

METODI TOSSICOLOGICI PER L'ALLEGATO V DELLA DIRETTIVA

M.T. VAN DER VENNE
Direzione Generale V della CEE, Luxembourg

RIASSUNTO. - La Commissione delle Comunità Europee ha partecipato fin dall'inizio ai lavori dell'OCSE sull'elaborazione dei metodi di tossicità a breve e lungo termine, che hanno condotto alle "linee-guida dell'OCSE".

I metodi tossicologici dell'Allegato V della 6^a Modifica della direttiva sulle sostanze pericolose sono stati redatti da un gruppo di esperti nazionali.

I metodi corrispondenti al dossier di base sono stati definiti ed approvati dagli Stati membri.

Vengono ricordati alcuni dettagli significativi di questi metodi.

L'immissione sul mercato di nuove sostanze adeguatamente etichettate e classificate rappresenta una garanzia per evitare una dispersione incontrollata di sostanze che, pur essendo utili per la qualità della vita, possono rappresentare un certo rischio per la salute o per l'ambiente. La valutazione del rischio/beneficio è di competenza degli Stati membri.

Per assicurare sia l'assenza di ostacoli tecnici agli scambi che la protezione sanitaria della popolazione suscettibile di esposizione, è auspicabile che le vedute siano il più possibile armonizzate in questo campo, ed in particolare per i metodi tossicologici.

Questa esposizione si limita a questo argomento.

Dal 1976 la Commissione è impegnata nell'elaborazione delle linee direttrici per la valutazione di composti sottoposti a tests tossicologici, e nell'organizzazione di un Colloquio Internazionale tenutosi quest'anno a Lussemburgo su "The evaluation of toxicological data for the protection of public health" (EUR 5727).

In altre organizzazioni internazionali quale l'OMS e il Consiglio d'Europa questi problemi erano ugualmente considerati.

Più specificamente, nel quadro dell'OCSE in cui la Commissione ha partecipato sin dall'inizio ai Gruppi di lavoro di tossicologia a breve e lungo termine, ed ha collaborato all'elaborazione delle linee direttrici per la tossicologia, la Commissione ha trovato la sede che permettesse gli scambi fra i vari Paesi che vi partecipano, e soprattutto gli Stati Uniti, il Giappone, in vista del riconoscimento reciproco delle informazioni che permetterebbero l'eliminazione degli ostacoli tecnici agli scambi, e tenuto conto dei tests effettuati, della valutazione degli effetti sulla salute.

La Commissione non desidera favorire l'uso indiscriminato dei tests sugli animali, ma, pur incoraggiando lo sviluppo dei tests in vitro o sostitutivi, occorre riconoscere che alcuni tests non possono ancora essere sostituiti.

Tenuto conto di tutti questi elementi un Gruppo di esperti nazionali ha redatto i metodi tossicologici per l'Allegato V partendo dai principi delle linee direttrici dell'OCSE.

In tutti gli ambienti il dossier di base è stato riconosciuto valido per la notifica delle nuove sostanze chimiche e la valutazione dei pericoli per la salute umana.

Tutti i metodi biologici hanno i loro limiti, tuttavia le opere di riferimento per la tossicologia, l'esperienza acquisita da questa scienza in evoluzione e gli effetti osservati sull'uomo hanno permesso di confermare l'utilità dei tests che sono stati sviluppati nell'ambito della Commissione e dell'OCSE.

Val la pena ricordare i diversi metodi del dossier di base:

- tossicità acuta orale, cutanea, inalatoria per dosaggio

unico della sostanza da provare con, nella descrizione del metodo, un test limite che consentirebbe di trarre alcune conclusioni sullo svolgimento successivo dei tests da effettuare. La direttiva prevede due vie di somministrazione in cui una è quella orale, e la logica impone che per i gas e le sostanze volatili sia utilizzata la via inalatoria. Nel metodo vengono indicati un numero di dettagli sufficienti ad assicurare una armonizzazione nella procedura pur conservando la flessibilità necessaria. Tale flessibilità viene richiesta da tutti i tossicologi che effettuano questo tipo di sperimentazione animale. La massima importanza viene accordata agli effetti osservati e ad una adeguata e completa redazione del rapporto sul test effettuato;

- tossicità orale, cutanea ed inalatoria per dosaggio ripetuto della sostanza per un periodo fissato di 28 giorni. Gli effetti osservati in seguito a questa somministrazione ripetuta forniscono informazioni utili quali il possibile accumulo della sostanza ed il suo metabolismo allo stadio elementare;
- l'irritazione cutanea ed oculare presenta un grande interesse per il pericolo che rappresenta l'esposizione cutanea nell'uomo e quella accidentale oculare di una nuova sostanza ed è la base per l'etichettatura di queste sostanze.

La reazione di sensibilizzazione cutanea presenta ugualmente informazioni utili per l'esposizione della popolazione.

Gli esperti nazionali hanno selezionato il "Test di massimizzazione su cavia" per la sua larga diffusione e le sue possibilità di determinare le sostanze potenzialmente sensibilizzanti per la pelle umana.

I tests preliminari di mutagenesi sono stati scelti in funzione dell'esigenza del dossier di base, che prevede un test procariotico ed eucariotico con e senza attivazione. Si tratta del test della Salmonella typhimurium e del test "in vitro" citogenetico. Altri tre tests redatti nel quadro dell'OCSE sono stati ugualmente adattati e redatti dagli esperti nazionali, e comprendono il test su E.coli, il test citogenetico "in vivo", il test del micro nucleo.

L'Allegato VIII dovrà essere ulteriormente considerato ora che i tests relativi all'Allegato VII sono stati finalizzati. I principi indicati nelle linee direttrici dell'OCSE, così come per l'Allegato VII, serviranno come

base per la redazione dei metodi. Si tratta principalmente del test a 90 giorni, dello studio a lungo termine, della cancerogenesi a lungo termine, dello studio sulla riproduzione, della teratogenesi, ecc.

I tests ulteriori di mutagenesi dovranno essere descritti come per il dossier di base e la loro sequenzialità dovrà essere considerata in funzione dei livelli 1 e 2.

Concludo qui questa breve introduzione sugli aspetti generali dei metodi tossicologici dell'Allegato V. Vorrei approfittare di questa occasione per ringraziare gli esperti nazionali che hanno collaborato in maniera ammirevole alla redazione dei metodi tossicologici e che, con un lavoro intenso e difficile, hanno permesso che questi metodi vengano approvati dagli Stati membri.

Vi ringrazio per la vostra attenzione.

PROPRIETA' FISICO-CHIMICHE

S. CAROLI, R. BINETTI, F. PETRUCCI
Istituto Superiore di Sanità, Roma

RIASSUNTO. - Quanto prescritto nell'Allegato VII della 6^a Modifica della Direttiva C.E.E. sulle sostanze pericolose in materia di caratterizzazioni fisico-chimiche costituisce nel suo insieme uno strumento di notevole versatilità per poter stimare in via preliminare da un lato l'impatto e la distribuzione di nuovi prodotti chimici nell'ambiente, dall'altro i rischi di reazioni chimiche violente connesse con la loro manipolazione. Nell'ambito del primo obiettivo rientrano il punto di fusione, il punto di ebollizione, la densità relativa, la tensione di vapore, la tensione superficiale, l'idrosolubilità, la liposolubilità ed il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua, mentre l'infiammabilità, l'autoinfiammabilità, l'esplosività, e le proprietà ossidanti si inquadrano sotto la seconda prospettiva.

L'Allegato V nella sua stesura definitiva conterrà a sua volta i metodi per la determinazione dei parametri suddetti. Sin da ora è comunque possibile constatare che la intera struttura è sufficientemente flessibile per adeguarsi ad esigenze concrete e garantire la massima economia compatibile con l'esecuzione di prove scientificamente attendibili. Alcuni dei punti più delicati connessi con queste determinazioni sono ravvisabili nel grado di accuratezza con cui le misure devono essere condotte e nella purezza delle sostanze da esaminare. In ogni caso risulta evidente che ambedue i requisiti citati sono commisurati all'esigenza di ottenere dati ragionevolmente predittivi dal punto di vista della protezione ambientale. Un tale traguardo è raggiunto dalla Direttiva 79/831 in maniera efficace e non eccessivamente onerosa per il notificante. Il

tunitense e legislazione europea ai fini di un reciproco riconoscimento. le proprietà fisico-chimiche prescritte dalla Sesta Modifica ed i metodi relativi alla loro determinazione si ispirano in larga misura a quanto elaborato in quella sede, con le modifiche tuttavia che le differenti finalità delle due organizzazioni rendevano indispensabili. Il numero delle grandezze fisico-chimiche richiesto dalla Sesta Modifica è così soltanto di 13, se si escludono dal loro novero alcuni parametri di cui si dirà poi a parte, riducendo tra l'altro, ove possibile, quello dei metodi da adottare per le rispettive determinazioni. Va sottolineato senza ambiguità che questo non comporta alcuno scadimento apprezzabile delle capacità predittive delle prove nel loro insieme, mentre viene raggiunto l'obiettivo certo non trascurabile di snellire non indifferentemente il carico dei dati richiesti al notificante.

Le Tabelle 1 e 2 seguenti riportano le proprietà richieste, suddividendole in due gruppi principali, rispettivamente dedicati a quelle più rilevanti sotto il profilo identificativo e della diffusione nell'ambiente, ed a quelle che invece trattano e definiscono in modo più specifico il rischio di violente reazioni chimiche nelle normali condizioni ambientali. Per ciascuna proprietà vengono inoltre riportati i metodi che, anche se con qualche frangia d'incertezza, saranno quelli dettagliati nell'Allegato V.

TAVOLA 1

Caratteristiche Fisico-chimiche Rilevanti ai Fini dell'Identificazione e della Mobilità nell'Ambiente

Proprietà	Metodi Previsti	Rilevanza per la Valutazione della		
		Mobilità	Degradazione	Accumulatione
Punto od Intervallo di Fusione ($^{\circ}\text{C}$)	1 - Tramite capillare: a) in bagno riscaldante, b) in blocco riscaldante, c) con fotocella; 2 - Tramite piastra riscaldante, a) con apparecchio di Kofler, b) con microscopio a fusione, c) principio del menisco; 3 - Solidificazione del fuso.		***	
Punto od Intervallo di Ebollizione ($^{\circ}\text{C}$, a pressione nota)	1 - Tramite ebullimetro; 2 - Metodo dinamico; 3 - Distillazione; 4 - Siwoloboff; 5 - Con fotocella.		***	
Densità Relativa (D_4^{20}) (per liquidi e solidi)	1 - Per sostanze liquide: a) tramite idrometro; b) con bilancia idrostatica; c) ad immersione di sfera; d) con picnometro; e) con densimetro a vibrazione; 2 - Per sostanze solide: a) con bilancia idrostatica; b) con picnometro; c) con picnometro a gas.		***	
Tensione di Vapore (Pa, a temperatura nota)	1 - Metodo dinamico; 2 - Metodo statico; 3 - Con isotermostato; 4 - Con bilancia a tensione di vapore; 5 - Tramite saturazione di gas.	***	**	*
Tensione Superficiale (Nm^{-1} , a temperatura nota) (per soluzioni acquose)	1 - Metodo di Wilhelmy; 2 - Metodo di Lenard; 3 - Metodo dell'anello; 4 - Metodo dell'anello secondo la modifica dell'O.E.C.D.	***	**	*
Idrosolubilità (mg l^{-1} , a temperatura nota)	1 - Tramite eluzione su colonna; 2 - Tramite dibattimento in pallone.	***	**	**
Liposolubilità (mg per 100 g di solvente, a temperatura nota)	1 - Per dibattimento in pallone		**	**
Coefficiente di Ripartizione n -ottanolo/acqua	1 - Tramite dibattimento delle due fasi.	**	*	***

(***) elevata; **, intermedia; *, modesta)

TAVOLA 2

Caratteristiche Fisico-chimiche Rilevanti ai Fini dell'Accertamento del Rischio di Reazioni Chimiche Violente

Proprietà	Metodi Previsti	Osservazioni
Punto di Infiammabilità (°C)	1 - In condizioni di equilibrio; 2 - In condizioni di non - equilibrio.	Determinazioni da eseguire in vaso aperto ed in vaso chiuso.
Infiammabilità (°C)	A) - Scintilla in cilindro di vetro; B) - 1: per immersione; 2: tramite posizionamento su carta da filtro in acqua; 3: per gocciolamento sulla sostanza; 4: per gocciolamento in recipiente chiuso; C) - Tramite misura della velocità di propagazione della combustione.	A) - Per sostanze gassose; B) - Per sostanze liquide o solide che sviluppano gas altamente infiammabili a contatto con l'acqua o l'aria umida; C) - Per sostanze solide infiammabili solo dopo innesco.
Esplosività	1 - Per caduta di un peso; 2 - Per innesco con una fiamma; 3 - Per sfregamento su piano di porcellana.	Distinta in esplosività in seguito ad urto, per riscaldamento e per sfregamento.
Autoinfiammabilità (°C)	1 - Per contatto con una superficie calda (gas e liquidi); 2 - Per riscaldamento in stufa (solidi e liquidi).	Distinta in autoinfiammabilità (gas e liquidi fortemente volatili) ed autoignizione (per liquidi e solidi).
Proprietà Comburenti	Tramite misura della velocità di combustione della sostanza in miscela con un combustibile.	

La figura 1 a sua volta dà una indicazione immediata di quali parametri sia utile disporre prima di affrontare la misura di una qualunque delle proprietà del primo gruppo, chiarendone nel contempo le interdipendenze. Un analogo schema non viene riportato per le proprietà del secondo gruppo, poiché le suddette correlazioni sono molto più limitate e saranno menzionate di volta in volta nelle sezioni corrispondenti.

Allo scopo di meglio dettagliare le informazioni riportate nelle tabelle e nella figura, i paragrafi seguenti prendono in esame le singole proprietà per quanto concerne alcuni aspetti di maggiore interesse, senza peraltro entrare nel merito di una illustrazione particolareggiata di tutti i metodi, che potrà in ogni caso essere desunta dal testo dell'Allegato V stesso.

3. PRIMO GRUPPO

3.1. Punto od intervallo di fusione

Determinazioni di questo tipo non offrono particolari difficoltà operative, e la scelta di metodi forniti dall'Allegato V copre con sufficiente ampiezza le diverse evenienze che possono verificarsi in pratica. Un'estesa serie di norme standardizzate da parte di organizzazioni quali l'ASTM, il DIN o l'ISO, consente inoltre di accedere prontamente a tutti i dettagli tecnici che dovessero rivelarsi necessari per una corretta esecuzione della prova. Non va comunque sottovalutato il fatto che l'uso di materiali di riferimento riveste un ruolo primario e che il grado di purezza delle sostanze esaminate diviene determinante per l'utilizzazione del parametro in oggetto a fini identificativi. Tali problematiche sono del resto comuni a tutte le proprietà di questo primo gruppo, anche se in maniera diseguale, e se ne darà pertanto una valutazione complessiva nella parte finale di questa trattazione. Per il punto di fusione vale la pena di sottolineare invece che nel complesso i metodi previsti dall'Allegato V consentono misure con una accuratezza compresa tra $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, e che ciò è più che sufficiente per gli scopi contemplati dalla Direttiva, senza rendere la determinazione stessa eccessivamente complessa ed onerosa. Le apparecchiature

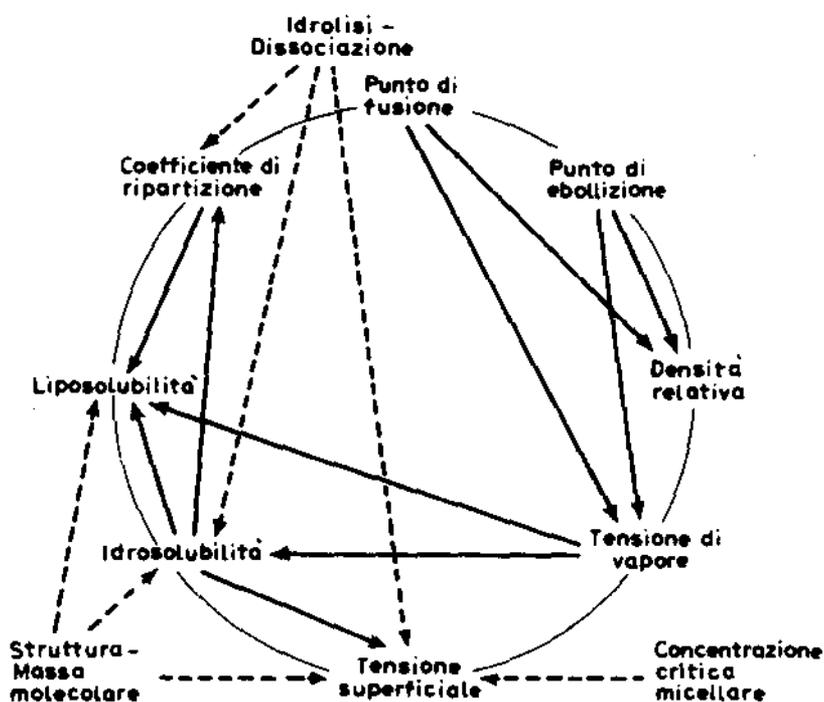


FIG.- Relazioni di interdipendenza per le proprietà del primo gruppo. I parametri da cui si dipartono le frecce sono utili come prerequisiti nella determinazione di quelli in cui le frecce confluiscono. Le proprietà disposte sulla circonferenza sono quelle prescritte al punto 3 dell'Allegato V, mentre quelle disposte all'esterno sono più o meno esplicitamente richieste in altre parti della Sesta Modifica.

ture necessarie sono largamente diffuse e di grande semplicità d'uso, fatto salvo il principio a cui prima si accennava di una loro accurata calibrazione periodica (3).

3.2. Punto od intervallo di ebollizione

Considerazioni del tutto analoghe a quelle fatte per le proprietà precedenti valgono anche in questo caso. Va tuttavia debitamente rilevato che l'uso di blocchi riscaldanti con determinazione fotoelettrica della temperatura relativa al passaggio di stato offre la possibilità di applicare la stessa apparecchiatura tanto per determinare il punto di ebollizione quanto quello di fusione, e che inoltre la procedura è suscettibile di una facile automatizzazione, con conseguente economia di tempo da parte dell'operatore ed incremento della riproducibilità delle misure. Il metodo dinamico a sua volta implica la misura della temperatura di ricondensazione del vapore tramite una termocoppia posta nella zona di riflusso, con possibilità di variare la pressione di lavoro. Ciò rende questo procedimento pienamente in grado di effettuare anche misure di tensione di vapore. Il grado di accuratezza presentato dai cinque metodi raccomandati per questo parametro varia da circa $\pm 1 - 2$ °C a ± 0.3 °C, del tutto compatibile con le esigenze di una determinazione attendibile sì, ma non troppo complessa.

3.3. Densità relativa

Questa grandezza adimensionale è intesa come il rapporto tra la massa dell'unità di volume della sostanza in esame e quella dell'acqua a 4°C. I sei metodi descritti dall'Allegato V si applicano o a sostanze solide o a sostanze liquide, od infine ad entrambe, come nel caso della bilancia idrostatica e del picnometro. La densità dei gas non viene invece richiesta. Nel loro insieme questi metodi sono in grado di garantire l'esecuzione di misure sufficientemente accurate.

ficientemente accurate sia per sostanze solide indipendentemente dal loro stato di aggregazione (ciò risulta di notevole importanza se si considera che molte sostanze organiche si presentano sotto forma particolare od amorfa), sia per liquidi in un ampio intervallo di viscosità dinamica (da 5 a 500 Pa s circa).

Non va inoltre dimenticato che tale parametro permette di valutare se un determinato prodotto abbia o meno la tendenza a mantenersi alla superficie delle acque con cui viene a contatto, e di conseguenza, prescindendo dalla sua reagibilità in questo mezzo, quale sia la dispersione a cui prevedibilmente darà luogo. Poiché la proprietà in questione non è particolarmente utile come prerequisito per la corretta valutazione di altre grandezze, nè risulta apprezzabilmente influenzata dalla presenza di impurezze, la sua misura si può certamente ritenere tra quelle meno impegnative della Sesta Modifica.

3.4. Tensione di vapore

A differenza del caso precedente, per questa proprietà le difficoltà e le implicazioni non sono certo di lieve momento. I cinque metodi riportati nella Direttiva sono in verità in grado di ricoprire un intervallo estesissimo, da 10^{-3} a 10^5 Pa, ognuno di essi avendo un suo preciso campo applicativo ottimale. Tra di essi almeno due, vale a dire quello basato sulla bilancia a tensione di vapore e quello cosiddetto a saturazione di gas, richiedono personale dotato di grande esperienza e strumentazione di notevole delicatezza (4). Se a ciò si aggiunge ancora il fatto che le misure sono assai sensibili alle impurezze presenti, si comprenderà bene come tale determinazione debba essere condotta con l'adozione di norme stringenti per garantire un risultato attendibile, il che del resto è pienamente giustificato dalla innegabile importanza della proprietà in oggetto ai fini della sua pericolosità sotto il profilo della velocità di dispersione nell'atmosfera.

Il grado di incertezza intrinseco a questo tipo di misure è a grosse linee inversamente proporzionale al valore della tensione di vapore stessa, variando da circa $\pm 1\%$

a 10^5 Pa fino anche a $\pm 50\%$ a 10^{-3} Pa. Va segnalato che in particolare il metodo dinamico è suscettibile di essere applicato anche alla determinazione del punto di ebollizione, e che informazioni sulla struttura della sostanza sono di grande ausilio per una scelta adeguata del metodo più adatto per un'efficace esecuzione del saggio.

Va ancora detto che non v'è contraddizione tra la richiesta esplicitamente fatta nell'Allegato VII di riportare almeno due valori di tensione di vapore a due diverse temperature e l'asserzione fatta nell'Allegato V per cui le misure debbono essere indicate per almeno tre temperature. Infatti, i tre punti sono necessari per giudicare la linearità della dipendenza del logaritmo della tensione di vapore dall'inverso della temperatura assoluta, vale a dire per avere una riprova della corretta applicazione del metodo prescelto alla sostanza in esame. Accertato questo e datane notizia nel rapporto tecnico che accompagna la notifica, è poi chiaro che due soli valori sono sufficienti ad individuare l'andamento della grandezza in esame con la temperatura.

3.5. Tensione superficiale

Limitata al caso di soluzioni acquose e non di liquidi puri, o meno che mai disciolti in altri solventi, come è intuibile in considerazione delle finalità ambientali a cui la grandezza in oggetto deve soddisfare, va subito detto, analogamente a quanto rimarcato per la densità relativa, che tutti i metodi riportati sono in grado di fornire risultati più accurati di quanto non sia necessario per la valutazione del rischio ambientale (vale a dire anche fino a $\pm 0,1 \text{ mNm}^{-1}$). Da questa angolazione la presenza di impurezze non è rilevante per la determinazione stessa, mentre lo sono assai di più l'accurata pulizia e taratura delle varie componenti dell'apparecchiatura utilizzata per misurare la forza con cui la soluzione acquosa tende a mantenere la propria configurazione di minima energia.

Quale sia l'importanza di questa proprietà nella stima di come possono essere alterati i delicati equilibri interfacciali delle pareti cellulari in un mezzo acquoso, con conseguente possibile aumento dell'effetto tossico di una sostanza attiva, non può certo essere sconosciuto.

Tale proprietà risulta inoltre molto utile per valutare se la sostanza investigata agisca come emulsionante per altre. Una corretta impostazione del saggio richiede infine la disponibilità a monte di informazioni circa la solubilità in acqua della sostanza, la sua struttura, la concentrazione critica micellare ed il comportamento all'idrolisi.

3.6. Idrosolubilità

La misura di questa grandezza, fondamentale per arrivare ad una prima stima della diffusione nell'idrosfera e del rischio ambientale conseguente, è contemplata nell'Allegato V tramite due diversi metodi, a seconda che la solubilità della sostanza si trovi al di sotto o al di sopra di un valore limite fissato intorno a 10^{-2} $g l^{-1}$. Su entrambi la presenza di impurezze ha un peso notevole: basti pensare a quali falsi risultati può portare la presenza di piccole quantità di un componente molto meno solubile della sostanza in esame. Raggiunta la condizione di saturazione con l'uno o con l'altro, vale a dire o per dibattimento in pallone o per eluizione su colonna, la scelta del più opportuno metodo analitico per la valutazione della concentrazione della sostanza nella soluzione è lasciata a discrezione dell'operatore, che può far ricorso a procedimenti gas-cromatografici, coltometrici, titrimetrici, etc., con gradi di accuratezza notevolmente variabili.

La costante di dissociazione, il comportamento alla idrolisi, e la tensione di vapore sono dati utili per la organizzazione della prova. La ripetibilità delle misure non è generalmente migliore del 15 - 30%, anche se ciò è sufficiente per gli scopi per cui esse sono richieste.

3.7. Liposolubilità

L'unico metodo previsto dall'Allegato V si basa sostanzialmente sulla saturazione per aggiunte progressive della sostanza in un grasso liquido standard, e sulla de-

terminazione della concentrazione ad essa relativa con un qualunque procedimento analitico, come riportato nel paragrafo precedente. Anche nel caso in esame l'influenza delle impurezze è tale da alterare profondamente i risultati sperimentali. Ma il fatto di maggior spicco è senz'altro legato al tipo di grasso liquido utilizzato. Grassi sintetici sono di gran lunga preferibili, poichè la loro composizione è esattamente nota e riproducibile, e la loro stabilità chimica elevata. Ciò consente una facile standardizzazione della metodica e quindi un immediato confronto dei dati concernenti sostanze diverse. Il significato di questa determinazione va posto nel giusto rilievo, dal momento che essa integra ed estende la portata del coefficiente di ripartizione (o lo sostituisce addirittura quando non è fattibile la misura di quest'ultimo), così permettendo una stima della quantità totale di sostanza che, indipendentemente da fenomeni associativi o dissociativi, è in grado di dar luogo ad accumulazione in organismi viventi. Struttura, stabilità termica, coefficiente di ripartizione, e solubilità in acqua sono dati la cui conoscenza agevola notevolmente la determinazione stessa.

3.8. Coefficiente di ripartizione n-Ottanolo/Acqua

L'ultima delle proprietà di questo primo gruppo è senz'altro quella più rilevante dal punto di vista delle possibili correlazioni tra proprietà fisico-chimiche e struttura delle sostanze da caratterizzare (5, 6). In termini estremamente concisi, il coefficiente di ripartizione va determinato valutando le concentrazioni del prodotto chimico nelle due fasi, acquosa ed organica, quando esse sono all'equilibrio. Le problematiche relative, sia per i criteri di purezza necessaria ad una attendibile conduzione delle prove, sia per i procedimenti analitici da impiegare, non si discostano naturalmente da quelle già accennate per la solubilità in acqua. Altre considerazioni contribuiscono tuttavia a rendere ancora più difficoltosa la determinazione di questo parametro. Il raggiungimento di un effettivo equilibrio tra le due fasi, e la necessità di evitare il formarsi di emulsioni e di conoscere se e quali fenomeni associativi o dissociativi possono avvenire, sono gli elementi di cui bisogna maggiormente tenere conto affinché la determinazione di questa grandezza sia at-

tuabile con successo. In questo senso contribuiscono notevolmente la conoscenza preliminare della costante di dissociazione, della solubilità in acqua e della tensione superficiale.

4. SECONDO GRUPPO

Le proprietà fisico-chimiche che appartengono a questo gruppo, distinte dal precedente per le ragioni esposte all'inizio, sono caratterizzate tra l'altro da una più complessa dipendenza dalle grandezze termodinamiche primarie, e necessitano pertanto della precisazione di un maggior numero di fattori concorrenziali affinché la loro determinazione possa essere ritenuta univoca e confrontabile con quella di altre sostanze. Queste implicazioni condizionano i metodi che per esse sono riportati nell'Allegato V e che di conseguenza devono essere codificati in ogni loro aspetto anche minore.

4.1. Punto di infiammabilità

Definito come la temperatura più bassa, a pressione normalizzata, alla quale il campione in vaso chiuso sviluppa vapori in quantità tali da riuscire a formare una miscela con l'aria suscettibile di infiammarsi, esso può essere determinato con metodi riconducibili alle due categorie di quelli in condizioni di equilibrio e di quelli in condizioni di non-equilibrio. Ampiamente standardizzati da istituti specializzati, essi utilizzano apparecchiature ben note, quali quelle di Abel, Abel-Pensky, Tag o Pensky-Martens. Si deve ancora tenere presente che l'Allegato V richiede la conferma delle prove eseguite tramite il primo tipo di metodi con un metodo del secondo tipo, e viceversa, qualora il punto di infiammabilità risulti essere rispettivamente 0, 21 o 55 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). La ragione di ciò è facilmente intuibile se si considera che queste temperature sono quelle scelte come discriminanti per la classificazione delle sostanze in differenti categorie di infiammabilità. Dati sull'esplosività sono ritenuti utili in via preliminare.

4.2. Infiammabilità

I metodi relativi a questa proprietà sono articolati in tre parti, a seconda che: a) la sostanza allo stato gasoso risulti infiammabile in miscela con l'aria; b) la sostanza allo stato solido o liquido sviluppi gas altamente infiammabili quando vengano a contatto con l'acqua; c) la sostanza allo stato solido pulverulento, pastoso o granulare sia altamente infiammabile. In ogni caso il prodotto in esame non deve dar luogo ad autoignizione per semplice contatto con l'aria. Nella prima evenienza, una concentrazione nota di gas in aria viene introdotta in un cilindro di vetro e sottoposta a scintilla elettrica; il rapporto di concentrazione rispetto all'aria viene quindi gradualmente variato fino all'eventuale ottenimento dell'accen-sione. I quattro procedimenti previsti per il caso b) sono tutti riconducibili, anche se con modalità diverse, alla osservazione della eventuale combustione dei gas che si formano quando il prodotto reagisce con l'acqua. Nel caso c) invece, il solido, compresso in forma di parallelepipedo retto a sezione triangolare di misure convenzionali qualora granulare o pulverulento, o semplicemente stendendo-ne uno strato su di un adatto supporto se pastoso, viene acceso ad un estremo. Il saggio viene considerato positivo se la velocità di propagazione della combustione è superiore ad un valore prefissato. La conoscenza delle proprietà esplosive del composto agevola l'esecuzione della prova.

4.3. Esplosività

Dei tre tipi di saggi previsti a questo proposito, come riportato nella Tabella 2, il terzo è ovviamente applicabile solo a solidi, mentre gli altri valgono anche per i liquidi. L'Allegato V descrive dettagliatamente le specifiche degli apparecchi da utilizzare per l'accertamento della suscettibilità all'esplosione per percussione tramite caduta di un peso, per riscaldamento con fiamma della sostanza contenuta in un tubo di acciaio, o per sfregamento realizzato tramite un perno di porcellana agente sulla sostanza a sua volta posta su un piatto anch'esso di porcellana. Quale termine di discriminazione, è stato indica

to il dinitrobenzene, tutte le sostanze più sensibili di questa ai saggi descritti essendo ritenute esplosive. Questa scelta è motivata dal fatto che il dinitrobenzene era già stato selezionato come sostanza di riferimento per gli esplosivi nell'articolo 2(2.a) della Sesta Modifica.

4.4. Autoinfiammabilità

Il dettato dell'articolo 2(2.d) della Sesta Modifica parrebbe non lasciare adito a dubbi circa la natura delle sostanze autoinfiammabili, intendendosi con ciò quelle che sono talmente reattive al contatto con l'aria da dar luogo ad una immediata combustione con sviluppo di fiamma, senza che venga apportata energia dall'esterno. Sotto questo profilo non sarebbe necessario alcun metodo per eseguire una tale determinazione, essendo sufficiente la semplice osservazione diretta.

D'altra parte è noto che molte sostanze, se immagazzinate in grossi quantitativi, possono dar luogo a processi di decomposizione più o meno lenti, con sviluppo di calore tale da superare il valore di soglia per l'infiammabilità. In questo senso l'Allegato V raccomanda, per gas o vapori, il ricorso a metodi standardizzati (come ad esempio l'IEC 79-4), in cui si fa uso di piastre riscaldate progressivamente fino a che avvenga l'autoignizione. La temperatura corrispondente è il parametro da registrare.

Per liquidi e solidi l'autoignizione è una conseguenza del fatto che la reazione della sostanza con l'ossigeno atmosferico sviluppa calore ad una velocità superiore a quella di smaltimento all'esterno della massa, con la conseguenza che la temperatura interna del campione sale progressivamente, fino al prodursi della combustione con fiamma. Il procedimento riportato dall'Allegato V implica pertanto il collocamento di una quantità prestabilita di sostanza in stufa (un cubo di rete per setacci serve da contenitore), ed il suo progressivo riscaldamento seguendo contemporaneamente l'incremento della temperatura interna con una termocoppia. La temperatura della stufa quando quella interna del campione è di 400°C viene presa per definizione come misura dell'autoignizione. E' ovvio che un saggio del genere va condotto sotto condizioni massimamente standardizzate per essere riproducibile, dipenden -

do, ad esempio, la velocità di smaltimento del calore dal la massa totale del campione e dal suo stato di aggregazione.

4.5. Proprietà comburenti

Per quest'ultima caratterizzazione, il metodo previsto dall'Allegato V richiede la preparazione di miscele in diversi rapporti della sostanza da esaminare con una combustibile rigorosamente standardizzata (segatura di legno o cellulosa polverizzata, entrambe con precisi requisiti). Le miscele così realizzate vengono poi compresse in forma di prismi triangolari di misura prestabilita, e riscaldate con fiamma ad un estremo. La velocità di propagazione della fiamma in dipendenza della percentuale di combustibile presente permette di stabilire se la sostanza in oggetto è o no da considerarsi comburente, il dicromato di sodio essendo scelto quale riferimento. Anche in questo caso, la confrontabilità dei dati è imperniata sul rispetto di tutte le specifiche necessarie.

5. CONCLUSIONI

Dal novero delle proprietà sopra elencate sono escluse alcune caratterizzazioni che, pur se fisico-chimiche in senso stretto, sono tuttavia inquadrare in altri contesti. In questo senso vanno intesi i dati spettrali UV, IR ed NMR (Allegato VII, 1.3.5), preziosi per l'identificazione univoca di una sostanza, la cui determinazione si basa tuttavia su procedimenti tanto entrati nella comune pratica di laboratorio da non richiedere alcuna specifica circa i metodi da utilizzare. La degradazione abiotica a sua volta finisce per essere centrata su prove di comportamento alla idrolisi. Prove di adsorbimento-desorbimento sono in fine previste al Livello 2 dell'Allegato VIII nella sezione dedicata all'ecotossicità, subordinatamente alla scarsa degradabilità della sostanza. Ma a parte queste eccezioni, le considerazioni finora fatte per le singole proprietà possono essere tutte ricondotte a pochi punti fon-

damentali così riassumibili:

i) sebbene ridotte nel numero, le caratterizzazioni fisico-chimiche previste dalla Direttiva 79/831 sono nel loro insieme tali da garantire un'informazione qualificata e coerente senza imporre al notificante un fardello eccessivo;

ii) si concretizza un efficace equilibrio tra rigore scientifico, indispensabile per una corretta esecuzione delle determinazioni che le renda attendibili e paragonabili tra di loro, ed esigenze pratiche di semplicità operativa;

iii) il sistema di prove richieste è nel suo complesso relativamente flessibile per quanto attiene alla scelta del metodo più opportuno, eventualmente anche al di fuori di quelli raccomandati qualora il notificante possa dimostrarne l'equivalenza o la superiorità;

iv) viene raggiunto lo scopo di una soddisfacente armonizzazione con altre normative internazionali, apportando così un contributo non trascurabile al traguardo di un riconoscimento reciproco tra legislazione europea e legislazione statunitense in materia di controllo delle sostanze pericolose;

v) un problema rilevante resta tuttora costituito dal grado di purezza che può essere tollerato nella determinazione di ciascuna proprietà. Se è vero infatti che nell'introduzione dell'Allegato VII si fa riferimento all'esecuzione dei saggi in questione sulla sostanza così come essa viene commercializzata, l'Allegato V rileva tuttavia, nei casi che lo richiedono, che il risultato di alcune prove è fortemente influenzato dalla natura e quantità di impurezze presenti. Lungi dall'essere una contraddizione, o, meno che mai, una costrizione ingiustificata per il notificante, l'invito a servirsi di sostanze purificate nei limiti che possano essere necessari, si risolve a tutto vantaggio della notifica stessa, sicuramente contribuendo a sciogliere difficoltà e non a crearne;

vi) il grado di approssimazione richiesto non è mai sproporzionato a quello effettivamente necessario per una stima efficace dell'impatto della sostanza nell'ambiente o per la corretta deduzione di altre grandezze dipendenti da quelle in esame.

In sintesi, le proprietà di cui si richiede la determinazione, ed i metodi che si propongono a tal scopo, permettono di dedurre preliminarmente e a grosse linee la dispersione nell'ambiente ed il grado di pericolosità immediato a cui una sostanza può dar luogo, senza per questo

ricorrere a strumenti senz'altro più rigidi, complicati e onerosi, quali quelli inerenti alla legge statunitense T. S.C.A.

Ci si augura, per chiudere, che le semplici osservazioni contenute in questa panoramica contribuiscano soprattutto a ridimensionare alcuni punti cruciali su cui maggiormente si è fermata l'attenzione degli osservatori sin dal primo apparire della Sesta Modifica, ed a dissipare perplessità, dubbi e preoccupazioni, se non del tutto almeno in parte, profilatisi nel corso degli ultimi mesi a proposito delle caratterizzazioni fisico-chimiche, specialmente se si terrà presente, nell'eseguire queste ultime, un po' di quel "buon senso" cartesiano tanto equamente distribuito.

BIBLIOGRAFIA

Data l'ampiezza dei temi trattati, nel testo si farà riferimento soltanto ad alcuni lavori originali scelti tra quelli di maggior spicco e fonte a loro volta di estese bibliografie.

1. W. B. Neely. "Toxic Chemicals" (R. Haque Ed. 1980, Ann Arbor, Mich., USA).
2. O.E.C.D. Chemicals Testing Programme, Final Report of the Expert Group on Physical Chemistry (Umweltbundesamt, BRD, 1979).
3. H. Berenmark, N. A. Diding, B. Ohrner, Bull. World Health Org. 28 (1963), 175.
4. A. Herlet, G. Reich, Z. Angew. Phys., 9 (1957), 14.
5. A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 71 (1971), 526.
6. C. T. Chiou, V. H. Freed, D. W. Schmedding, R. L. Kohner, Environ. Sci. Technol., 11 (1977), 475.

DEGRADABILITA' DELLE SOSTANZE CHIMICHE NELL'AMBIENTE:
METODI PER LA VALUTAZIONE DELLA DEGRADAZIONE BIOTICA

C. CREMISINI, S. DE FULVIO, A. PICCIONI
Istituto Superiore di Sanità, Roma

RIASSUNTO. - Viene effettuata una rassegna dei tests annessi alla direttiva CEE per la determinazione della biodegradabilità mettendo in evidenza alcune eventuali limitazioni di detti tests. Si mette, inoltre, in evidenza il relativo significato dell'introduzione del parametro biodegradabilità senza un appropriato valore-limite, ritenuto, a nostro avviso, determinante ai fini della valutazione del rischio. Vengono spiegate le classificazioni del grado di biodegradazione e le differenze fra i vari tipi di tests. Si conclude accennando alla necessità di ricorrere a dei metodi integrativi, che consentano la identificazione degli eventuali composti intermedi di biodegradazione.

1. PREMESSA

Come è noto la protezione dell'ambiente e degli esseri in esso viventi si pone oggi, con inderogabile necessità, nel nostro come in altri Paesi industrialmente avanzati. Tale contingenza è dovuta all'inquinamento allarmante provocato dallo sversamento di sostanze chimiche caratterizzate da particolari proprietà di tossicità, persistenza e bioaccumulazione.

A tal fine la direttiva CEE concernente la VI modifi

ca sulla regolamentazione delle sostanze chimiche pericolose è da considerare, almeno sul piano teorico, uno strumento normativo di grande interesse, per la salvaguardia dell'uomo e dell'ambiente. Tale direttiva, infatti, istituisce l'obbligo di una notifica preliminare alla produzione e commercializzazione di nuove sostanze chimiche.

Detta notifica, sotto il profilo applicativo, comprende numerosi accertamenti circa alcune proprietà essenziali che debbono caratterizzare i nuovi composti chimici, ai fini della loro idoneità, quali la tossicità, biodegradabilità (1), altre caratteristiche chimiche, fisiche.ecc.

Lo scopo principale di questa breve nota è la rassegna di tests annessi alla direttiva CEE per la determinazione della biodegradabilità.

Vengono messe in evidenza alcune limitazioni di detti tests, nonché il relativo significato dell'introduzione del parametro biodegradabilità, senza un appropriato valore-limite, ritenuto a nostro avviso determinante, ai fini della valutazione del rischio. Infatti la stima del rischio immediato o differito per l'uomo e l'ambiente, pur rimanendo nel suo insieme tuttora oggetto di approfondito dibattito, in particolare per quanto concerne la biodegradabilità, non può prescindere dalla possibilità di giungere, nel tempo, ad una sua valutazione qualitativa e quantitativa.

Infatti soltanto in questo modo si possono correttamente individuare le quantità di sostanze chimiche di sintesi più o meno pericolose che potranno essere assimilate dall'ambiente come tali o sotto forma di prodotti intermedi di degradazione più o meno nocivi.

Se non si è in grado, nel prossimo futuro, di dare risposte esaurienti a tali quesiti, l'adozione della degradazione biotica nei termini attualmente previsti dalla VI Modifica presenterà alcune difficoltà nella valutazione del rischio effettivo ai fini della salvaguardia dell'ambiente e conseguentemente eventuali difficoltà di carattere normativo.

In generale le sostanze chimiche persistenti si accumulano nella biosfera attraverso le catene trofiche.

Il fenomeno di accumulo si verifica quando i vari organismi presenti nell'ambiente non sono abbastanza efficienti e veloci nel degradare, mediante processi metabolici, sostanze chimiche nella stessa misura in cui vengono assunte dall'ambiente ricettore.

A tal fine un esempio rappresentativo è dato dagli idrocarburi clorurati, spesso usati come antiparassitari; tali composti vengono degradati molto lentamente e sono solubili nei grassi degli organismi. Per queste particolari caratteristiche di persistenza dette sostanze accumulando si nell'ambiente si concentrano negli animali e quindi nell'uomo attraverso le catene alimentari.

Alcune di queste considerazioni servono ad evidenziare l'importanza che spetta al parametro biodegradabilità. Infatti poche sono le sostanze chimiche inquinanti per le quali tutte queste caratteristiche e tutti questi processi possono dirsi adeguatamente noti.

Nei riguardi di un nuovo composto di sintesi, quindi, sarebbe opportuno, in una prima fase, conoscere il grado ed il tipo di biodegradazione e conseguentemente fissare il livello di biodegradabilità da considerare accettabile (2). Inoltre gli strumenti normativi, previsti dalla direttiva CEE, non potranno essere di grande aiuto finché non saranno state superate alcune carenze conoscitive concernenti le metodologie di controllo della biodegradabilità che, nella loro incertezza, rendono ancora più problematica la stima del rischio per l'ambiente.

In questa ottica bisogna considerare l'introduzione nella direttiva CEE (VI Modifica) del controllo della biodegradabilità quale uno dei parametri essenziali per la idoneità alla produzione e commercializzazione di sostanze chimiche, in quanto solo quelle dotate di capacità ad essere degradate, possono essere metabolizzate ed assimilate dall'ambiente ricettore entro un tempo ragionevole senza alcuna conseguenza.

2. ANALISI DEI METODI

Alla luce di queste considerazioni preliminari si rende opportuno effettuare una rassegna dei tests di biodegradabilità allegati alla VI Modifica, per meglio evidenziare alcune limitazioni presentate dai metodi proposti nell'ottica di una corretta valutazione del parametro biodegradabilità per la individuazione del rischio connesso alla utilizzazione di nuove sostanze chimiche. Comunque, prima di passare alla disamina dei suddetti tests si reputa opportuno fare un breve cenno sul fenomeno della biode-

gradazione. A questo fine nell'ambito della discussione sui metodi per la determinazione della biodegradabilità delle sostanze di sintesi si sono sviluppate varie interpretazioni dello stesso concetto di biodegradabilità, dando origine conseguentemente a varie classificazioni del grado di degradazione. Comunemente la biodegradazione viene intesa come la trasformazione di composti chimici operata da microrganismi viventi nell'ambiente stesso. Tale trasformazione comporta quasi sempre un consumo di ossigeno più o meno intenso in relazione al grado di trasformazione più o meno spinto operato da detti microrganismi attraverso i relativi processi metabolici. Infatti tali microrganismi impegnati in questa attività per la biosfera, in alcuni casi riescono a trasformare le sostanze organiche complesse in CO_2 , H_2O e sali minerali (processo detto "mineralizzazione"), in altri casi riescono ad operare una degradazione parziale con formazione di composti intermedi.

In accordo con Treccani, Baggi, Galli, Pecenck (3) si possono quindi individuare varie classificazioni del grado di biodegradazione comunque strettamente legate al metodo analitico impiegato nella sua determinazione:

- 1) Biodegradazione primaria (o funzionale): è una biodegradazione incompleta di una sostanza che porta alla rimozione di alcune proprietà caratteristiche della molecola.

In pratica viene per lo più determinata mediante tecniche analitiche specifiche basate su reazioni con gruppi funzionali. In termini biologici questo livello di biodegradazione può essere determinato da processi co-metabolici o co-ossidativi oppure dalla parziale utilizzazione del composto in esame;

Co-ossidazione } (4) questo termine è stato proposto
Co-metabolismo } per descrivere un sistema biologico in cui un substrato organico non utilizzabile per la crescita microbica viene ossidato parzialmente e simultaneamente ad un altro composto organico che invece viene utilizzato come fonte di carbonio e di energia.

- 2) Biodegradazione ambientalmente accettabile: modifica - zione di una sostanza organica tale da determinare la formazione di intermedi che, in base alle loro caratte

ristiche, non presentando più gli stessi effetti negativi sull'ambiente del composto di partenza.

- 3) Biodegradazione totale: mineralizzazione del composto attraverso i normali processi metabolici che determinano la crescita microbica.
- 4) Bioremozione: rimozione di un composto organico da soluzioni o sospensioni acquose durante il trattamento biologico di un effluente, mediante processi non necessariamente biodegradativi come, ad esempio, la rimozione per adsorbimento su cellule microbiche.

Da una semplice analisi di tali classificazioni risultano subito evidenti alcune difficoltà nella definizione sia dal punto di vista teorico che da quello pratico - normativo del concetto di biodegradabilità.

Nella elaborazione di metodiche atte a definire la biodegradabilità di una sostanza bisogna innanzitutto chiarire quale livello di biodegradazione sarà preso in considerazione. Ma, ad eccezione della biodegradabilità totale che non implica equivoci, negli altri casi la scelta è sempre connessa a problemi di valutazione e di metodica. Ad esempio sarebbe opportuno stabilire quali sono i criteri da utilizzare nel definire ambientalmente accettabile la biodegradabilità di una sostanza.

D'altra parte, in ogni caso, non è molto semplice stabilire se si tratti di effettivi processi biodegradativi o di adsorbimento su cellule microbiche.

Inoltre si rileva la necessità in molti casi di una valutazione quali-quantitativa degli intermedi di degradazione per poter correttamente parlare di biodegradazione accettabile.

Possiamo ora definire alcune caratteristiche essenziali per un test di biodegradabilità (che abbia una validità di esecuzione generale):

- a) semplice esecuzione
- b) ripetibilità
- c) standardizzazione per quanto possibile delle variabili più importanti
- d) scelta di parametri analitici quanto più possibile significativi ma comunque di validità generale.

E' chiaro che il rispetto di queste caratteristiche fa sì che in generale questi tests siano da una parte da considerarsi piuttosto restrittivi e che quindi diano dei risultati praticamente definitivi solo quando la sostanza

in esame appare facilmente biodegradabile. D'altra parte la non adozione di metodi analitici specifici per la sostanza in esame e la non considerazione degli intermedi di degradazione può in alcuni casi rivelarsi pericolosa.

Inoltre la semplicità di esecuzione e la ripetibilità sono condizioni che solo raramente si approssimano alla realtà ambientale che comunque è assai scarsamente riproducibile.

In base alle precedenti considerazioni prenderemo brevemente in esame i metodi per la determinazione della degradazione biotica fino ad oggi proposti.

Tali metodi possono essere suddivisi in tests statici e tests dinamici.

- a) Tests statici: consistono principalmente in metodi in cui non è previsto il rinnovo della soluzione colturale per la durata del test stesso. Tali metodi utilizzano come tale l'acqua prelevata da un corpo idrico naturale semplicemente addizionata del composto in esame o prevedono l'inoculo con microrganismi prelevati da uno o più ambienti naturali in un liquido colturale sintetico contenente la sostanza in esame fornita come unica fonte di C e di energia oppure addizionata di altri nutrienti organici.
- b) Tests dinamici: sono rappresentati da quei tests nei quali si attua un continuo o intermittente ricambio del terreno colturale, che, per la sua composizione in elementi nutritivi organici ed inorganici (urea, peptone, estratto di lievito o carne, sali minerali), simula un liquame urbano. A tale terreno colturale la sostanza in esame viene aggiunta a bassa concentrazione (10-20 mg/l). E' importante notare che i batteri sono presenti nel sistema ad elevata concentrazione ($>1g/l$).

I tests dinamici forniscono in genere valori di biodegradabilità molto più elevati che non i tests statici. Sempre in generale nei tests dinamici la scomparsa della sostanza organica viene seguita mediante un'analisi specifica, per cui è possibile determinare solo la biodegradazione primaria. Si può in linea di principio prevedere la applicazione di analisi quali COD, TOC ai tests dinamici con una certa difficoltà operativa.

Inoltre data la notevole biomassa batterica non si può non tenere conto dell'adsorbimento e quindi del fenomeno di bioeliminazione che si sovrappone a quello di biodegradazione.

I metodi per la determinazione della degradazione biologica possono inoltre essere suddivisi in:

- a) diretti: nei quali si segue la scomparsa della sostanza in esame come tale o come D.O.C. (carbonio organico disciolto). Tali metodi possono essere applicati solo a sostanze solubili, poco volatili);
- b) indiretti: nei quali si determinano l'ossigeno consumato o la CO₂ prodotta dalla ossidazione della sostanza durante il test applicabili in linea di principio anche a sostanze insolubili).

Nella tabella 1 sono riportati alcuni metodi, suddivisi in tests statici e tests dinamici, per la valutazione della biodegradabilità. In tabella 2 sono riportati i metodi revisionati ed approvati in sede CEE e quelli in via di revisione. In tabella 3 è riportata una suddivisione in metodi diretti ed indiretti.

Prenderemo ora in considerazione i metodi approvati e revisionati in sede CEE. Tali tests debbono essere considerati come "screening tests". Si tratta di metodi statici diretti, indiretti o che prevedono la doppia possibilità di seguire direttamente od indirettamente la degradazione. Tali metodi prevedono una standardizzazione delle condizioni operative, ma a nostro avviso si possono fare alcuni rilievi critici.

La temperatura a cui condurre il test varia nel range 20-26°C e sembra opportuno ridurre tale intervallo anche perchè in prima analisi non si rileva la necessità di operare a temperature differenti nei vari tests. E' da notare, infatti, che la temperatura può influire significativamente sul metabolismo dei microrganismi.

Lo stesso appunto può essere fatto per quanto riguarda le soluzioni nutritive. Si può forse arrivare ad una unificazione di tale variabile con l'unica differenza che nei tests ove è prevista la determinazione del DOC come parametro analitico non vanno aggiunti altri elementi organici nutritivi oltre le sostanze in esame. In tabella 4 riportiamo per esteso le composizioni del brodo colturale, nei cinque tests presi in considerazione.

Un discorso più complesso va fatto a proposito dell'inoculo. In linea di principio, si può affermare che la tendenza ad operare con un inoculo misto è generale. In questo modo si prevede più facile il processo di selezione e quindi l'arricchimento di quei microrganismi che sono in grado di crescere nelle condizioni del test che spes

so prevedono l'esistenza della sostanza in esame come unica fonte di C e di energia.

Una certa discordanza di opinioni esiste sulla opportunità di imporre un periodo di adattamento della flora batterica utilizzata poi come inoculo per la soluzione contenuta nella sostanza in esame.

C'è comunque da tener conto della differenza nei tempi di biodegradazione a seconda che si adotti o meno una coltura adattata.

Infine va a nostro avviso ulteriormente valutata la opportunità di introdurre in modo sempre più consistente la determinazione del TOC (carbonio organico totale) nella pratica dei tests di biodegradabilità (5,6).

Si riporta infine uno schema logico per la corretta impostazione metodologica per la valutazione della biodegradabilità di una sostanza.

3. CONCLUSIONI

Dalla breve esposizione effettuata sul fenomeno della degradazione biotica delle sostanze chimiche di sintesi, sono emerse alcune considerazioni critiche riguardanti i tests annessi alla VI Modifica CEE, per la determinazione della degradazione biotica.

Alcune limitazioni sono dovute alla difficoltà nella determinazione stessa della biodegradazione ed alle carenze conoscitive sul reale significato da attribuire a tale parametro per una idonea valutazione del rischio per l'uomo e per l'ambiente.

D'altra parte bisogna tener conto che tali tests, per il loro carattere generale, non possono che fornire elementi indicativi, quali, in una fase successiva, potranno essere integrati con i dati ottenuti con tests più specifici ed approfonditi per le diverse sostanze.

Permane comunque la necessità, in un prossimo futuro, di poter definire livelli di accettabilità per la biodegradabilità, elementi questi ritenuti determinanti insieme ad altri per la salvaguardia dell'ambiente.

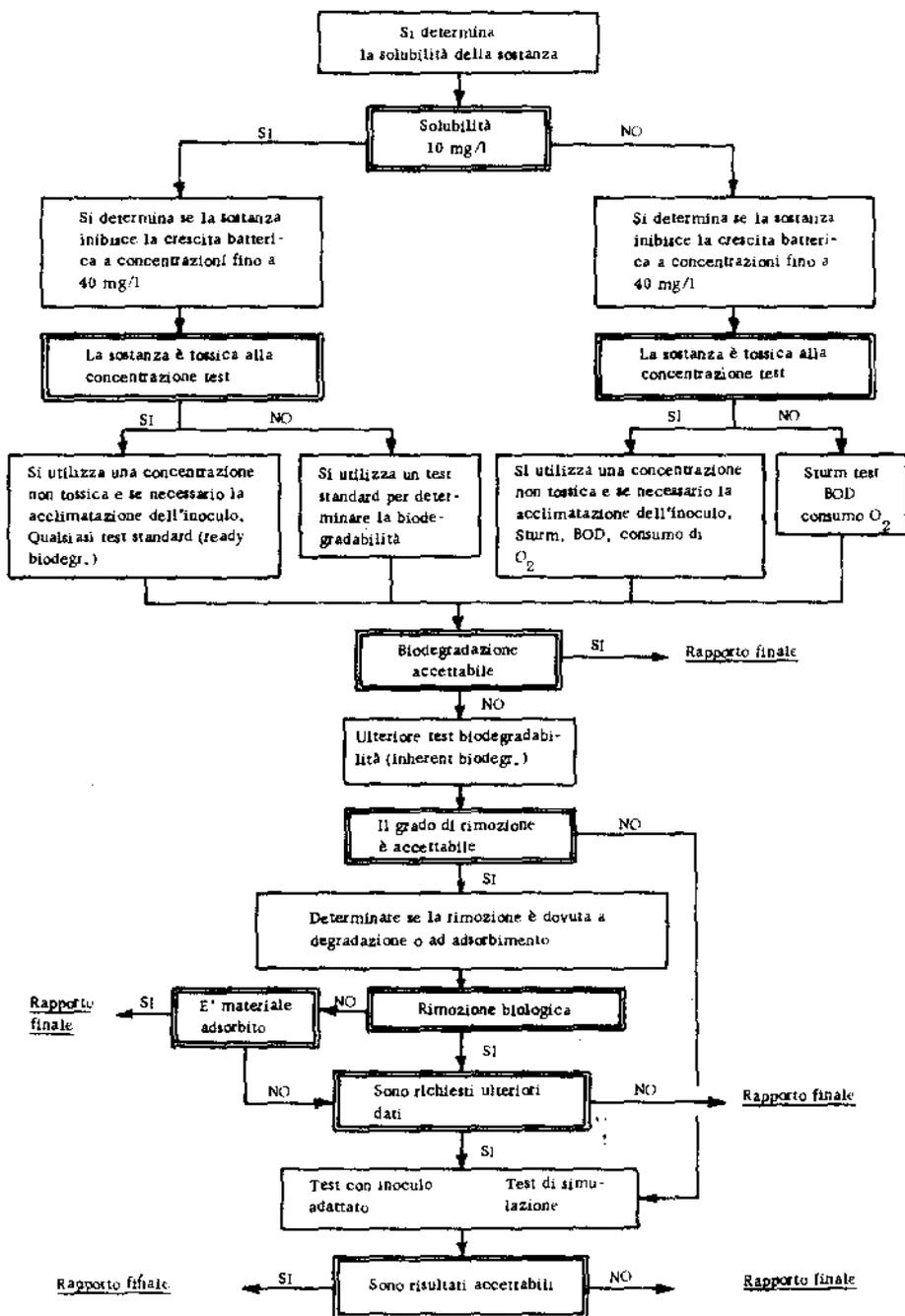
Come già accennato, risulta infine evidente la neces-

sità di ricorrere ad un metodo integrativo che consenta, ove sia necessario, di evidenziare il problema della degradazione parziale e, con particolare attenzione, la identificazione degli intermedi di degradazione e la loro valutazione sotto il profilo ecologico.

Alla luce di quanto sopra esposto si rende necessario richiamare l'attenzione sia delle autorità che degli studiosi a proseguire approfondite indagini tese a colmare le carenze conoscitive e tecniche sopra menzionate.

Il raggiungimento di tale obiettivo consentirà una migliore valutazione, attraverso il parametro biodegradabilità, del rischio effettivo dei nuovi prodotti nei confronti dell'uomo e dell'ambiente.

SCHEMA LOGICO PER LA VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADABILITA' (x)



(x) Tratto da: BIP 24/4 Oct. 1980 - Department of the Environment/National Water Council U.K., Standing Committee of Analysts - Working Group 7, Panel 5.

tabella 1 METODI PER LA VALUTAZIONE DELLA BIODEGRABILITA'

TEST	METODI DI ANALISI	DURATA DEL TEST	T °C	TIPO DI INOCULO	Concentr. Sostanza	ref. bibli.
TEST STATICI						
BAUAG	Carbonio Organico Totale (T.O.C.)	oltre 21 giorni	25	sospensione di terreno	5 mg/l in TCC	7
RIVER BIO-ASSAY	TOC o metodi specifici	-----	-----	fiore batterica preesistente	20 mg/l	8
STESB	TOC o metodi specifici	oltre 21 giorni	20 ± 1	30 mg/l di fanghi attivi	10 mg/l	9-40
ZEMA - WELLEN	TOC	14 gg.	22 ± 3	fango attivo	100 mg/l in DOC	10-41
FISHER in bottiglie chiuse con saturazione di O ₂	CO ₂ , O ₂ , TOC, metodi specifici	30 gg.	20	effluente secondario da impianto di trattamento di scarichi urbani	20 mg/l	11-42
CPDA	TOC	14 gg.	22 ± 1	fango attivo	50 mg/l in DOC	12
PITZER	TOC	20 gg.	20 ± 3	fango attivo	100 mg/l	13
CUMEN EMAPERS	metodi specifici	7 gg.	ambiente	effluente secondario da imp. tratt. scarichi urbani	20 mg/l	14
SOA	metodi specifici	8 gg.	25 ± 3	ecce di scarico o ambiente climatato, suolo	30 mg/l	8
FRESH TEST	metodi specifici	10 gg.	25 ± 3	inoculo arricchito	20 mg/l	15
TEST DINAMICI						
MUSPANK	metodi specifici	-----	-----	aria	20 mg/l	16
MUSPANK in deposito	TOC o COD	-----	-----	aria	20 mg/l	17-18
PERDUS PET	metodi specifici	-----	-----	fanghi attivi	5 o 10 mg/l	19
SLIFNER	metodi specifici	-----	-----	fanghi attivi	variabile	20
SOA (SOA)	metodi specifici	-----	-----	fanghi attivi	20 mg/l	21-23

Tabella 2

METODI REVISIONATI ED ACCETTATI IN

METODO	PRINCIPIO DEL METODO	DURATA TEST
AFNOR modified test	utilizzando la sostanza in esame come sola sorgente di C se ne segue la scomparsa con misure di D.O.C. Per la valutazione dati Allegato A	28 gg. eventuali determinazioni ai gg. 3, 7, 14
STURM modified test	determinazione della CO ₂ sviluppata dalla degradazione della sostanza in esame. Per la valutazione dati All.B	28 gg. altre determinazioni ogni 2 - 3 gg.
OECD modified screening test	vengono aggiunti oligoelementi in tracce e vitamine, vengono effettuate misure di DOC. Per la valutazione dei dati Allegato C	28 gg. eventuali determinazioni ai gg. 7, 14, 21
CLOSED BOTTLE modified test	determinazione dell'O ₂ consumato, 3. O.D. Per la valutazione dei dati Allegato D	28 gg. eventuali determinazioni ai gg. 0, 5, 15
MITI modified test	determinazione di O ₂ consumato (BOD) e di DOC, la sostanza in esame è la unica fonte di C. Valutazione dati Allegato E	14 gg. controllo continuo di O ₂ , e periodico di DOC

METODI IN

BOD	richiesta biochimica di O ₂ , determinazione dell'O ₂ consumato	variabile 5, 20, X gg.
COD	richiesta chimica di O ₂ ; metodo al bicromato	2 ore

- * L'efficienza dell'inoculo va controllata con test sulle sostanze di
 ** Diminuzione DOC 70% entro 10 gg. a partire dal giorno in cui il li

SEDE C.E.E. (E.E.C. Directive 79/831)

T °C	* INOCULO	CONCENTR. SOST. TEST	SOST. RIFER.	RIFER. BIBL.
20 - 25	da impianto di trattamento di scarichi urbani, acque superficiali. La conta batterica per ogni campione dovrebbe dare non meno di 10 ⁵ batteri/ml.	40 mg/l come DOC	anilina Na benzoato Na acetato diminuzione DOC ~ 70%	22, 23, 24, 25
20 - 25	da impianto di trattamento di scarichi urbani. Ogni campione dovrebbe normalmente contenere 10 ⁶ batteri/ml	10 mg/l 20 mg/l come sost. in es.	come sopra produzione di CO ₂ 60%	25, 26, 27, 29
20 - 25	da impianto di trattamento di scarichi urbani, acque superficiali, terreno di giardino o misto dei 3 (inoculo composto)	5-40 mg/l come DOC	** come sopra	24, 25, 29, 30
20 - 21	da impianto pilota di laboratorio, da terreno di giardino, da impianti di trattamento di scarichi urbani. Ogni campione dovrebbe contenere 10 ³ -10 ⁵ batt./ml	2-10 mg/l comunque in relazione a disc.	come sopra degradazione ~ 60%	25, 31, 32
25 ± 1	da non meno di 10 punti in località diverse nell'ambito dell'intero territorio nazionale (scarichi, fiumi, lago, terreno). 30 mg/l di MLSS. (mixed liquor suspended solids).	100 ppm p/v	anilina. consumo di O ₂ 40% del teor. entro 7 gg. e 65% entro 14 gg.	33, 34, 35, 36, 37

REVISIONE

20 ± 1	scarico urbano, terreno di giardino, fiume, lago	in base O ₂ disc.	glucosio + ac. glutam.	38
***	=====	5 mg/l come COD	solo per ca lit. metodo	39
riferimento vello di biodegradazione 10%.				

tabella 3**METODI PER LA VALUTAZIONE
DELLA BIODEGRADABILITA'****METODI DIRETTI**

DIE - AWAY (STCSD)
MODIFIED DECD TEST
AFNOR
ZAHN - VELLENS
BUNCH - CHAMBERS
SCAS
HUSMANN
POROUS - POT

METODI INDIRETTI

BOD
COD
MITI TEST
STURM
CLOSED BOTTLE

TABELLA 4

soluzioni nutritive							
ELEMENTI DI CRESCITA		A FNOR	STURM	OECD	CLOSED BOTTLE	MITI	
$\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	mg/l	50	22,5	22,5	22,5	22,5	67,5
CaCl_2	"	50	27,5	27,5	27,5	27,5	82,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	"	50	50	50	50	50	150
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	"	50	1,0	0,250	0,250	0,250	0,750
$(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$	"	50	3,4	20,0	3,4	3,4	3,4
KH_2PO_4	"	300,0	17,0	8,5	8,5	8,5	25,5
K_2HPO_4	"	50	43,5	21,75	21,75	21,75	65,25
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	"	2000,0	50	50	50	50	150
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	"	50	66,8	50	50	50	150
Na_2HPO_4	"	50	50	50	33,4	50	150
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	"	300,0	40,0	50	50	50	150
ESTRATTO DI LIEVITO	"	5,0	50	(*)	50	50	150
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	"	1,0	50	50	50	50	150
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	"	50	50	0,0399	50	50	150
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	"	1,0	50	50	50	50	150
K_2FeO_4	"	0,25	50	50	50	50	150
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	"	0,25	50	50	50	50	150
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	"	0,25	50	50	50	50	150
ZnCl_2	"	0,25	50	50	50	50	150
$(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3$	"	0,10	50	50	50	50	150
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	"	0,25	50	50	50	50	150
H_3BO_3	"	50	50	0,0672	50	50	150
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	"	50	50	0,0428	50	50	150
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	"	50	50	0,0347	50	50	150
$\text{FeCl}_3 \cdot \text{EDTA}$	"	50	50	0,100	50	50	150
BIOTINA	"	50	50	0,002	50	50	150
ACIDO NICOTINICO	"	50	50	0,02	50	50	150
TIAMINA	"	50	50	0,01	50	50	150
ACIDO p-AMINOBENZOICO	"	50	50	0,01	50	50	150
ACIDO PANTOTENICO	"	50	50	0,01	50	50	150
PIRIDOSSAMINA	"	50	50	0,05	50	50	150
CIANCOBALAMINA	"	50	50	0,07	50	50	150
ACIDO FOLICO	"	50	50	0,05	50	50	150

(*) 0,015 mg/l in alternativa alla soluzione contenente lievito.

- NEL MITI TEST VENGONO AGGIUNTI 1 g/l di basteroni, 1 g/l di glucosio, 1 g/l di KH_2PO_4 , XEGL'INDICAZIONE PILOTA DA LABORATORIO CHE VIENE MANTENUTO L'INDICAZIONE.

BIBLIOGRAFIA

1. Gibert P.A., Watson G.K., Tenside detergents 14, 171, 1977.
2. Water Pollution Control Federation J.W.P.C.F. 39, 1232 (1967).
3. Galli E., Baggi G., Treccani V., Pecenick, Atti del Seminario sull'ecotossicologia - Roma, 29 maggio 1979 C.N.R. AC/1/90 - 1980.
4. Horvath R.S. Bacteriol. Rev. 36, 146, 1972.
5. Aziz J.A., Tebbut T.H.Y., Water Research 14, 319 1980.
6. Viraraghavan T. JWPCF 46, 2213 (1976).
7. EAWAG (1968) Working procedure for determination of detergents, 5th Draft, Zurich.
8. SDA Subcommittee on Biodegradation Test Methods 1969. J.A.O.C.S. 46, 432.
9. Standing Technical Committee on Synthetic Detergents. Supplement to 8th Progress Report (1966) HMSO, London.
10. Zahn R., Wellens H. (1974) Chemikerzeitung, 98, 228.
11. Fisher W.K., Gerike P., Schmid R.D. (1974), Wasser und Abwasser 4, 99.
12. EMPA - C. St. Gallen (1966).
13. Pitter P. (1976) Water Res. 10, 231.
14. Bunch R.L. Chambers C.W. (1967) JWPCF 39, 181.
15. Brebion G., Cabridenc R., Julling T. (1966) Tribune Cebedau 18, (266), 13.
16. OECD (1971) Pollution by detergents. Determination of the biodegradability of anionic synthetic surface active agents: OECD, Paris.
17. Janicke W. (1971) Water Res., 5, 917.

18. Bush A.W., Myrick N. (1961) JMPCF 33, 897.
19. Stennet G.V., Eden G.E. (1971) Water Res. 5, 601.
20. Swisher R.D., O'Rourke J.T., Tomlinson H.D. (1964) J. A.O.C.S. 41, 746.
21. SDA Subcommittee on Biodegradation test Methods 1965 J.A.O.C.S. 42, 986.
22. Direttiva CEE 79/831, ENV/284/80, REV.5, annex V.
23. L'Association Francaise de Normalization, T90-302 '77. "Methode d'evalutation en milieu aqueaux de la biodegradabilite des produits organiques". Paris.
24. OECD Test guideline for testing of chemicals 301A.
25. Gerike P., Fisher W.K., Ecotoxicology and Environmental Safety 3, n° 2, 159, 1979.
26. Direttiva CEE 79/831, ENV/283.80, REV.5, annex V.
27. Larson R.J. (1979), Appl. Env. Microbiol. 38, 1153.
28. OECD Test guideline for testing of chemicals 301E.
29. Direttiva CEE 79/831, ENV/278/80, REV. 5, annex V.
30. OECD Test guideline for testing of chemicals 301D.
31. Direttiva CEE 79/831, ENV/279/80, REV.5, annex V.
32. OECD Test guideline for testing of chemicals 301B.
33. Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances (C-5/98/JAP), 1978.
34. The chemical substances control law in Japan (Chemical Product Safety division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.
35. The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances, 5.8 (C-3/78/JAP), 1978.
36. Direttiva CEE 79/831, ENV/282/80, REV.2 annex V.

37. OECD Final Report of the Expert Group on Degradation/ Accumulation, Berlin and Tokio, December 1970.
38. Direttiva CEE 79/831, ENV/80, annex V.
39. Direttiva CEE 79/831, ENV/80, annex V.
40. Blak J. (1979) Int. Biodeterioration Bull. 15, (2), 57.
41. Direttiva CEE 79/831, ENV/280/80, annex V.
42. Fisher W.K., Gerike P., Holtmann V. (1975) Water Res. 9, 1131.
43. Direttiva CEE 79/831, ENV/281/80, annex V.

Tabella 2

A) Afnor test

$$D_t = 1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \times 100$$

D_t = degradazione espressa come diminuzione percentuale di D.O.C.

C_o = concentrazione iniziale di D.O.C. (mg DOC/litro)

C_t = concentrazione di D.O.C. al tempo t

C_{bo} = concentrazione iniziale di D.O.C. del bianco

C_{bt} = concentrazione di D.O.C. del bianco al tempo t

B) Sturm test

La degradazione è definita come rapporto tra CO_2 prodotta dalla degradazione della sostanza nel test e CO_2 che teoricamente dovrebbe essere prodotta in base al contenuto in Carbonio Organico della sostanza.

C) OECD test

Vedi A.

D) Closed Bottle Test

% biodegradazione = $\frac{\text{mg } O_2 \text{ consumato nel test/mg sostanza esaminata}}{\text{ThOD}} \times 100$

oppure

% biodegr. = $\frac{\text{mg } O_2 \text{ cons. nel test/mg sost. exam.}}{\text{mg COD/mg sostanza esaminata}} \times 100$

E) MITI test

% biodegradazione = $\frac{3OD - 3}{\text{ThOD}} \times 100\%$

$$\% \text{ biodegradazione} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

BOD = determinato sperimentalmente, della sostanza test

B = bianco (BOD) della soluzione alla quale non è stata aggiunta la sostanza in esame

ThOD = richiesta teorica di O_2 per la completa ossidazione della sostanza in esame

S_a = residui della sostanza test al termine della prova di biodegradabilità espresso in mg

S_b = residuo della sostanza test al termine della prova, in una soluzione contenente solo acqua + sostanza in esame; espresso in mg.

GLOSSARIO

DEGRADAZIONE

- processo che consiste nella demolizione della struttura di un composto.

BIODEGRADAZIONE

- demolizione della struttura di un composto dovuta alla azione di microorganismi.

BIODEGRADABILITA'

- attitudine di un composto ad essere degradato dai microorganismi.

BIODEGRADAZIONE PRIMARIA (o FUNZIONALE)

- rimozione delle proprietà caratteristiche di un composto; in genere in seguito alla trasformazione o perdita dei gruppi funzionali.

BIODEGRADAZIONE AMBIENTALMENTE ACCETTABILE

- rimozione delle caratteristiche più pericolose di un composto. Frequentemente corrisponde alla biodegradazione primaria.

BIODEGRADAZIONE TOTALE

- la trasformazione della sostanza in CO_2 , H_2O , ossidi o sali di altri elementi presenti, e materiale cellulare.

MINERALIZZAZIONE COMPLETA

- in genere gli viene attribuito lo stesso significato della biodegradazione totale anche se la mineralizzazione completa implica la degradazione delle nuove cellule formate.

BIOELIMINAZIONE

- rimozione di un composto organico da soluzioni o sospensioni acquose durante il trattamento biologico di un effluente, mediante processi non necessariamente biodegradativi come, ad esempio, la rimozione per adsorbimento su cellule microbiche.

ACCLIMATAZIONE

- i processi, includenti la selezione e l'adattamento, per mezzo dei quali una popolazione di un insieme di specie di microorganismi sviluppa la capacità a degradare un particolare composto.

INOCULO

- microorganismi che vengono aggiunti alle soluzioni del test.

CO-METABOLISMO (o CO-OSSIDAZIONE)

- il processo per mezzo del quale un composto normalmente non biodegradabile viene degradato in presenza di un altro composto organico.

METABOLISMO ANALOGO

- speciale caso di co-metabilismo; qui la degradazione avviene solo in presenza di un composto organico avente una struttura simile, in modo da poter indurre i neces-sari enzimi.

INIBIZIONE

- riduzione dell'attività metabolica dei microorganismi devuta ad effetti tossici del composto test o ai suoi me-taboliti.

DIE - AWAY TEST

- termine applicato ad un insieme di tests di biodegrada-bilità nei quali il decremento della concentrazione ini-ziale della sostanza test viene seguito nel tempo.

"TESTS OF READY BIODEGRADABILITY"

- sono tests estremamente restrittivi. Si assume che una sostanza che dà un risultato positivo (facile biodegrada-zione) in tali tests sarà rapidamente e completamente biodegradata nell'ambiente. Un risultato negativo non si-gnifica necessariamente che la sostanza non sarà biode-gradata in condizioni normali nell'ambiente. E' quindi necessario passare a controlli successivi. Il composto, che è la sola sorgente di Carbonio Organico è esposto a una biomassa relativamente bassa. Per seguire il corso della biodegradazione vengono usati metodi non specifi-ci. Dal momento che tali metodi rispondono ad ogni resi-duo o intermedio di degradazione questi tests danno una indicazione della biodegradazione totale.

"TESTS OF INHERENT BIODEGRADABILITY"

- sono tests che prevedono una prolungata esposizione del-la sostanza ai microorganismi. Il rapporto biomassa/so-stanza è favorevole, così come tutte le altre condizio-ni del test. A causa delle favorevoli condizioni impie-gate la biodegradazione della sostanza nel test non si-

gnifica necessariamente che la sostanza venga rapidamente e facilmente biodegradata nell'ambiente.

TEST DI SIMULAZIONE

- tests nei quali la biodegradabilità della sostanza viene determinata in condizioni che riproducono quanto più possibile quelle ambientali.

TESTS STATICI

- test in cui non è previsto il rinnovo della soluzione colturale per l'intera durata del test.

TESTS DINAMICI

- tests nei quali si attua un continuo o intermittente ricambio della soluzione colturale.

B.O.D.

- Biochemical Oxygen Demand; ossigeno consumato dai microorganismi quando metabolizzano un composto.

C.O.D.

- Chemical Oxygen Demand; ossigeno consumato durante la ossidazione di un composto con bicromato in ambiente acido a caldo.

Th.O.D.

- Theoretical Oxygen Demand; ossigeno richiesto per ossidare completamente un composto. Il calcolo teorico viene effettuato dalla sua formula di struttura.

D.O.C.

- Dissolved Organic Carbon; quantità di carbonio presente nella soluzione acquosa di un composto organico.

T.O.C.

- Total Organic Carbon; quantità di carbonio organico presente nella soluzione/sospensione di un composto organico.