DIFFUSIONE E VALUTAZIONE DI RISCHIO DI LM6, METABOLITA NON CLORURATO DELLA TERBUTILAZINA, NELLE FALDE ACQUIFERE

Sara Valsecchi[1], Michela Mazzoni[1], Marianna Rusconi[1], Stefano Polesello[1,*], Alberto Sala[2], Orietta Longoni[2], Michele Rusconi[2]

[1] IRSA-CNR, Brugherio (MB).

[2] BrianzAcque, Monza (MB).

Sommario – Durante campagne di monitoraggio di routine di erbicidi triazinici nelle acque sotterranee utilizzate a scopo potabile in una zona della Lombardia a nord di Milano è stato scoperto per la prima volta un metabolita non clorurato della terbutilazina, noto con la sigla LM6. Grazie allo sviluppo di un metodo analitico mediante HPLC-MS ad alta risoluzione, nel 2015 sono state effettuate due campagne dedicate alla determinazione di LM6 e altri erbicidi triazinici in acque sotterranee destinate alla potabilizzazione e nelle acque distribuite. Terbutilazina e i metaboliti desetilterbutilazina e deisopropilatrazina sono risultate presenti nell'acqua grezza in concentrazioni <0,050 μg L^{-1} con il 75°percentile ≤ 0,015 μg L^{-1}. LM6 ha presentato concentrazioni più elevate con mediana <0,050 μg L^{-1} e l'80° percentile dei campioni <0,1 μg L^{-1}. Mentre il superamento del limite 0,1 μg L^{-1} è stato misurato in circa il 20% delle acque grezze analizzate, la percentuale dei campioni dell'acqua dopo il trattamento che superano il limite è ridotto al 9% dei campioni totali. La diffusione del metabolita LM6 nelle acque di falda utilizzate a scopo potabile ha reso necessario effettuare una valutazione del rischio. Poiché i dati tossicologici e chimico-fisici disponibili sono assai limitati, sono stati seguiti due approcci diversi. Seguendo la Linea Guida SANCO/221/2000 per stabilire la rilevanza dei metaboliti di antiparassitari, LM6 è stato classificato come metabolita rilevante, per il quale si applica la Direttiva 98/83/CE sulle acque potabili che prevede un valore di parametro di 0,1 μg L^{-1}. La classificazione di metabolita rilevante è dovuta al fatto che il composto parentale, terbutilazina, è classificato sostanza cancerogena di categoria 3, mentre non esistono studi sulla cancerogenicità di LM6. Poiché è evidente che la struttura di questo metabolita è molto differente da quella del parentale, abbiamo applicato una metodologia alternativa, approvata da EFSA, detta "soglia di attenzione" (Threshold of Toxicological Concern) mediante la quale, pur applicando un approccio conservativo, si deriva un valore soglia per l'acqua potabile di 3 μg L^{-1} per LM6.

Parole chiave: *inquinamento delle acque, metaboliti triazinici, acque potabili, acque di falda, valutazione del rischio.*

DISTRIBUTION AND RISK ASSESSMENT OF LM6, DECHLORINATED METABOLITE OF TERBUTHYLAZINE, IN GROUNDWATER

Abstract – During routine monitoring of triazine herbicides in groundwater, used for drinking purposes in an area of Lombardy north of Milan, a new non-chlorinated metabolite of terbutylazine, known by the abbreviation LM6, has been discovered for the first time. Thanks to the development of an analytical method by high resolution HPLC-MS, in 2015 two campaigns devoted to monitor LM6 together with triazine herbicides on groundwaters, used as drinking water supply, and on supplied drinking waters, were carried out. Terbuthylazine and triazinic metabolites desethylterbuthylazine and deisopropylatrazine had always concentrations <0.050 μg L^{-1} in the raw water, with the 75th percentile ≤ 0.015 μg L^{-1}. LM6 showed higher concentrations with median <0.050 μg L^{-1} and the 80th percentile <0.1 μg L^{-1}. While the exceedance of 0.1 μg L^{-1} limit was measured in about 20% of the raw water, the percentage of water samples that exceed the limit after treatment is only 9%. The diffusion of LM6 metabolite in groundwater used for drinking purposes has made necessary to carry out a risk assessment. Since the toxicological and physicochemical data available are very limited, two different approaches were followed. Following the guideline SANCO/221/2000 to state the relevance of pesticide metabolites, LM6 has been classified as relevant metabolite, for which Directive 98/83/EC on drinking water applies, providing a threshold value of 0.1 μg L^{-1}. The classification as relevant metabolite is due to the fact that terbuthylazine, the parental compound, is classified as carcinogen of category 3, while there are no studies on the carcinogenicity of LM6. Since it is evident that the structure of this metabolite is very different from parental's one, we applied an alternative methodology, approved by EFSA, called Threshold of Toxicological Concern, by which, even if we apply a conservative approach, a threshold value for drinking water of 3 μg L^{-1} for LM6 is derived.

Keywords: *water pollution, triazine metabolites, groundwater, drinking water, risk assessment.*

Ricevuto il 7-4-2017; correzioni richieste il 15-5-2017; accettazione finale il 13-6-2017.

1. INTRODUZIONE

I diserbanti, o erbicidi, sono sostanze utilizzate in agricoltura per il controllo delle piante infestanti. Si classificano in base ai principi attivi oppure in base alle specie vegetali bersaglio. Dato il loro largo utilizzo sul territorio italiano, gli erbicidi e alcuni loro metaboliti rappresentano la tipologia di fito-

* *Per contatti: Via Mulino 19, 20861, Brugherio (MB). Tel. 039.21694218; fax 039.2004692; e-mail: polesello@irsa.cnr.it.*

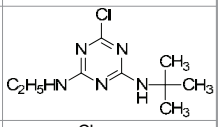
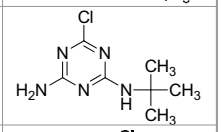
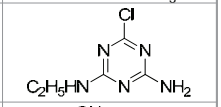
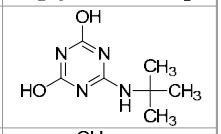
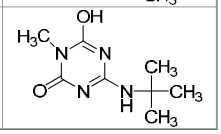
farmaci più trovate nelle acque superficiali dove costituiscono il 55,7% delle misurazioni positive (ISPRA, 2016a).
La forte presenza di erbicidi è legata sia alle quantità utilizzate, sia alle modalità di utilizzo diretto sul suolo, spesso concomitante con le precipitazioni meteoriche più intense di inizio primavera, che ne determinano un trasporto più rapido nei corpi idrici superficiali e sotterranei, andando ad interessare anche le acque di falda destinate alla potabilizzazione.
Tra le sostanze più frequentemente ritrovate nelle acque sotterranee (precisamente nel 9% del totale dei campioni analizzati) vi è la desetilterbutilazina (DET), il metabolita più conosciuto della terbutilazina (TBA) che è l'unico erbicida della classe delle triazine ancora in commercio.
In particolare, TBA e DET sono i principali contaminanti del bacino del Po (Bozzo et al., 2013; ISPRA, 2016b). TBA è presente nel 42,9% dei punti di monitoraggio delle acque superficiali e nel 5,4% di quelli delle sotterranee. Analoga diffusione è stata rilevata per il suo metabolita DET.
Come evidenziato da Bozzo et al. (2013) in un lavoro del 2013 in cui identificano il trend spaziale e temporale delle due sostanze attraverso un monitoraggio di cinque anni nell'area lombarda della Valpadana, i livelli di contaminazione sono più elevati nelle aree dove la coltivazione del mais è più intensiva. Inoltre gli autori, durante i cinque anni del monitoraggio (2005-2009), hanno rilevato una generale diminuzione delle concentrazioni misurate per entrambi i composti, probabilmente in relazione alla diminuzione di applicazione del diserbante imposto dalle normative nazionali ed internazionali. Infatti dal 1 gennaio 2008 non è più possibile utilizzare prodotti contenenti solamente TBA ma esclusivamente miscele con anche altre sostanze attive (European Union, 2008; European Union, 2011).
Attualmente in Italia la legislazione di riferimento per le acque destinate al consumo umano (D.Lgs. 31/2001) prevede che il limite per ciascun composto considerato antiparassitario (in cui sono compresi anche gli erbicidi) sia di 0,1 µg L^{-1} per ciascuna sostanza rilevata, fermo restando il limite di 0,5 µg L^{-1} per la somma dei singoli antiparassitari rilevati. 0,1 µg L^{-1}, oltre ad essere il limite di legge per le acque potabili, rappresenta anche la soglia per l'autorizzazione al commercio: in seguito all'utilizzo, infatti, la sostanza non dovrebbe lasciare residui sopra tale limite nelle acque sotterranee e nelle acque superficiali destinate all'estrazione di acqua per il consumo umano (ISPRA, 2016b). Gli stessi limiti per le acque potabili sono adottati anche come standard di qualità per la classificazione dello stato chimico delle acque sotterranee, secondo la Direttiva 2006/118/CE (European Community, 2006), modificata con la Direttiva 2014/80/UE (European Union, 2014) recepita col Decreto del 6 luglio 2016 (MATTM, 2016).
Oltre a DET, idrossiterbutilazina e desetilidrossiterbutilazina, il documento di autorizzazione dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, EFSA (EFSA, 2011) riporta la possibile presenza di altri metaboliti meno noti per la stessa sostanza, identificati con le sigle LM1-LM6, la struttura dei quali è ancora oggetto di caratterizzazione. Sebbene questi metaboliti non siano mai stati identificati durante gli studi standard di degradazione, esistono evidenze che almeno due di essi (LM5 e LM6) possano lisciviare da suoli trattati con terbutilazina ed essere ritrovati nelle acque sotterranee. LM6 è però l'unico tra questi metaboliti per il quale la struttura è stata confermata sulla base della sintesi di uno standard di riferimento. La disponibilità di questo standard ha permesso la sua determinazione quantitativa in acque di falda in comuni di alcune province lombarde. Per LM5, non essendo disponibile uno standard di riferimento, è stato possibile solo effettuare uno screening qualitativo.
Lo scopo di questo lavoro è quello di presentare i dati di monitoraggio di LM6, sostanza per la quale non sono mai stati pubblicati nella letteratura scientifica dati di concentrazione nelle acque, in acque di falda destinate alla potabilizzazione in un'area della Brianza ad alta densità abitativa. Si propone inoltre una valutazione di rischio ambientale per questa sostanza in accordo con quanto indicato da EFSA, tenendo conto anche del concetto di rilevanza per questo metabolita, giungendo anche a proporre dei valori soglia per l'acqua potabile.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Materiali

I solventi usati come eluenti cromatografici (acqua e metanolo) sono di grado LC-MS e sono stati forniti da Sigma Aldrich. Gli standard cromatografici di terbutilazina, desetilterbutilazina e deisopropilatrazina (Tab. 1) sono stati acquistati da Sigma Aldrich. Lo standard di LM6 è stato preparato per sintesi da un laboratorio esterno che lo ha gentilmente messo a disposizione per questo monitoraggio.

Tabella 1 – Sigle, nomi, formule chimiche e di strutture delle molecole analizzate

Sigla	Nome (comune o IUPAC)	Formula bruta	Formula di struttura
TBA	terbutilazina	$C_9H_{16}N_5Cl$	
DET	desetilterbutilazina	$C_7H_{12}N_5Cl$	
DIA	deisopropilatrazina	$C_5H_8N_5Cl$	
LM5	6-(*tert*-butilammino)-1,3,5-triazin-2,4-diolo	$C_7H_{12}N_4O_2$	
LM6	4-(*tert*-butilammino)-6-idrossi-1-metil-1,3,5-triazin-2(1H)-one	$C_8H_{14}N_4O_2$	

2.2. Metodo analitico

I campioni sono stati analizzati mediante un sistema HPLC-MS costituito da un autocampionatore Dionex UltiMate 3000 RS Autosampler, un cromatografo liquido Dionex UltiMAte 3000 RS Pump interfacciato con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione Orbitrap Thermo Q-Exactive.
La separazione cromatografica è stata ottenuta con una colonna UPLC Hypersil GOLD PFP (150 x 2,1 mm; 1,9 µm; ThermoFisher), utilizzando un gradiente di acqua/metanolo (Tab. 2) ad un flusso costante di 300 µL/min.
Per la ionizzazione in massa è stata utilizzata la sorgente HESI elettrospray riscaldata a 270°C con differenza di potenziale posta a +3,5 kV. L'acquisizione degli analiti è avvenuta in modalità *full scan* MS con acquisizione di spettro di frammentazione MS^2 in modalità *data dependent* (Full scan MS/ddMS^2). I valori di massa esatta degli ioni parenti $[M+H]^+$ e dei frammenti generati per collisione, che sono stati utilizzati per la determinazione quantitativa, sono riportati in Tabella 3.

Tabella 2 – Gradiente metanolo/acqua per la separazione cromatografica

Minuti	Flusso [µl min^{-1}]	% metanolo
0,0	0,3	10
1,0	0,3	30
14,0	0,3	90
20,0	0,3	90
20,5	0,3	98
24,0	0,3	98
24,5	0,3	10
33,0	0,3	10

Tabella 3 – Valori di massa/carica (m/z in u.m.a) calcolati e misurati per i diversi analiti

Sigla	Massa esatta calcolata m/z $[M]^+$	Massa ione misurato m/z $[M+H]^+$	Massa frammenti MS^2 m/z $[M+H]^+$ (Energia di collisione = 20eV)
TBA	229,7098	230,1167	n.d.
DET	201,6567	202,0854	n.d.
DIA	173,0468	174,0541	n.d.
LM5	184,1957	185,1033	129,0407
LM6	198,2223	199,1190	143,0562 57,0706

2.3. Validazione del metodo

Per determinare la ripetibilità e riproducibilità del metodo per la determinazione di LM6, la medesima concentrazione di standard analitico è stata iniettata più volte nel corso di diversi giorni, sia in tempi ravvicinati sia a mesi di distanza. La ripetibilità del metodo è in media 2,4%, mentre la riproducibilità è 2,9%.
La determinazione dei limiti di rivelabilità (MDL, Method Detection Limit) e quantificazione (MQL, Method Quantitation Limit) è basata sul calcolo della deviazione standard delle aree dello standard più basso iniettato per 8 volte. Questo valore è stato poi moltiplicato per tre e per dieci in modo da calcolare rispettivamente il limite di rivelabilità (MDL= 0,010 µg L^{-1}) e il limite di quantificazione (MQL= 0,032 µg L^{-1}) del metodo per la determinazione di LM6.

2.4. Area di indagine

L'area di indagine copre la provincia di Monza e Brianza, Lombardia, a nord-est dell'area metropolitana di Milano nella quale è presente il sistema acquedottistico gestito dalla società BrianzAcque. Gli impianti che compongono l'acquedotto, oggetto delle campagne di monitoraggio, sono costituiti da 210 pozzi trivellati, che raggiungono la falda sotterranea a diverse profondità da 25 m ad una profondità massima di 150 m, e da serbatoi pensili e interrati che consentono l'accumulo di grosse quantità d'acqua da distribuire nelle fasce orarie

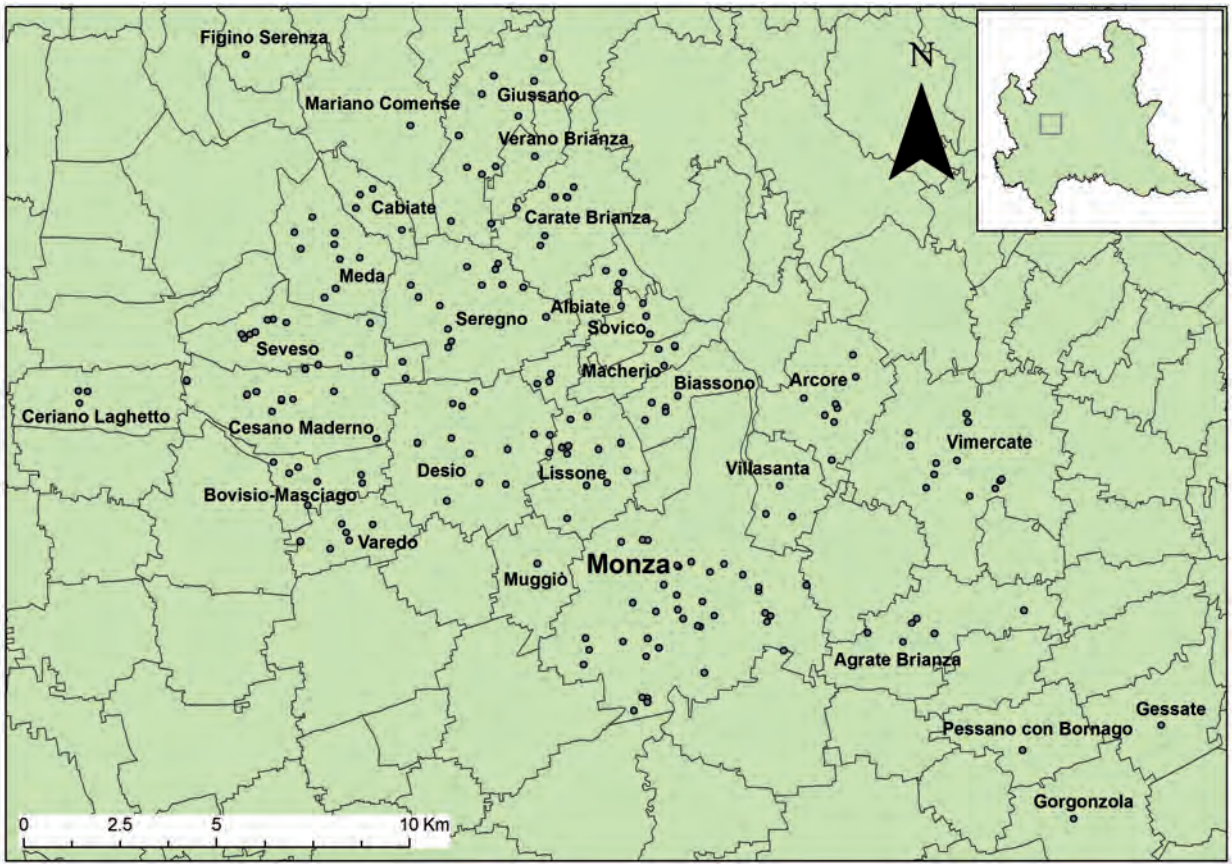


Figura 1 – Mappa dei siti di monitoraggio

dove la richiesta dell'utenza è maggiore. In Figura 1 è rappresentata la mappa dei siti di monitoraggio. In ciascuno di questi siti sono stati determinati i composti triazinici TBA, DET, DIA e LM6 nelle acque sotterranee destinate alla potabilizzazione e nelle acque potabili, campionate da serbatoio o da rete di distribuzione, in due campagne di prelievi estiva (giugno-agosto 2015) e autunnale (settembre-novembre 2015). Ogni punto di prelievo è stato georeferenziato mediante software ESRI ArcGis 9.3® ed è stata creata una banca dati costituita dalle concentrazioni dei quattro analiti in 664 campioni d'acqua, per un totale di 2656 misure.

2.5. Risultati del monitoraggio

Il metodo sviluppato è stato applicato al monitoraggio delle acque sotterranee destinate alla potabilizzazione e nelle acque potabili distribuite da BrianzAcque di due campagne di prelievi estiva e autunnale, tra giugno e novembre 2015.
Sia la terbutilazina (TBA) che il suo più conosciuto metabolita desetilterbutilazina (DET) insieme al composto deisopropilatrazina (DIA), metabolita comune ad alcuni erbicidi triazinici, sono stati rilevati nell'acqua grezza prelevata dall'ente distributore a concentrazioni sempre inferiori a 0,050 µg L^{-1} (Fig. 2) con la maggior parte dei valori (75°percentile) ≤ 0,015 µg L^{-1} per tutte e tre le sostanze (Tab. 4).
La distribuzione di LM6 è simile per le due campagne di prelievi. Le mediane delle concentrazioni di LM6 nelle due campagne sono 0,032 e 0,046 µg L^{-1} e la maggior parte dei campioni (pari all'80° percentile) ha una concentrazione di LM6 inferiore al limite per i pesticidi nelle acque potabili di 0,1 µg L^{-1}. Le concentrazioni più elevate di LM6 per le due campagne di prelievi sono state misurate in due differenti pozzi il 21 luglio 2015 (0,25 µg L^{-1}) e il 20 ottobre 2015 (0,40 µg L^{-1}) (Tab. 4).
Nelle acque potabili distribuite la terbutilazina e i suoi più comuni metaboliti sono rilevati solo in tracce, con concentrazioni massime inferiori a 0,05 µg L^{-1}, ampiamente inferiori al limite per le acque potabili (Tab. 5). Per quanto riguarda LM6 i 75° percentili dei campioni sono 0,043 e 0,053 µg L^{-1} nelle due campagne di monitoraggio.
Se il superamento del limite 0,1 µg L^{-1} per LM6 è stato misurato in circa il 20% delle acque campionate pre-trattamento, nelle analisi dell'acqua distribuita post-trattamento il numero dei campioni che superano il limite è sceso al 9% del totale, mo-

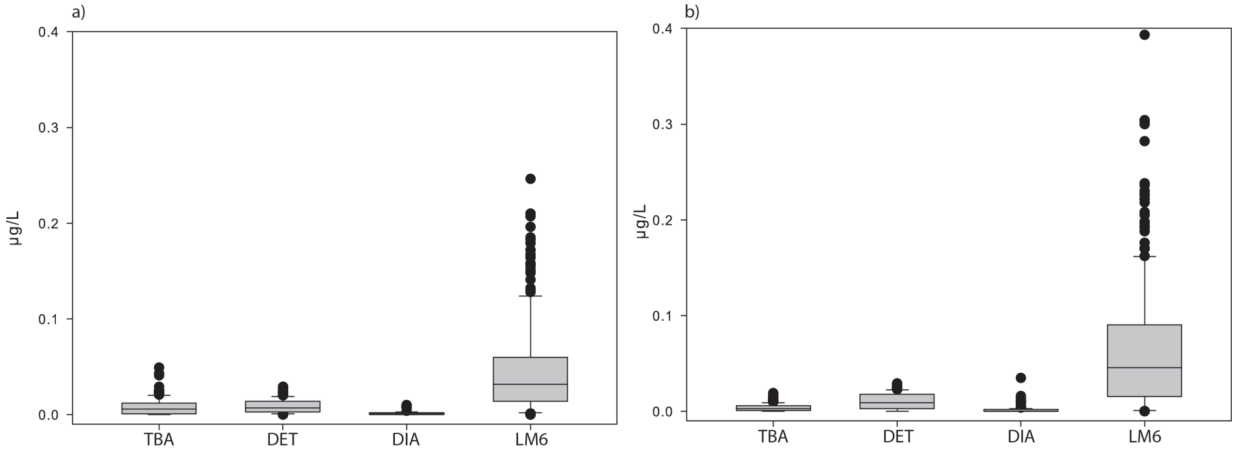


Figura 2 – Concentrazioni in µg L^{-1} di terbutilazina (TBA), desetilterbutilazina (DET), deisopropilatrazina (DIA) e 4-(tert-butilammino)-6-idrossi-1-metil-1,3,5-triazin-2(1H)-one (LM6) in acque di falda prima del trattamento campionate in due diverse stagioni a) 1° campagna: giugno-agosto 2015, b) 2° campagna: settembre-novembre 2015. I box-and-whiskers rappresentano il valore minimo, massimo, 25°, 75° percentile e mediana. I punti rappresentano i valori outlier

Tabella 4 – Statistica di base delle concentrazioni di residui triazinici nelle acque sotterranee non trattate per le due campagne di prelievo. Concentrazioni espresse in µg/L

Tipologia di acque	Campagna		TBA	DET	DIA	LM6
Sotterranea	Giugno-agosto 2015	mediana	0,006	0,007	0,001	0,032
		25° perc.	0,001	0,003	<0,001	0,014
		75° perc.	0,012	0,014	0,002	0,060
		min	<0,001	<0,001	<0,001	<0,010
		max	0,049	0,029	0,010	0,25
Sotterranea	Settembre-novembre 2015	mediana	0,003	0,009	<0,001	0,046
		25° perc.	0,001	0,003	<0,001	0,016
		75° perc.	0,006	0,018	0,002	0,089
		min	<0,001	<0,001	<0,001	<0,010
		max	0,019	0,029	0,035	0,40

Tabella 5 – Statistica di base delle concentrazioni di residui triazinici nelle acque potabili campionate da rete o serbatoio per le due campagne di prelievo. Concentrazioni espresse in µg/L

Tipologia di acque	Campagna		TBA	DET	DIA	LM6
Potabile	Giugno-luglio 2015	mediana	0,019	0,006	<0,001	0,022
		25° perc.	0,018	0,003	<0,001	0,010
		75° perc.	0,021	0,013	0,002	0,043
		min	0,007	<0,001	<0,001	<0,010
		max	0,029	0,034	0,022	0,14
Potabile	Settembre-novembre 2015	mediana	0,002	0,004	<0,001	0,023
		25° perc.	<0,001	0,002	<0,001	0,010
		75° perc.	0,005	0,014	0,001	0,056
		min	<0,001	<0,001	<0,001	<0,010
		max	0,009	0,030	0,008	0,19

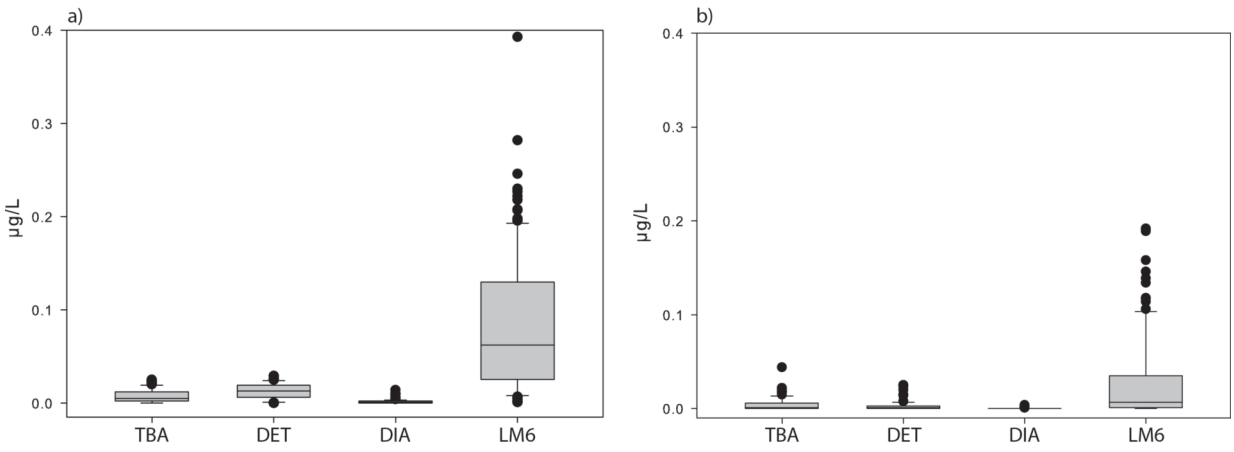


Figura 3 – Concentrazioni in µg L^{-1} di terbutilazina (TBA), desetilterbutilazina (DET), deisopropilatrazina (DIA) e 4-(tert-butilammino)-6-idrossi-1-metil-1,3,5-triazin-2(1H)-one (LM6) in acque di falda prima del trattamento (a) e dopo il trattamento prima della distribuzione (b) campionate tra giugno e novembre 2015. I box-and-whiskers rappresentano il valore minimo, massimo, 25°, 75° percentile e mediana. I punti rappresentano i valori outlier

strando l'efficacia dei trattamenti in uso (in genere adsorbimento su carbone attivo). Dai valori di mediane e 75° percentili riportate nelle tabelle 4 e 5 si può stimare un fattore di rimozione compreso tra 30 e 50% per LM6. La significativa diminuzione è evidente anche nei box-and-whiskers in Figura 3.

È interessante notare che mentre i composti triazinici noti come TBA, DET e DIA sono presenti in quantità molto ridotte e con una stretta distribuzione di concentrazioni, testimoniando l'efficacia delle recenti restrizioni d'uso, il nuovo metabolita da noi misurato per la prima volta (LM6) ha una distribuzione spaziale e di concentrazione molto più ampia, poiché è residuo probabilmente di un periodo meno recente nel quale l'uso di TBA era più elevato. Questo metabolita ha la caratteristica di essere un metabolita privo di cloro, ma con una metilazione su un azoto triazinico attribuibile a metabolismo microbiologico della flora batterica del suolo.

2.6. Valutazione del rischio

Il problema della presenza dei metaboliti di fitofarmaci nelle acque, e la conseguente necessità di fissare dei valori soglia per la classificazione delle acque, è stato affrontato da molti anni nella legislazione europea. La direttiva 91/414/CEE (European Economic Community, 1991), relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari sul mercato, fa riferimento a "metaboliti rilevanti" nel suo allegato VI (Allegato VI, punto C 2.5.1.22), che impone che le concentrazioni accettabili di "sostanze attive o dei metaboliti rilevanti" nelle acque sotterranee non devono superare la concentrazione massima ammissibile prevista dalla Direttiva sull'acqua potabile 98/83/CE (European Community, 1998) o una concentrazione più bassa, se necessario, in funzione delle loro proprietà tossicologiche. A sua volta, il termine "metaboliti rilevanti" è usato anche nella stessa Direttiva 98/83/CE, in cui è previsto che le concentrazioni di pesticidi e loro metaboliti rilevanti in acqua potabile non debbano superare 0,1 µg L^{-1}.

A livello nazionale il Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 (Italia, 2001) definisce i parametri e i relativi valori limiti che devono essere rispettati per le acque destinate al consumo umano. Il D.Lgs. 31/2001 non distingue esplicitamente tra metaboliti rilevanti e non rilevanti, poiché nel recepimento della Direttiva 98/83/CE (European Community, 1998) si è adottata la traduzione ufficiale italiana della suddetta direttiva che, alla Nota 6 della tabella PARTE B: Parametri Chimici, traduce la locuzione "*related products (inter alia, growth regulators) and their relevant metabolites, degradation and reaction products*" con "*prodotti connessi (tra l'altro regolatori della crescita) e i pertinenti metaboliti, prodotti di degradazione e di reazione*". Per quanto riguarda gli antiparassitari e i relativi prodotti connessi, il D.Lgs. 31/2001 stabilisce un valore di parametro di 0,1 µg L^{-1} per singolo antiparassitario e un limite di 0,5 µg L^{-1} per la *somma dei singoli antiparassitari e prodotti connessi rilevati e quantificati nella procedura di controllo*.

Analizzando i dati del monitoraggio della rete idrica di BrianzAcque, tale limite "generico" di 0,1 µg L^{-1}, cioè non derivato da specifiche caratteristiche tossicologiche della molecola in esame, è rispettato per la terbutilazina e i suoi più comuni metaboliti per tutti i campioni di acqua di rete o di serbatoio analizzati, e, per il metabolita LM6, per la quasi totalità dell'acqua erogata nei comuni serviti da BrianzAcque (Fig. 3b). Sono stati, infatti, rilevati solo 5 superamenti di LM6 per la campagna estiva e 3 superamenti per la campagna autunnale, ma nessun dato misurato supera comunque 0,2 µg L^{-1}. È quindi evidente che la maggior parte dei trattamenti attualmente impiegati da BrianzAcque sull'acqua prelevata in falda è già efficace per la rimozione anche di questo metabolita, come è possibile evincere dal confronto, quando disponibile, delle concentrazioni di LM6 delle acque dello stesso pozzo prima e dopo il trattamento. La concentrazione di LM6 nell'acqua di pozzo grezza (Fig. 3a) è mediamente 10 volte superiore alla concentrazione di LM6 misurata nella stessa acqua sottoposta ai trattamenti previsti da BrianzAcque (Fig. 3b).

Il ritrovamento di nuovi metaboliti di una sostanza normata pone il problema se tale metabolita concorra o meno al raggiungimento del limite di legge di 0,5 µg L^{-1} per la somma delle sostanze presenti. È ovvio che, se una sostanza non è inclusa nel monitoraggio, non concorre al raggiungimento del limite, ma, nel caso in cui sia effettivamente misurata, ci si deve porre il problema se considerarla o meno ai fini del calcolo della concentrazione totale. La discriminante per decidere se considerare o meno il metabolita sta nel concetto di rilevanza del metabolita stesso: come indicato da Dieter (2010), i metaboliti non rilevanti sono i prodotti di degradazione privi di tossicità mirata per le piante e genotossicità. Tuttavia spesso queste sostanze hanno un'elevata affinità per l'ambiente acquatico, nel quale sono molto mobili e generalmente persistenti. Ne consegue che sebbene non siano metaboliti rilevanti per l'azione attiva sulle piante, possono diventare tuttavia sostanze rilevanti per le acque potabili, compromettendone la qualità su scala a lungo termine. Inoltre possono diventare il materiale di partenza per la formazione di prodotti di trasformazione rilevanti a livello tossicologico nei processi di disinfezione con cloro.

Per valutare i rischi per la salute umana legati alla presenza di LM6 nell'acqua potabile è quindi fondamentale determinare se LM6 sia un metabolita "rilevante" o non rilevante, ed eventualmente derivare un limite specifico.

Nel menzionare esplicitamente il termine "metaboliti rilevanti" nei testi delle due direttive, il legislatore europeo riconosce implicitamente che alcuni metaboliti possano essere non rilevanti. Pertanto, le disposizioni di entrambe le direttive sono volte a regolare o porre limiti su un sottoinsieme "rilevante" dei prodotti di degradazione nello stesso modo come si fa per le sostanze attive. Nessuna delle due direttive, però, definisce il termine "metabolita rilevante" e questo ha portato ad incertezza nel suo utilizzo per gli enti di controllo e i gestori delle acque. La Direzione Generale Salute e Protezione dei Consumatori (Direction générale "Santé et consommateurs", DG SANCO) della Commissione Europea ha pubblicato una linea guida (DG SANCO, 2003) che propone una definizione operativa del termine.

Il documento SANCO descrive un sistema per determinare se un metabolita è rilevante o non rilevante sulla base di criteri di attività biologica, genotossicità e rischi tossicologici, ma anche tenendo in considerazione altri criteri amministrativi in modo pragmatico, proponendo così un processo decisionale efficiente e trasparente. Se un metabolita non è rilevante, può comunque essere oggetto di limitazioni o di ulteriori valutazioni caso per caso in linea con il principio di precauzione.

Prima di descrivere il processo di valutazione del rischio, è necessario riportare alcune definizioni che sono utilizzate dalla linea guida SANCO:

1) *Metabolita*: Ai fini del presente documento, il termine è usato per tutti i prodotti di reazione o di decomposizione di una sostanza attiva di un prodotto fitosanitario, che si formano nell'ambiente dopo l'applicazione, sia essa da processi biotici (antimicrobici o altri taxa) o abiotici (idrolisi, fotolisi). I termini "metabolita" e "prodotto di degradazione" sono equivalenti.
2) *Metabolita rilevante*: un metabolita per il quale vi è motivo di ritenere che esso abbia proprietà intrinseche comparabili alla sostanza attiva in termini di attività biologica bersaglio, o che abbia alcune proprietà tossicologiche significative e inaccettabili secondo i criteri descritti nella Linea guida. Tale metabolita è quindi trattato come principio attivo genitore nella valutazione ai sensi dell'allegato VI, punto C.2.5.1.2 della direttiva 91/414 / CEE;
3) *Metabolita che non desta alcuna preoccupazione*: un metabolita che soddisfa i criteri delinea-

ti nella Fase 1 della parte 4 della Linea guida ed è quindi ritenuto non rilevante nella valutazione ai sensi dell'allegato VI, punto C.2.5.1.2 della direttiva 91/414 / CEE.

4) *Metabolita non rilevante*: un metabolita che non soddisfa i criteri previsti per i "metaboliti rilevanti" e "metabolita che non desta alcuna preoccupazione". Un metabolita non rilevante può essere soggetto, caso per caso, a una concentrazione limite per le acque sotterranee.

Il principio guida della valutazione è che un prodotto metabolita o di degradazione è considerato rilevante se vi è motivo di ritenere che esso abbia proprietà intrinseche comparabili alla sostanza attiva in termini della sua attività biologica principale, o che abbia alcune proprietà tossicologiche significative (cioè che sia genotossico, tossico per la riproduzione, cancerogeno, tossico o molto tossico), a meno che non sia dimostrato il contrario.

Si utilizza una procedura a più stadi che, nelle prime due fasi, mira a selezionare i casi che necessitano di un ulteriore esame. Fornisce quindi indicazioni sulle più complesse fasi di valutazione successive, fasi che vanno dallo screening di valutazione dei pericoli alla valutazione completa del rischio utilizzando un numero maggiore di dati sperimentali.

Nella fase 1 del processo di valutazione SANCO si definiscono i "Metaboliti che non destano alcuna preoccupazione" come i prodotti di degradazione con le seguenti caratteristiche:

a) si tratta di CO_2 o composto inorganico non contenente un elemento metallico;
b) è un composto organico di struttura alifatica, con una lunghezza di catena uguale o inferiore a 4, che consiste solo di atomi C, H, N o O e che non ha gruppi funzionali particolari come epossido, nitrosamine, nitrile o altro gruppo funzionale, noti per il loro rischio tossicologico;
c) è una sostanza che è nota per non destare alcuna preoccupazione tossicologica o ecotossicologica, e che è presente in natura in concentrazioni molto più elevate nel rispettivo comparto.

Nel caso di LM6, esso è un composto organico di struttura eterociclica alifatica, che consiste solo di atomi C, H, N e O e che non ha gruppi funzionali particolari. Essendo una struttura ciclica non può essere classificato di lunghezza di catena uguale o inferiore a 4, e quindi non può esser classificato in senso stretto come "Metabolita che non desta alcuna preoccupazione". Per questo metabolita è perciò necessario proseguire nella fase di classificazione della sua rilevanza e, se possibile, di una valutazione completa del rischio.

La fase 2 del processo di valutazione SANCO prevede di determinare la probabilità che il metabolita di interesse possa raggiungere la falda acquifera. Secondo quanto riportato dal dossier EFSA (EFSA, 2011) sulla base dei risultati di studi con lisimetri e dati di monitoraggio delle acque sotterranee, è stato accertato che LM6 e metaboliti analoghi della terbutilazina possono contaminare le falde acquifere e raggiungere concentrazioni rilevanti (anche al di sopra del limite generico per l'acqua potabile di 0,1 $\mu g\ L^{-1}$) in una vasta gamma di condizioni geo-climatiche (EFSA, 2011).

Nel caso in cui si stimi che la concentrazione nella falda acquifera possa superare il limite precauzionale di 0,1 $\mu g\ L^{-1}$, è necessario proseguire con la fase 3 per la valutazione della pericolosità tossicologica del metabolita oggetto di valutazione.

La fase 3 fornisce uno schema pragmatico per la regolamentazione del processo decisionale relativo alla "rilevanza" di un determinato metabolita. È una valutazione a tre stadi che comprende (i) uno screening di attività biologica, (ii) uno screening di pericolosità e genotossicità, e (iii) uno screening di rischio di tossicità. Qualsiasi metabolita che non superi tutte e tre gli stadi è considerato "rilevante" a livello normativo. Il superamento di tutti e tre gli stadi non implica automaticamente una non rilevanza del metabolita, ma significa semplicemente che è necessaria un'ulteriore valutazione come fase 4.

Secondo la valutazione EFSA, LM6 non ha attività come antiparassitario o fitofarmaco (nel contesto di questo documento definita come attività biologica bersaglio) e non presenta nessun potenziale genotossico, poiché non ha evidenziato mutagenicità e genotossicità nei test in vitro su batteri e su cellule di mammifero. Per quanto riguarda il rischio di tossicità, in assenza di dati tossicologici dei metaboliti, per ragioni pragmatiche si parte dalla classificazione della tossicità del composto parentale, terbutilazina. Nessun potenziale genotossico è stato attribuito alla terbutilazina (EFSA, 2011). Poiché però si è osservato un aumento dell'incidenza di adenocarcinomi mammari in ratti alla dose di 7,6 mg $kg_{pc}^{-1}\ d^{-1}$ (mg per kg di peso corporeo al giorno), per la terbutilazina è stata proposta la categoria 3 relativamente alla cancerogenicità (R40 "limitata evidenza di effetti cancerogeni") (EFSA, 2011). In accordo con la valutazione SANCO, nel caso in cui il composto parentale, come per la terbutilazina, sia classificato come catego-

Tabella 6 – Classificazione delle classi di categorie secondo EFSA (2012). kg_{pc}: kg di peso corporeo; d: giorno

Categoria	Classificazione	Esempi	Dose Tollerabile Giornaliera ($\mu g\ kg_{pc}^{-1}\ d^{-1}$)
Sostanze con probabile genotossicità	Sostanze la cui struttura presuppone effetti genotossici		0,0025
Organofosforati e carbammati	Sostanze organofosforate o carbammati con attività anti-colinesterasica		0,3
Cramer Classe I	Sostanze con strutture chimiche semplici e per le quali sono noti meccanismi metabolici efficienti che suggeriscono un basso livello di tossicità per via orale	Costituenti tipici dei sistemi biologici, tranne gli ormoni; idrocarburi alifatici aciclici lineari o ramificati; carboidrati comuni; terpeni comuni; sali solfonati o sulfammati, senza nessuna ammina primaria libera	30
Cramer Classe II	Sostanze di struttura meno innocua rispetto a quelle di classe I, ma senza caratteristiche strutturali per le quali si può presumere evidenza di tossicità, come nel caso di sostanze nella classe III	Costituenti comuni degli alimenti; sostanze che non contengono gruppi funzionali oltre ad alcoli, aldeidi, chetoni in catena laterale, acidi, esteri, sulfammati o solfonati di sodio, calcio e potassio, acetali o chetali aciclici; oppure che siano monocicloalcanoni o composti biciclici con o senza un gruppo chetonico sull'anello	1,5
Cramer Classe III	Sostanze con strutture chimiche che non consentono una presunzione di non tossicità, che possono anche suggerire una tossicità significativa oppure che hanno gruppi funzionali reattivi	Strutture che contengono elementi diversi da C, H, O N o S divalente; certi derivati benzenici; certe sostanze eterocicliche; composti alifatici contenenti più di tre gruppi funzionali diversi	1,5

ria 3 delle sostanze cancerogene (Carc Cat 3; R 40), devono essere fornite prove convincenti che l'esposizione al metabolita non comporta alcun rischio di cancerogenicità. Non esistendo studi al riguardo per quanto riguarda LM6, a rigore tale composto, per il principio di precauzione, deve essere classificato come metabolita rilevante e si deve applicare per esso il valore parametrico per l'acqua potabile di 0,1 $\mu g\ L^{-1}$.

Tuttavia i continui miglioramenti nella sensibilità dell'analisi chimica hanno avuto come conseguenza la determinazione, negli alimenti, nei mangimi e nelle acque potabili, di un numero crescente di contaminanti chimici a basse concentrazioni, spesso sostanze per le quali vi sono pochissimi dati tossicologici. Proprio per affrontare in modo pragmatico la valutazione sui possibili rischi per la salute umana di questo tipo di sostanze, EFSA ha recentemente valutato e approvato l'approccio del tipo "soglia di attenzione" (Threshold of Toxicological Concern, TTC) come un utile strumento di screening sia per definire le priorità sia per fornire consulenza scientifica sui possibili rischi per la salute umana per esposizione a bassi livelli di concentrazione. L'approccio TTC è già stato utilizzato dall'EFSA per la valutazione degli aromi negli alimenti e dei metaboliti rilevanti dei pesticidi nelle acque sotterranee (EFSA, 2012).

L'approccio si basa su una valutazione statistica di studi di cancerogenicità a lungo termine, originariamente compilati da Gold et al. (1989) e successivamente integrati e perfezionati da altri autori.

Tale approccio non può essere applicato se la sostanza appartiene ad una delle seguenti categorie:

a) composti ad alto potenziale carcinogenico (ad es. composti simili alle aflatossine, composti azo-ossi o N-nitroso, benzidine, idrazine ed inoltre polialogeno-dibenzodiossine, -dibenzofurani e -bifenili, che sono sostanze con tempi di emivita tossicocinetici estremamente lunghi che mostrano potenziali di bioaccumulo molto diversi a seconda delle specie);
b) sostanze inorganiche;
c) metalli e organometalli;
d) proteine;
e) steroidi;
f) sostanze per le quali è noto o previsto l'accumulo negli organismi;
g) nanomateriali;
h) sostanze radioattive;
i) miscele di sostanze contenenti composti per le quali non si conosce la struttura chimica;

delle quali, però, non fa parte LM6. Bisogna perciò assegnare LM6 ad una delle classi di categorie per le quali è stata stimata la relativa dose tollera-

bile giornaliera che, con alta probabilità, non presenta effetti avversi sull'uomo (Tab. 6).
LM6 è un composto organico eterociclico alifatico che contiene atomi di azoto e, benché privo di gruppi funzionali potenzialmente tossici, per principio di precauzione può essere classificato di classe Cramer III. Per la classe Cramer III l'EFSA ha stimato una dose tollerabile giornaliera per ingestione orale (TDI, Tolerable Daily Intake) pari a 1,5 μg kg_{pc}^{-1} d^{-1}.
Allocando una quota della dose tollerabile giornaliera al consumo di acqua potabile è possibile definire una concentrazione tollerabile (o valore soglia) per l'acqua potabile. In particolare, si è adottato uno degli scenari più conservativi proposti a tal fine dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ovvero il consumo di un litro di acqua potabile al giorno per un bambino del peso corporeo di 10 kg, e si alloca al consumo di acqua il 20% della dose tollerabile, che è considerato da OMS un livello espositivo ragionevolmente protettivo in assenza di dati di esposizione adeguati (WHO, 2011). Partendo da queste assunzioni e utilizzando la TDI stimata da EFSA per la classe Cramer III, mediante la seguente equazione:

Valore soglia = TDI x peso corporeo x fattore di allocazione/V_{H2O} giornaliero =
= (1,5 μg kg_{pc}^{-1} d^{-1} x 10 kg_{pc} x 0,2) / 1 L d^{-1} = 3 μg L^{-1}

si calcola un valore soglia di 3 μg L^{-1} per LM6.
Confrontando i dati del monitoraggio della rete idrica di BrianzAcque (Tab. 5) con il nuovo limite per LM6 derivato in base all'approccio TCC, si può costatare che non si registra alcun superamento del limite per l'acqua erogata nei comuni serviti dal gestore BrianzAcque.

3. CONCLUSIONI

Il monitoraggio di erbicidi quali terbutilazina e suoi metaboliti nelle acque sotterranee utilizzate a scopo potabile ha messo in luce la presenza ubiquitaria del metabolita LM6, generato probabilmente dall'attività microbica di degradazione della terbutilazina nel suolo. Analizzando i dati di monitoraggio in funzione delle mappe di uso dei suoli non è stato possibile stabilire con precisione una sorgente di inquinamento per la contaminazione da erbicidi triazinici nell'area di monitoraggio. Le pratiche agricole di diserbo mediante terbutilazina per colture di mais e di sorgo sembrano la sorgente più plausibile, anche se non si può escludere il diserbo urbano in passato prima dell'introduzione delle restrizioni negli usi.
L'elevata diffusione del metabolita LM6 ha reso necessaria una valutazione del rischio per questa sostanza per derivare una concentrazione ammissibile nelle acque potabili. Poiché i dati tossicologici e chimico-fisici per questa sostanza sono assai limitati, sono stati seguiti due approcci diversi.
Seguendo la Linea Guida SANCO/221/2000 per stabilire la rilevanza dei metaboliti di antiparassitari, utilizzando il principio di precauzione, LM6 è stato classificato come metabolita rilevante, per il quale si applicano dunque le disposizioni della Direttiva 98/83/CE sulle acque potabili che prevedono un valore di parametro di 0,1 μg L^{-1} per le acque destinate al consumo umano. La classificazione di metabolita rilevante è dovuta unicamente al fatto che il composto parentale, terbutilazina, è classificato sostanza cancerogena di categoria 3 (Carc Cat 3; R 40), mentre non esistono studi sulla cancerogenicità di LM6.
In realtà è evidente che la struttura di questo metabolita è molto differente da quella del composto parentale. È infatti un composto declorurato, e quindi manca di quelle caratteristiche di assorbimento e biodisponibilità indotte dalla presenza dell'atomo di cloro, e soprattutto non è aromatico, cioè manca di quella planarità che normalmente è legata alla possibilità di una interazione negativa col patrimonio genetico cellulare. La struttura del metabolita LM6 ha quasi tutte le caratteristiche per essere classificato formalmente come "Metabolita che non desta alcuna preoccupazione". Non vi sono evidenze che questa molecola abbia azione tossica e la sua classificazione dipende solo da quella del suo composto parentale, che è strutturalmente molto diverso, in mancanza di dati di tossicità del metabolita stesso.
Abbiamo perciò ritenuto utile proporre una metodologia alternativa, approvata da EFSA anche per la valutazione dei metaboliti rilevanti dei pesticidi nelle acque sotterranee, che è l'approccio del tipo "soglia di attenzione" (Threshold of Toxicological Concern, TTC), che può essere utilizzato per una valutazione di rischio per sostanze per le quali non siano a disposizione dati sufficienti sulla loro tossicità. In base a questa metodologia di classificazione, pur applicando un approccio conservativo, si deriva un valore soglia per l'acqua potabile di 3 μg L^{-1} per LM6.

Confrontando i dati del monitoraggio della rete idrica di BrianzAcque con il limite per LM6 derivato in base all'approccio TCC si può constatare che non si registra alcun superamento nell'acqua erogata nei comuni serviti da BrianzAcque. Se, invece, si considera il limite di legge precauzionale per i fitofarmaci nelle acque potabili di 0,1 μg L^{-1}, esso è rispettato per la terbutilazina e i suoi più comuni metaboliti per tutti i campioni di acqua di rete o di serbatoio analizzati, e, per il metabolita LM6, per la quasi totalità dell'acqua erogata nei comuni serviti da BrianzAcque.

Per quanto riguarda la classificazione delle acque sotterranee, allo stato attuale della legislazione, vale comunque lo standard di qualità di 0,1 μg L^{-1}; quindi in diversi siti negli acquiferi lombardi, sottostanti aree agricole nelle quali in passato c'è stato un intenso uso di diserbanti a base di terbutilazina, il buono stato chimico può non essere rispettato per LM6.

4. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Bozzo S., Azimonti G., Villa S. et al. (2013) Spatial and temporal trend of groundwater contamination from terbuthylazine and desethyl-terbuthylazine in the Lombardy Region (Italy). Environmental Science. Processes & Impacts 15: 366-372.

Dieter H.H. (2010) The relevance of "non-relevant metabolites" from plant protection products (PPPs) for drinking water: The German View, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 56: 121-125.

DG SANCO (2003) Guidance document on the assessment of the relevance of metabolites in groundwater of substances regulated under Council Directive 91/414/EEC, Guideline Sanco/221/2000.

EFSA (2011) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbuthylazine. EFSA Journal 9: 1969.

EFSA (2012) Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC). EFSA Journal 10: 2750.

European Community (1998) Council Directive of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption (98/83/CE). Official Journal of the European Union L 330, 5.12.1998.

European Community (2006) Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration. Official Journal of the European Union L372/19, 27.12.2006.

European Economic Community (1991) Council Directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the Market (91/414/EEC). Official Journal of the European Union L 230, 19.8.1991.

European Union (2008) Commission Decision of 5 December 2008 concerning the non-inclusion of certain active substances in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances. OJ L 333, 11.12.2008.

European Union (2011) Commission Implementing Regulation (EU) No 820/2011 of 16 August 2011 approving the active substance terbuthylazine, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011 and Commission Decision 2008/934/EC. Official Journal of the European Union L 209, 17.8.2011.

European Union (2014) Commission Directive 2014/80/EU of 20 June 2014 amending Annex II to Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council on the protection of groundwater against pollution and deterioration. Official Journal of the European Union L182/52, 21.6.2014.

Gold L.S., Slone T.H. and Bernstein L. (1989) Summary of carcinogenic potency and positivity for 492 rodent carcinogens in the carcinogenic potency database. Environmental Health Perspective 79: 259-272.

ISPRA (2016a) Rapporto nazionale pesticidi nelle acque. Dati 2013-2014. ISPRA Rapporti 244/2016.

ISPRA (2016b) Rapporto nazionale pesticidi nelle acque. Dati 2013-2014. Tabelle Regionali. ISPRA Rapporti 244/2016.

Italia (2001) Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31, attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano.

MATTM (2016) Decreto 6 Luglio 2016, Recepimento della direttiva 2014/80/UE della Commissione del 20 giugno 2014 che modifica l'allegato II della direttiva 2006/118/CE del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento.

WHO (2011) Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition, Geneva, Switzerland.

5. RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato svolto nell'ambito della Convenzione tra BrianzAcque S.r.l., ATO Monza e Brianza e Istituto di Ricerca Sulle Acque del CNR per il supporto allo screening e gestione di sostanze "incognite" e inquinanti emergenti rilevati nelle acque destinate ad uso potabile. Si ringraziano Sara Castiglioni e Renzo Bagnati dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano per l'analisi di identificazione in Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione e la loro grande disponibilità.

INGEGNERIA DELL'AMBIENTE

per il 2017 è sostenuta da:



UNICALCE
Innoviamo la tradizione

CiAl Consorzio Imballaggi Alluminio

VEOLIA
Veolia Water Technologies Italia S.p.A.

STADLER®
STADLER ITALIA S.r.l.

SIAD

RICREA
CONSORZIO NAZIONALE RICICLO E RECUPERO IMBALLAGGI ACCIAIO
1997 2017

VOMM

SOLVAir Solutions

ALLEGRI ecologia
trattamento acque

KSB

PASSAVANT IMPIANTI spa
progettazione e costruzione impianti trattamento acque, fanghi e rifiuti

comieco
Consorzio Nazionale Recupero e Riciclo degli Imballaggi a base Cellulosica

iren

SEAM engineering
l'acqua e l'ambiente