministero dell'Ambiente all'Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA) del CNR per l'individuazione di un approccio metodologico per la valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze e ha costituito l'occasione per un confronto e aggiornamento sulla materia. Il workshop, introdotto dal Direttore dell'IRSA-CNR Giuseppe Mascolo e dal Direttore della Direzione per il Patrimonio

**VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE**

Naturalistico del Ministero dell'Ambiente Carlo Zaghi ha visto tra i relatori alcuni esponenti dell'ISS, dell'Università Bicocca di Milano, dell'ISPRA, dell'Istituto Mario Negri di Milano e dell'EFSA.

Nel seguente link è possibile scaricare le presentazioni del workshop

<https://www.minambiente.it/pagina/attivita-nazionali>

