

CARATTERIZZAZIONE DELLE SOSTANZE CHIMICHE AI FINI DELL'ALLEGATO V - PROPRIETA' ECOTOSSICOLOGICHE.

D. CALAMARI e M. VIGHI

C.N.R. - Istituto di Ricerca sulle Acque - Brugherio (MI)

RIASSUNTO. - I saggi tossicologici possono essere eseguiti a diversi livelli di complessità, con metodi rigidi o flessibili e possono inoltre essere classificati in funzione degli scopi che si intendono perseguire: saggi atti a definire criteri di qualità ambientale, saggi atti a classificare le sostanze in funzione della loro tossicità, saggi per effluenti, ecc. La discussione affronterà la questione relativa ai requisiti necessari per saggi volti a soddisfare le esigenze di regolamenti legislativi. In funzione di tali requisiti si esamineranno i saggi previsti nel "fascicolo di base" dell'allegato V (saggi di tossicità acuta su pesci e Daphnia) in relazione ai problemi di standardizzazione, ripetibilità, caratteristiche operative, significato dei risultati, ecc.

Verrà successivamente esposta l'attività in corso del sottogruppo Ecotossicologia della CEE, che opera per standardizzare i metodi sopracitati, illustrando i problemi che sono stati affrontati e quelli su cui vi è maggior divergenza di opinioni (tempi sperimentali, scelta delle specie, valutazione statistica, controllo analitico, ecc.).

Saranno discussi i fondamenti scientifici sui quali si basano le posizioni della delegazione italiana.

Si affronteranno infine i problemi che vengono posti alla comunità scientifica da questo tipo di normative, con riferimento ai possibili indirizzi di ricerca per il futuro.

1. INTRODUZIONE

La valutazione degli effetti che una sostanza che può essere immessa nell'ambiente potrebbe esplicare sugli organismi viventi può essere operata mediante saggi di diverso livello di complessità e sofisticazione.

I diversi metodi di saggio utilizzati nella pratica tossicologica possono essere limitati alla individuazione di dosi capaci di esercitare un effetto letale a breve od a lungo termine o possono essere orientati verso la evidenza di effetti particolari a diversi livelli di funzionalità. E' possibile saggiare ad esempio gli effetti sulla efficienza della fotosintesi algale, sulla funzionalità epatica di pesci, sullo sviluppo embrionale di pesci, sulla fertilità di crostacei, dell'accumulo delle sostanze sui diversi livelli della catena trofica, ecc.

Di un certo interesse su questo argomento sono gli atti di un convegno organizzato dalla CEE "Test for ecological effects of chemicals" (Umweltbundesamt, 1978).

Per quanto riguarda in particolare l'ambiente acquatico, la varietà e complessità dei metodi di saggio tossicologico sono documentati nelle ampie rassegne di Scherer (1979) e di Blanck e Coll. (1978). Questi ultimi in particolare riportano una bibliografia di oltre 2.000 lavori su vegetali, animali e microrganismi eterotrofi acquatici.

Nella scelta di un saggio tossicologico pertanto si pone il problema di individuare quali sono gli obiettivi da perseguire e, in funzione di essi, realizzare l'approccio più adeguato.

Ad esempio i saggi su pesci sono stati raggruppati in funzione degli obiettivi dall'European Inland Fisheries Advisory Commission della FAO (1975) che ha proposto le seguenti cinque categorie:

- a) Saggi di vaglio (screening tests) con l'obiettivo di classificare le sostanze in funzione del loro effetto tossico a livello acuto. Questi saggi devono essere molto standardizzati, indicando con precisione la specie e lo stadio di sviluppo dell'organismo da utilizzare, nonché le condizioni chimico-fisiche in cui si deve svolgere il saggio. Ciò allo scopo di offrire le massime garanzie di ripetibilità e confrontabilità fra le sostanze e fra i risultati prodotti in laboratori differenti.

b) Saggi atti a stabilire criteri di qualità per le acque. I metodi saranno caratterizzati da un'ampia flessibilità in modo da consentire, mediante lo studio di diversi effetti, in condizioni ambientali molto variabili e su organismi appartenenti a gruppi tassonomici diversi, una adeguata previsione delle possibili conseguenze sull'ambiente acquatico.

c) Saggi volti a stimare la tossicità di effluenti industriali, in relazione al corpo idrico in cui vengono in messi.

Le condizioni saranno pertanto relativamente standardizzate in termini di procedura generale, ma poichè l'obiettivo è quello di proteggere un determinato corpo idrico con le sue caratteristiche specifiche di popolamento biologico e qualità delle acque, i saggi saranno condotti su organismi ed in condizioni scelte ad hoc.

d) Saggi con valore legale per stimare la tossicità di effluenti; rispetto ai saggi indicati al punto c) sarà necessaria una maggiore rigidità e standardizzazione, relativamente alla scelta delle specie ed alle condizioni chimico-fisiche dell'acqua, al fine di consentire una comparazione delle tossicità in termini assoluti e cioè indipendentemente dalle caratteristiche del corpo recipiente ed in particolare della sua potenzialità recettiva.

e) Saggi per la sorveglianza continua dei corpi idrici, in particolare dei fiumi, preparati allo scopo di poter intervenire prontamente in caso di inquinamento di corpi idrici destinati ad usi particolari (ad esempio potabilizzazione delle acque).

Nell'ambito degli obiettivi previsti dalla VI modifica della direttiva CEE, che consistono in una caratterizzazione delle sostanze di nuova produzione sulla base della loro potenziale pericolosità per l'uomo e per l'ambiente, si pone pertanto il problema, per quanto concerne l'aspetto ecotossicologico, di individuare, almeno per un primo livello di informazione, metodi che forniscano risultati esaurienti ed attendibili ma che nello stesso tempo, possano essere applicati a livello di routine in tempi relativamente brevi e con costi relativamente contenuti.

Tali metodi dovranno produrre risultati atti a consentire la formulazione di un primo giudizio integrato sul la pericolosità della sostanza in esame, in connessione con un complesso di altre informazioni di base (chi-miche, fisiche e tossicologiche).

2. CONSIDERAZIONI SUI SAGGI PREVISTI DAL DOSSIER DI BASE DELL'ANNESSO V DELLA VI MODIFICA DELLA DIRETTIVA CEE.

L'annesso V della VI modifica della direttiva CEE prevede, per quanto riguarda i test di ecotossicità, il seguente schema sequenziale:

Livello 0 (dossier di base):

Tossicità acuta su pesce e Daphnia

Livello 1:

Prova di crescita algale

Tossicità a lungo termine con pesce e Daphnia

Test di bioaccumulo (pesce)

Tossicità acuta su Anellidi terrestri

Tossicità acuta su Insetti

Tossicità acuta su Uccelli

Tossicità acuta su Batteri

Inibizione della crescita di macrofite terrestri

Livello 2:

Ulteriori prove di bioaccumulo

Ulteriori prove di tossicità a lungo termine su

specie appartenenti a diversi comparti ambientali

Studi di biomagnificazione con ecosistemi di laboratorio.

L'effettuazione di tutti o di alcuni dei saggi previsti ai livelli 1 e 2 dipende sia dalla quantità di prodotto che verrà immessa sul mercato sia dai risultati delle prove dei livelli precedenti.

Per quanto riguarda il livello 0, che dovrà rappresentare il dossier di base necessario per ogni sostanza, un apparente limite dell'informazione potrebbe essere costituito dal fatto che vengono presi in esame soltanto organismi acquatici.

A sostegno dell'opportunità della scelta dell'ambiente acquatico si può fare riferimento al seguente schema comparativo dei tre comparti ambientali fisici proposto dall'Ecotoxicology Group del Chemical Testing Programme nel documento di preambolo ai metodi ecotossicologici (OECD, 1979).

	Entità delle biomasse	Possibilità di trasferimento dei contaminanti	Capacità di immobilizza zione del contaminanti	Uniformità di composizione
Aria	+	+++	+	+++
Acqua	++	++	++	++
Suolo	+++	+	+++	+

Da questo schema si può dedurre l'importanza relativa dei vari comparti ambientali in funzione delle possibilità di circolazione e di immobilizzazione delle sostanze.

Nel comparto "suolo" si verifica una scarsa possibilità di circolazione ed una elevata capacità di immobilizzazione, di conseguenza l'eventualità che si verifichino fenomeni di contaminazione grave e su vasta scala è un fatto indubbiamente limitato in quanto la presenza di contaminanti risulta in generale localizzata e puntiforme. Al contrario nel comparto "aria" le sostanze tendono a non essere trattenute e pertanto a venire cedute ad altri comparti, inoltre vi è una maggiore possibilità di dispersione. L'acqua invece è un comparto che presenta caratteristiche intermedie rispetto ai precedenti: le sostanze hanno infatti una mobilità relativamente elevata e, almeno per quanto riguarda le acque interne, possibilità di dispersione limitata. Pertanto la possibilità di effetti indesiderati può manifestarsi più facilmente che negli altri comparti.

L'ambiente aereo o l'ambiente terrestre saranno dunque coinvolti in fenomeni di rilevante entità soltanto se si prevedono condizioni particolari quali la dispersione in aria di quantità notevoli di contaminanti, lo smaltimento diretto o indiretto sul suolo, ecc. Queste ed altre eventualità sono prese in considerazione ai successivi livelli di indagine previsti dall'allegato V della VI modifica.

Poste queste premesse si pone il problema di valutare l'adeguatezza e la idoneità delle metodologie previste dall'allegato V della VI modifica della direttiva CEE al fine una caratterizzazione di massima delle nuove sostanze chimiche dal punto di vista degli effetti sugli organismi acquatici.

In linea generale, un saggio tossicologico con valore legale, in particolare per una classificazione delle sostanze in funzione della loro tossicità acuta, dovrebbe ri

spondere ai seguenti requisiti:

- a) elevato livello di standardizzazione e garanzie di riproducibilità;
- b) agevole interpretazione dei risultati;
- c) semplicità operativa;
- d) costi relativamente contenuti.

Un ulteriore problema si pone per quanto riguarda la scelta delle specie più idonee da utilizzare per la conduzione di tests di tossicità.

Attualmente un gran numero di specie, rappresentative dei diversi livelli trofici sia di ambiente acquatico che terrestre, sono comunemente usate come organismi standard nella normale pratica tossicologica. L'idoneità di un organismo a questo scopo può essere valutata sulla base dei seguenti requisiti:

- a) buona conoscenza delle caratteristiche fisiologiche, metaboliche, riproduttive, ecologiche, ecc.;
- b) facilità di reperimento nel corso di tutto l'anno e di allevamento o mantenimento in laboratorio;
- c) adeguata sensibilità alle sostanze tossiche nell'ambito delle caratteristiche del livello trofico che rappresenta;
- d) relativa stabilità genetica; ciò vale specialmente per quanto riguarda i tests previsti ai livelli successivi che prendono in esame forme dal ciclo vitale molto breve (alghe, batteri).

Nella proposizione di un test tossicologico per gli scopi indicati è infine necessario garantire un ragionevole equilibrio tra la necessaria rigidità di formulazione e di dettaglio, per quegli aspetti che si considerino essenziali per una garanzia di attendibilità e riproducibilità dei risultati, ed una sufficiente elasticità per quegli aspetti che, nell'ambito dei principi di una buona pratica di laboratorio, possono essere lasciati alla discrezione dell'operatore a vantaggio della praticità operativa ed economicità del test.

La scelta dei saggi acuti su una specie di pesce su Daphnia si basa sulla lunga tradizione di impiego di questi saggi. La pratica delle prove tossicologiche sui pesci risale agli inizi delle ricerche nel settore della contaminazione delle acque ed ha trovato applicazioni enormemente vaste ad ogni livello di indagine. Sono oggi disponibili ampie ed esaurienti rassegne sulle metodologie, sulle diverse possibilità di interpretazione dei risultati e

sulle loro applicazioni nella gestione dell'ambiente (Sprague, 1969, 1970, 1971; ASTM, 1973, 1977, 1978; Alabaster e Lloyd, 1980).

Il saggio su Daphnia (Crosteo planctonico d'acqua dolce dell'ordine dei Cladoceri), utilizzato anch'esso da tempo nella pratica ecotossicologica, ha ricevuto di recente un'ampia diffusione grazie alla sua duttilità, nonché all'elevata sensibilità della specie utilizzata. Queste caratteristiche fanno sì che il saggio possa essere considerato fra quelli più idonei alla conduzione di "screening tests" a livello di routine e su vasta scala.

La diffusione dei saggi su Daphnia ha avuto recentemente ulteriore impulso grazie anche alla messa a punto di un metodo che consente di valutare, con procedure relativamente semplici, gli effetti sulla fertilità (Biesinger e Christensen, 1972; Adema, 1978; Canton e Adema, 1978).

Dal complesso della ampia documentazione bibliografica disponibile su questi saggi è possibile desumere che le caratteristiche precedentemente indicate come necessari requisiti per prove di questo tipo sono in massima parte soddisfatte.

Inoltre l'opportunità dell'abbinamento tra un saggio su pesci ed uno su Daphnia si basa sulla considerazione che si tratta di organismi caratteristici di due differenti livelli trofici (rispettivamente consumatori secondari e consumatori primari), molto lontani dal punto di vista sistematico. Essi presentano pertanto caratteristiche fisiologiche e metaboliche sostanzialmente diverse e dovrebbero di conseguenza manifestare risposte differenti nei confronti di possibili contaminanti. Questo presupposto teorico è stato confermato da un'indagine condotta da Kenaga (1978) che ha confrontato le risposte acute di vari organismi, normalmente utilizzati in saggi tossicologici, nei riguardi di differenti gruppi di molecole.

In molti casi sono state individuate correlazioni significative tra le risposte di differenti organismi e ciò sta ad indicare che l'effetto tossico acuto su una determinata specie è prevedibile sulla base di quello ottenuto mediante saggi condotti su una specie diversa. Al contrario tra le differenti specie di pesci ed il Crosteo non è stata evidenziata nessuna correlazione. Questi dati, ottenuti essenzialmente su pesticidi, sono stati confermati per un gruppo molto eterogeneo di ammine (alifatiche, aromatiche ed eterocicliche) (Calamari e Coll., 1980) nonché

per un gruppo di clorobenzeni (IRSA, 1980).

Ne consegue che mediante saggi condotti su pesci e Daphnia è possibile ottenere risultati differenti e complementari ai fini di una prima caratterizzazione delle sostanze dal punto di vista ecotossicologico.

Si ritiene peraltro che una possibile carenza rilevabile nel dossier di base consista nella mancanza di un saggio sulla componente algale, previsto soltanto per il livello 1.

L'introduzione di un saggio algale potrebbe fornire un quadro più completo degli effetti sui diversi livelli della catena trofica acquatica (produttori, consumatori primari, consumatori secondari). Per molte categorie di contaminanti inoltre la componente algale può risultare e stremamente più sensibile della componente animale; pertanto livelli che non provocano nessun effetto acuto su animali acquatici potrebbero risultare fortemente tossici per il primo anello della catena trofica.

Peraltro il test algale è da tempo pratica comune nella ecotossicologia ed ha raggiunto un livello di standardizzazione sufficiente da poterlo considerare idoneo allo inserimento in una normativa legale (EPA 1971, 1978; OECD, 1980).

Per mitigare questa parziale critica tuttavia è necessario tener presente che il dossier di base prevede un complesso di informazioni, di cui i tests ecotossicologici costituiscono soltanto uno dei vari aspetti considerati.

Alcune informazioni di carattere ecotossicologico atte a valutare la circolazione, la persistenza e gli effetti dei tossici, nonché le loro possibilità di bioaccumulo potrebbero essere indicativamente desunte da alcuni parametri di natura chimica o fisica quali il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua, la solubilità, la costante di dissociazione, la tensione di vapore, ecc., nonché da dati sulla degradabilità.

Sulla sostanza in esame dovrà essere formulato un giudizio di insieme che tenga conto di tutti i parametri esaminati per esprimere una valutazione indicativa della potenziale pericolosità, anche al fine di stabilire l'opportunità di ulteriori indagini di maggior sofisticazione.

Nell'ottica di tali obiettivi pertanto si ritiene che l'approccio previsto dalla VI modifica della direttiva CEE sia da considerarsi adeguato almeno in prima istanza.

Nel quadro del Progetto Finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente" è stata attivata in Italia una linea di ricerca denominata "Ecotossicologia" fra i cui obiettivi si è posta la verifica della validità dei metodi e dei sistemi sequenziali di analisi tossicologica proposti dalle legislazioni. Le opinioni della delegazione italiana, nell'ambito del sottogruppo Ecotossicologia della CEE, si sono fondate; oltre che sull'esperienza scientifica precedentemente acquisita, anche su questa attività ancora in corso e di cui è perciò prematuro presentare dei risultati.

3. ATTIVITA' DEL SOTTOGRUPPO ECOTOSSICOLOGIA DELLA CEE E PRINCIPALI ELEMENTI DI DISCUSSIONE.

La discussione e revisione relativa ai metodi di saggio di tossicità acuta su pesci e Daphnia è in una fase avanzata e prossima alla conclusione.

Il documento di base su cui tale discussione si è articolata è rappresentato dai metodi proposti ed approvati dal Gruppo "Ecotoxicology" del Chemical Testing Programme dell'OECD nell'ambito delle "Guidelines for testing of chemicals" (1980). Tali metodi rappresentano una sintesi di procedure standard proposte da diverse organizzazioni (EPA, 1975; EIFAC, 1975; APHA-AWWA-WPCF, 1975) da tempo in uso a livello di routine in vari paesi.

Alcuni di questi metodi sono stati oggetto di standardizzazione da parte dell'International Standard Organization (ISO, 1979, 1980). Inoltre due di essi (tossicità acuta su Daphnia e Brachidanio rerio) sono stati oggetto da parte della CEE di un ring-test a livello internazionale che ha fornito risultati soddisfacenti.

La sintesi dei metodi di tossicologia con organismi acquatici proposta nei documenti dell'OECD offre pertanto quelle garanzie di standardizzazione e riproducibilità che, come precedentemente esposto, rappresentano un essenziale requisito per saggi tossicologici di questo tipo.

Al di là dell'accordo sulle linee generali dei metodi proposti, sono tuttavia emersi dalla discussione alcuni punti controversi, in particolare per quanto attiene alla durata dei saggi, scelta delle specie, valutazione stati-

stica dei risultati, controllo analitico delle concentrazioni della sostanza in esame.

Si ritiene pertanto opportuna una esposizione relativa a tali argomenti, specialmente al fine di chiarire i fondamenti scientifici sui quali si sono basate le posizioni della delegazione italiana.

a) Durata del saggio.

La discussione su questo punto nel caso del saggio su pesci ha evidenziato una contrapposizione tra due differenti posizioni, la prima che sosteneva la necessità di protrarre le osservazioni fino a 96 ore, come previsto nel metodo proposto dall'OCDE, la seconda che sosteneva una riduzione a 48 ore del tempo sperimentale, per motivi essenzialmente economici.

Si è pervenuti ad una formulazione di compromesso che impone come durata minima del saggio le 48 ore ma indica come preferibile una durata di 96 ore. Si richiedono osservazioni operate almeno ogni 24 ore, mentre si considerano desiderabili osservazioni dopo le prime 3 e 6 ore.

In merito a questo problema esistono fondati argomenti per sostenere che 96 ore di trattamento rappresentano la durata più appropriata, in grado di fornire i risultati più significativi.

L'obiettivo di un saggio di tossicità acuta di una sostanza su pesci potrebbe essere semplicemente quello di fornire un valore di LC50 ad un tempo determinato; tuttavia l'obiettivo più appropriato è quello di identificare una concentrazione soglia (LC50 per un tempo indeterminato), cioè una concentrazione oltre la quale la curva di tossicità si presenta asintotica rispetto all'asse dei tempi (Fig. 1).

In un'ampia rassegna Sprague (1969) fa notare che, su 375 casi esaminati, solamente 42 raggiungono la soglia in un tempo notevolmente superiore ai 4 giorni di trattamento, in 122 casi la soglia viene raggiunta in un tempo prossimo ai 4 giorni, 211 la raggiungono in meno di 4 giorni.

Su queste basi è possibile indicare le 96 ore di trattamento come un tempo più idoneo, rispetto alle 48 ore, per la definizione della soglia di tossicità.

Ciò nonostante, nell'ambito della discussione non si è ritenuto necessario sostenere, su questo argomento, una posizione assolutamente rigida. Infatti si ritiene che, per le esigenze del fascicolo di base che ha la funzione di fornire indicazioni generali e di servire da supporto per eventuali successive indagini più approfondite e sofisticate, la formulazione di compromesso raggiunta possa costituire una soluzione sufficientemente adeguata, se pure non pienamente soddisfacente da un punto di vista strettamente scientifico. Le osservazioni operate a tempi intermedi potrebbero comunque consentire la costruzione di almeno una parte della curva e l'identificazione di un andamento.

Per quanto attiene al saggio di tossicità acuta su Daphnia non si ritiene invece opportuno un prolungamento del tempo sperimentale fino a 48 ore, come suggerito da alcuni componenti del Gruppo, in quanto questo tempo risulta troppo lungo per una prova condotta su stadi giovanili non alimentati.

La possibilità di ottenere elevate mortalità nei controlli in simili condizioni è tale da annullare gli eventuali vantaggi ottenibili da un prolungamento della durata del saggio.

Si ritiene pertanto che le 24 ore siano il più idoneo tempo sperimentale come confermato anche dalla pratica applicazione di questo tipo di saggio (Muller, 1979; Calamari e Coll., 1980).

b) Scelta delle specie.

Il problema della scelta delle specie si è posto essenzialmente nel caso del test sul pesce e la discussione è stata articolata secondo tre differenti posizioni:

- proposizione di un'unica specie da utilizzare nei tests (Brachidanio rerio) al fine di garantire la massima confrontabilità dei risultati;
- nessuna indicazione di specie raccomandate e massima libertà da parte dell'operatore di utilizzare la specie che, per motivi pratici, ritiene più favorevole;
- proposizione di un elenco di specie raccomandate, scel-

te tra quelle di più diffusa utilizzazione per tests tossicologici e rispondenti ai requisiti precedentemente indicati, comprendente sia forme di acque calde che forme di acque fredde.

Il gruppo si è orientato verso la terza posizione, che anche la delegazione italiana ha ritenuto la più idonea, e che rappresenta peraltro l'indicazione contenuta nel documento OECD, sia pure con modifiche marginali.

Il problema della scelta delle specie e della variabilità della risposta tra specie diverse è una questione ampiamente dibattuta.

L'affermazione, apparentemente logica, che sostiene l'opportunità di utilizzare la specie più sensibile, non trova facilmente riscontro nella realtà. Infatti spesso fra gruppi di animali "sensibili" si possono avere inversioni nella graduatoria di sensibilità nei riguardi di differenti sostanze. Inoltre è necessario tener conto della esistenza di sostanze tossiche selettive. E' noto ad esempio che i Salmonidi sono in genere considerati tra i più sensibili pesci d'acqua dolce, ma è stato possibile selezionare sostanze piscicide specifiche, letali per la maggior parte dei pesci ma senza effetti apparenti sui Salmonidi (Brown, 1978).

Di fatto, se pure in linea generale è possibile indicare determinate specie più sensibili di altre, non è possibile stabilire a priori che una specie, molto sensibile nei riguardi di determinate sostanze tossiche, lo sia anche nei riguardi di sostanze diverse.

Secondo Sprague (1973), sebbene sussista l'opportunità di orientare la pratica dei saggi tossicologici verso specie standard, non è possibile individuare una singola specie pienamente soddisfacente sotto tutti i punti di vista.

Per quanto riguarda il problema della confrontabilità tra specie diverse, sussistono quindi opinioni discordanti. Se da un lato si può sostenere che un saggio tossicologico fornisce indicazioni relative esclusivamente alla particolare specie utilizzata (Brown, 1978), dall'altro esiste una casistica che dimostra come sia possibile individuare relazioni relativamente costanti fra diverse specie per un certo numero di tossici. Fra le prime ricerche su questo argomento si può citare il lavoro effettuato al Water Research Center in Inghilterra (Alabaster, 1970). Più recentemente Kenaga (1978) ha dimostrato che

tra alcune specie ittiche esistono significative correlazioni nella risposta a vari tossici. Infine indagini sulla tossicità di alcuni clorobenzeni (IRSA, 1980) hanno dimostrato come le differenze di sensibilità tra Brachidionio rerio e avannotti di Salmo gairdneri sia in un rapporto costante di circa 3/1.

Le differenze di sensibilità tra diverse specie itti che vengono generalmente sopravvalutate e spesso possono risultare inferiori alla variabilità ottenibile sulla stessa specie in condizioni differenti (Sprague, 1973).

In alcune rassegne sulla tossicità di un composto possono comparire ambiti di tossicità acuta compresi tra 1 e 1.000 su differenti animali. Le cause di tale variabilità, ad una accurata indagine critica, appaiono potersi ascrivere, salvo rare eccezioni, a differenze nei metodi di trattamento (caratteristiche chimiche e fisiche dell'acqua, stadi di sviluppo, ecc.) oppure attribuibili a procedure sperimentali imprecise o non corrette soprattutto nei lavori meno recenti.

Ball (1967 a e b) ha confrontato l'effetto tossico di ammoniaca e zinco su diverse specie ittiche. Mentre nel caso dell'ammoniaca non si riscontrano ampie differenze di sensibilità tra le diverse specie, nel caso dello zinco tali differenze sono più accentuate; tuttavia il rapporto tra la soglia di concentrazione per la specie più resistente (Rutilus) e quella della specie più sensibile (Salmo) è inferiore a 3,8.

Ai fini di una caratterizzazione generale delle sostanze pericolose, differenze di risposta di tale entità sono da considerarsi di scarso rilievo. Infatti sistemi di classificazione delle sostanze chimiche in funzione del grado di tossicità proposti ad esempio dal GESAMP (1969) e dal U.S. Department of Health, Education and Welfare (Christensen e Luginbyhl, 1975) suggeriscono una suddivisione nelle categorie indicate nello schema seguente:

Soglia di tossicità acuta mg/l

Classe di tossicità	GESAMP	U.S. Dept. of Health Education and Welfare
1	<1	<1
2	1-100	1-10
3	100-1000	10-100
4	1000-10000	100-1000
5	>10000	>1000

Ne consegue che, ai fini di una caratterizzazione delle sostanze tossiche quale quella prevista nella VI modifica della direttiva CEE, può essere sufficiente, quanto meno a livello di "dossier di base", ottenere risultati tossicologici affidabili nell'ambito di un ordine di grandezza.

Quanto esposto non permette di escludere che alcune sostanze possano determinare effetti molto variabili su specie diverse. Walker e coll. (1964) hanno osservato che l'effetto tossico della Antimicina A su 24 diverse specie di pesci può variare entro un ambito di 3 ordini di grandezza, con valori estremi di LC50-96 ore pari a 0,03 µg/l per la trota e 17,3 µg/l per il pesce gatto.

Fermo restando che tali valori permettono comunque di classificare la Antimicina A tra le sostanze molto tossiche secondo gli schemi precedentemente indicati, si ritiene che casi del genere siano da considerarsi come eccezioni ad una generalizzazione che rimane peraltro valida.

In conclusione non si ritiene che la possibilità di utilizzare specie ittiche diverse possa rappresentare un reale ostacolo alla effettiva confrontabilità ed interpretazione dei risultati volti a fornire informazioni di carattere indicativo sui possibili rischi insiti nella immissione di una sostanza nell'ambiente acquatico.

Si è ritenuta peraltro opportuna la proposizione di una lista di specie raccomandate, che includa le forme maggiormente utilizzate ed ampiamente collaudate in saggi tossicologici a livello routinario, quanto meno per garantire che la specie utilizzata risponda ai requisiti fondamentali precedentemente esposti.

Per quanto riguarda il test Daphnia è stata accettata la possibilità di utilizzare tanto la specie D.magna quanto D.pulex, trattandosi di forme estremamente simili sia relativamente alle caratteristiche generali (fisiologia, riproduzione, possibilità di allevamento, ecc.), sia relativamente alla sensibilità alle sostanze tossiche. Non si è posto il problema della eventuale introduzione di altre specie in quanto, allo stato attuale, nessun altro crostaceo planctonico è stato introdotto in modo paragonabile nella pratica di saggio tossicologico.

c) Elaborazione statistica dei risultati.

Il metodo proposto, sia nel caso dei pesci che della Daphnia, prevede il calcolo della LC50 e dei limiti fiduciali con le procedure usuali (Lichtfield e Wilcoxon, 1949), quando i risultati del saggio lo rendano possibile. In caso contrario, ed in particolare quando due concentrazioni consecutive, ad un rapporto di concentrazione di 1,8 determinano 0% e 100% di mortalità, questi due valori sono sufficienti per indicare l'ambito entro cui è compresa la LC50.

Sebbene questo argomento non abbia determinato una particolare conflittualità nell'ambito del gruppo e sia stato possibile raggiungere un accordo con relativa facilità, si è ugualmente sviluppata una discussione sulla necessità o meno di saggiare concentrazioni che determinino livelli intermedi di mortalità.

Il problema della necessità di mortalità parziali per la significatività dei risultati di un test tossicologico è stato ampiamente discusso da Stephan (1976) che, dopo aver confutato alcuni argomenti a favore di tale necessità, conclude che anche in assenza di mortalità parziali è possibile ricavare informazioni utili e significative da un saggio tossicologico purchè gli intervalli tra le concentrazioni saggiate siano sufficientemente ridotti. Stephan indica un fattore di diluizione di 0,6 come un valore adeguato. Tale valore, che corrisponde ad un fattore di concentrazione di circa 1,7 è in buon accordo con quello di 1,8 indicato nei metodi proposti per l'allegato V. La scelta di questo fattore di concentrazione appare ragionevole in quanto, per determinate classi di sostanze per le quali i processi di intossicazione sono molto rapidi e gli effetti si manifestano in un ambito di concentrazione molto ristretto, una sensibile riduzione del fattore di concentrazione potrebbe portare a risultati paradossali quali mortalità elevata alla concentrazione inferiore e elevata sopravvivenza alla concentrazione superiore; ciò sarebbe imputabile semplicemente a problemi di variabilità biologica.

In conclusione pertanto si ritiene che, anche in assenza di mortalità parziali, un'indicazione di LC50 compresa tra due concentrazioni che differiscono tra loro per un fattore non superiore a 1,8 sia da considerarsi ampiamente sufficiente per gli scopi che si prefigge il dossier di base dell'allegato V.

Per quanto riguarda il numero di individui da utilizzare (10 nel caso dei pesci, 20 nel caso di Daphnia) ed il numero di concentrazioni da saggiare (almeno 5 concentrazioni e 1 controllo) è stato raggiunto un facile accordo sulle indicazioni contenute nel documento dell'OECD.

d) Controllo analitico delle concentrazioni delle sostanze da saggiare.

Il problema del mantenimento in soluzione delle sostanze durante tutto il periodo sperimentale, in particolare nel caso di prodotti volatili o poco solubili, deve essere affrontato con estrema attenzione per evitare risultati che in molti casi possono essere estremamente devianti. Mentre il test sulla Daphnia, nel caso di sostanze volatili, deve essere condotto in recipienti chiusi completamente riempiti e pertanto non si pone il problema, per i pesci si richiede l'evidenza, o dal controllo analitico, o dalle proprietà chimiche della sostanza o dal sistema di saggio adottato (statico o in flusso continuo), che la concentrazione della sostanza sia mantenuta in modo soddisfacente (cioè entro l'80% della concentrazione iniziale) in tutto il periodo sperimentale. Una rigida impostazione del controllo analitico della sostanza in esame ha trovato forti opposizioni sostenute sia da eventuali difficoltà metodologiche che da costi troppo elevati.

Sebbene si comprendano i motivi di tale opposizione si ritiene che in molti casi il controllo analitico rappresenti l'unica realistica possibilità per garantire quell'"evidenza" di costanza di concentrazione richiesta nelle specifiche del metodo.

D'altro canto, nel caso di sostanze molto volatili e potenzialmente pericolose, l'attuazione di tests ittici in flusso continuo può presentare difficoltà logistiche e problemi pratici non superabili a costi contenuti.

Inoltre se pure è certamente possibile prevedere con buona approssimazione, sulla base delle informazioni chimico fisiche, il comportamento di una sostanza quando sia disciolta in acqua in condizioni note, tale previsione risulta molto più difficile e meno accurata quando si considerino le possibili interazioni nel corso della prova tossicologica tra la sostanza e la componente biotica, la so

stanza ed i materiali impiegati nel saggio (recipienti, tubi, piastre di aereazione, ecc.), nonché le condizioni del saggio stesso (aereazione, modificazione delle caratteristiche dell'acqua dovute alla presenza di animali, ecc.).

E' per questi motivi che si sostiene la particolare importanza del controllo analitico per una garanzia della costanza della concentrazione della sostanza saggiata.

Peraltro, mentre nel caso dei saggi sui pesci potranno essere sufficienti alcuni accorgimenti a rendere possibile una conduzione adeguatamente corretta della prova (copertura delle vasche, saggi in recipienti chiusi, campana di ossigeno, ecc.), il problema del mantenimento in soluzione delle sostanze con elevata tensione di vapore si porrà con ancora maggiore evidenza nel caso del saggio algale, previsto per il livello 1, per il quale si opera con piccoli volumi in condizioni di agitazione. Nel caso dei tests di crescita algale inoltre operare in recipienti chiusi con ridotta camera d'aria può determinare crescita anomale dovute ad inadeguato rifornimento di CO_2 , mentre l'attuazione di flussi continui potrebbe far cadere quei requisiti di semplicità operativa e di basso costo che costituiscono uno dei maggiori vantaggi del saggio.

In un recente lavoro volto a mettere a punto una tecnica di saggio algale statico per sostanze volatili (Gallassi e Vighi, 1981) è stato dimostrato che i valori di EC50 di alcuni clorobenzeni riportati in letteratura erano sovrastimati per circa 2 ordini di grandezza. Ciò conferma che una inadeguata conoscenza delle effettive concentrazioni in soluzione delle sostanze saggiate può portare ad errori che in alcuni casi possono risultare quindi ampiamente al di fuori di quegli ambiti di variabilità che precedentemente si sono considerati accettabili in saggi di questo tipo. Di conseguenza, se pure il criterio della economicità deve essere costantemente tenuto presente in saggi di base e legati ad una normativa quali quelli previsti dall'allegato V, ciò non deve andare a scapito della effettiva significatività dei risultati.

Un ulteriore argomento, che non ha creato particolare conflittualità nell'ambito della discussione tenuta dal gruppo di lavori, ma che rappresenta nella comunità scientifica un problema su cui esistono opinioni divergenti, riguarda le caratteristiche delle acque da utilizzare nei saggi. Si anticipano pertanto alcune considerazioni nel caso che il problema venisse sollevato in futuro.

E' noto da tempo che le caratteristiche chimiche e

fisiche delle acque (durezza, pH, composizione ionica, ecc.) possono influenzare i risultati di saggi di tossicità.

Per quanto riguarda ad esempio l'influenza della durezza sulla tossicità dei metalli, i cui effetti sono stati ampiamente studiati, in condizioni estreme (da 10 a 300 mg CaCO_3/l) si sono rilevate in alcuni casi differenze massime di tossicità dell'ordine di circa 25 volte. Una ampia casistica è riportata nel volume curato da Alabaster e Lloyd (1980).

Si ritiene però che operando entro gli ambiti indicati, per i diversi parametri chimici e fisici dell'acqua, nei metodi proposti, le possibili variazioni della risposta potranno, nella maggioranza dei casi, essere comprese in ambiti non troppo ampi e pertanto presentare in generale differenze non superiori ad un ordine di grandezza. Per cui, se le sostanze venissero raggruppate secondo schemi molto diffusi quali quelli citati in precedenza (GESAMP, 1969; Christensen e Luginbyhl, 1975) non si dovrebbero rilevare sensibili mutamenti nelle sequenze in cui le molecole potrebbero venire raggruppate.

4. CONCLUSIONI

Dal complesso delle considerazioni esposte nei paragrafi precedenti, è possibile formulare un giudizio generale sull'approccio previsto dal dossier di base dell'allegato V relativamente ai saggi ecotossicologici. Se pure si ritiene che sussistano alcune carenze di ordine generale (ad esempio la mancanza di un saggio sulla componente algale) e se pure si discordi in parte su alcuni aspetti delle formulazioni relative ai dettagli dei metodi (ad esempio sulla durata dei saggi), queste obiezioni non sono tali da escludere la possibilità di un giudizio complessivamente positivo. Si ritiene pertanto che l'impostazione generale del dossier di base, dal punto di vista ecotossicologico, possa fornire risultati adeguati a rispondere agli obiettivi che si prefigge pur nel rispetto dei requisiti di una relativa semplicità operativa ed economicità.

Rimangono da valutare, in sede conclusiva, gli eventuali problemi che potranno essere posti alla comunità scientifica dalla applicazione della direttiva.

Tali problemi potranno assumere maggiore rilevanza in funzione della eventuale produzione di informazioni analoghe a quelle previste dal dossier di base anche per le sostanze attualmente in uso.

Poichè l'obiettivo è quello di pervenire ad una individuazione e caratterizzazione delle sostanze pericolose, un primo e più pressante problema è rappresentato dalla necessità di definire dei criteri generali che possano permettere di discriminare tra le sostanze chimiche quelle pericolose da quelle meno pericolose. Se pure il complesso delle informazioni di varia natura (chimica, fisica, tossicologica, ecc.) previste dal dossier di base è tale da fornire gli elementi necessari per una descrizione di massima delle caratteristiche di una sostanza, il problema dell'utilizzazione di tali informazioni per una valutazione integrata della pericolosità rimane a tutt'oggi irrisolto. In altre parole, se pure con qualche difficoltà, è possibile definire per molti singoli parametri delle classi di valore entro cui le sostanze possono essere raggruppate, mentre risulta estremamente problematica allo stato attuale la formazione di classi che tengano conto del complesso delle informazioni. Infatti pur essendo stati formulati alcuni sistemi integrati di valutazione quali ad esempio quelli proposti da Weber (1977) e Canton e Sloof (1979) non sussiste su nessuno di essi un sufficiente consenso.

Un secondo problema è rappresentato dalle difficoltà insite nel trasferimento dei dati di laboratorio all'ambiente naturale.

Questa problematica non si riferisce in particolare alla confrontabilità delle risposte di saggi di tossicità acuta in campagna ed in laboratorio, che in generale si è rivelata soddisfacente, quanto piuttosto al comportamento ed al destino delle sostanze nell'ambiente ed ai possibili effetti a lungo termine.

Resta pertanto un problema aperto la costruzione di semplici modelli per lo studio dei cicli biogeochimici delle sostanze in cui possano essere introdotti utilmente i dati contenuti nel dossier di base.

Si intende infine fare riferimento ad un terzo aspetto che ha rappresentato in tempi relativamente recenti uno degli orientamenti più significativi dell'indagine ecotossicologica che consiste nella previsione del comportamento nell'ambiente e dell'attività biologica di molecole sconosciute, in funzione delle loro caratteristiche chimiche

e fisiche, sulla base dei dati esistenti relativi a molecole con caratteristiche note.

Lo sviluppo di sistemi QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) (Hansch, 1969) è previsto ad esempio negli USA allo scopo di ottenere un vaglio iniziale delle sostanze nell'ambito del TSCA, per la definizione di strategie volte all'accertamento del rischio ambientale, per stabilire una scala di priorità per lo sviluppo di criteri di qualità delle acque e per ottimizzare i programmi nazionali di monitoraggio delle sostanze tossiche (Veith, 1980).

Le informazioni contenute nel dossier di base potranno essere utilizzate per studi sulle relazioni quantitative tra struttura e attività.

Ciò potrebbe consentire in futuro di arricchire le capacità di previsione sulla circolazione e sugli effetti delle molecole e di limitare il più possibile la necessità della conduzione di prove di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Adema D.M.M. (1978): Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests. Hydrobiologia, 59, 125.
2. Alabaster J.S. (1970): Testing the toxicity of effluents to fish. Chemistry and Industry, 13, 759.
3. Alabaster J.S. e Lloyd R. (eds.) (1980): Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Butterworths, London.
4. APHA, AWWA, WPCF (1975): Standard methods for the examination of water and wastewater. 14° Ed., American Public Health Association, New York.
5. ASTM (1973): Biological methods for the assessment of water quality. Cairns J. Jr. and Dickson K.L. Eds., ASTM-STP 528.
6. ASTM (1977): Aquatic toxicology and hazard evaluation. Mayer F.L. and Hamelink J.L. Eds., ASTM-STP 634.
7. ASTM (1978): Estimating the hazard of chemical sub -

- stances to aquatic life. Cairns J. Jr., Dickson K.L. and Maki A.W. Eds., ASTM-STP 675.
8. Ball I.R. (1967 a): The relative susceptibilities of some species of freshwater fish to poisons. I: Ammonia. Wat. Res., 1, 767.
 9. Ball I.R. (1967 b): The relative susceptibilities of some species of freshwater fish to poisons. II: Zinc. Wat. Res., 1, 777.
 10. Biesinger K.F. e Christensen G.M. (1972): Effect of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of Daphnia magna. J. Fish. Res. Bd. Canada, 29, 1961.
 11. Blank M., Dave G. e Gustafson K. (1978): An annotated literature survey of methods for determination of effects and fate of pollutants in aquatic environment. National Swedish Environment Protection Board, SNV FM 105°.
 12. Brown V.M. (1978): Assessment of the toxicity of chemicals to fishes. Berichte 10 des Umweltbundesamt, 75.
 13. Calamari D., Da Gasso R., Galassi S., Provini A. e Vighi M. (1980): Biodegradation and toxicity of selected amines on aquatic organisms. Chemosphere, 9, 753.
 14. Canton J.H. e Adema D.M.H. (1978): Reproducibility of short term and reproduction toxicity experiments with Daphnia magna and comparison of the sensitivity of Daphnia magna with Daphnia pulex and Daphnia cucullata in short-term experiments. Hydrobiologia, 59, 135.
 15. Canton J.H. e Sloof W. (1979): A proposal to classify compounds and to establish water quality criteria based on laboratory data. Ecotoxicol. Environ. Safety, 3, 126.
 16. Christensen H.E. e Luginbyhl T.T. (1975): Registry of toxic effects of chemical substances. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare.
 17. EIFAC (1975): Report of fish testing procedure. EIFAC tech. Pap. 24.
 18. EPA (1971): Algal Assay Procedure: Bottle test. National Eutrophication Research Programm, Corvallis, Oregon.
 19. EPA (1975): Method for the acute toxicity tests with fish, Macroinvertebrates and Amphibians. Ecological Research Series EPA-660-75-009.

20. EPA (1978): The Selenastrum capricornutum Prints algal assay bottle test. EPA-600/9-78-018.
21. Galassi S. e Vighi M. (1981): Testing volatile substances with algae (in stampa).
22. GESAMP (1969): Abstract of the report of the first session. Wat. Res., 3, 995.
23. Hansch C. (1969): A quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. Accounts Chem. Res., 2, 232.
24. IRSA (1980): Rapporto di attività 1979. Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque N° 54, Roma.
25. ISO (1979): Détermination de l'inhibition de la mortalité de Daphnia magna Strauss (Cladocera, Crustacea). ISO/TC 147/SC 5/WG2, DIS 6341.
26. ISO (1980): Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method. ISO/TC 147/SC5/WG3-Document 7346/I, II, III.
27. Kenaga E.E. (1978): Tests organisms and methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals. Environ. Sci. Technol., 12, 1322.
28. Lichtfield J.T. e Wilcoxon F. (1949): A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96, 99.
29. Muller H.G. (1980): Experiences with test systems using Daphnia magna. Ecotox. Environ. Safety, 4, 21.
30. OECD Ecotoxicology Group (1979): Report on the assessment of potential environmental effects of chemicals The effects on organisms other than man and on ecosystems. Chemicals Testing Programme Ecotoxicology Group OECD.
31. OECD (1980): Guidelines for testing of chemicals. Chemical Testing Programme OECD.
32. Scherer E. (ed.) (1979): Toxicity tests for freshwater organisms. Can. Publ. Fish. Aquat. Sci., 44.
33. Sprague J.B. (1969): Measurement of pollutant toxicity to fish. 1. Bioassay methods for acute toxicity. Wat. Res., 3, 793.
34. Sprague J.B. (1970): Measurement of pollutant toxicity to fish. 2. Utilizing and applying bioassay results. Wat. Res., 4, 3

35. Sprague J.B. (1971): Measurement of pollutant toxicity to fish. 3. Sublethal effects and "safe" concentration. Wat. Res., 5, 245.
36. Sprague J. B. (1973): The ABC's of pollutant bioassay using fish. ASTM-STP 528, 6.
37. Stephan C.E. (1977): Methods for calculating an LC50. ASTM-STP 634, 65.
38. Umweltbundesamt (1978): Tests for the ecological effects of chemicals. Commission of the European Communities, Proceedings of a Research Seminar, Berichte 10 des Umweltbundesamt.
39. Veith G.D. (1980): State-of the art report on structure activity methods development. U.S. EPA, Research and Development, Environ. Res. Lab., Duluth, USA.
40. Veith G.D. e Konasewich D.E. (eds.) (1975): Structure activity correlation in studies of toxicity and bioconcentration with aquatic organisms. Proceeding of Symposium. Burlington, Canada. U.S. EPA - Environ.Res Lab. Duluth, USA.
41. Walker C.R., Lennon R.E. e Berger B.L. (1964): Investigations in fish control. Bureau Sport Fisheries and Wildlife, n° 186.
42. Weber J.B. (1977): The pesticide scorecard. Environ. Sci. Technol., 11, 756.

Didascalia della figura

Figura 1 - Esempi di curve di tossicità.

Nel caso A la soglia di tossicità viene raggiunta entro le 48 ore, nel caso B viene raggiunta entro le 96 ore, nel caso C la soglia potrà essere raggiunta in un tempo molto superiore alle 96 ore.

Sebbene i valori di 48hLC50 risultino molto vicini nei tre casi, i valori delle 96hLC50 risultano più prossimi alle soglie di tossicità.

