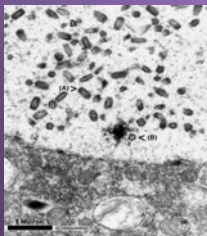
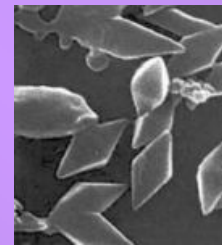


## Biopesticidi: aspetti scientifico-normativi

Marco Nuti e Caterina Cristani  
Università di Pisa – Dip.to di Biologia delle Piante Agrarie  
Via del Borghetto 80, 56124 Pisa- Tf 050/2216642  
[mpnuti@agr.unipi.it](mailto:mpnuti@agr.unipi.it)



I biopesticidi in agricoltura  
21 gennaio 2010 - Roma



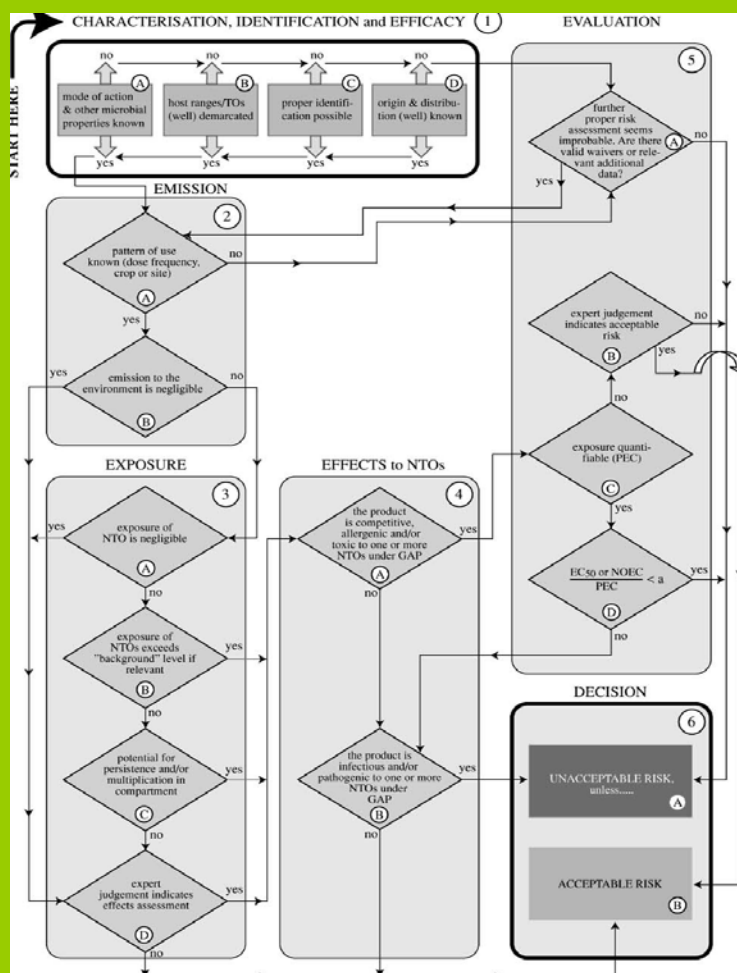
### Annex I (91/414 EEC) situazione al 2009

<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ10	<i>B.t. aizawai</i> 1857
<i>Bauveria bassiana</i> (ATCC74040, GHA )	<i>B.t. aizawai</i> GC91
<i>Lecanicillium muscarium</i> (ex <i>Vertic. lecanii</i> )	<i>B.t. kustaki</i> (351,PB54,SA12,SA11,EG2348)
<i>Metarhizium anisopliae</i> Bipesco 5F/52	<i>B.t. israelensis</i> AM65-52
<i>Phlebopsis gigantea</i>	<i>B. subtilis</i> QST713
<i>Pythium oligandrum</i> M1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA34
<i>T.atroviride</i> T11 (ex <i>T.harzianum</i> )	<i>Pseudozyma flocculosa</i>
<i>T.harzianum</i> Rifai T22	
<i>T.polysporum</i> IMI206039	<i>Streptomyces</i> K61 (ex <i>S.griseoviridis</i> )
<i>T.asperellum</i> ICC012 (ex <i>T.harzianum</i> )	
<i>T.gamsii</i> ICC080 (ex <i>T.viride</i> )	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV (*)
<i>Verticillium albo-atrum</i> WCS850 (ex <i>V.dahliae</i> )	<i>Cydia pomonella</i> CpGV
<i>Coniotyrium minitans</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> NPV (*)
<i>Gliocladium catenulatum</i> J1446	Zucchini Yello Mosaic Virus (weak strain)(*)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Apopka 47	Pseudomonas DMSZ 13134 (*)
<i>Paecilomyces lilacinus</i> 251	Adoxophyes orana GV BV0001 (*)
<i>Aureobasidium pullulans</i> (DSM14940, 14941)(*)	<b>17 microfunghi 4 microfunghi (*),</b>
<i>Candida oleophyla</i> O (*)	<b>1 lievito (*)</b>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Fe9901 (*)	<b>11 batteri, 1 attinobatterio, 1 batterio (*)</b>
<i>T. atroviride</i> I-1237(*)	<b>1 virus, 4 virus (*) (*) in valutazione</b>

## Problemi generali incontrati durante la fase di registrazione (H.Strasser, REBECA 2007; Strasser@uibk.ac.at)

### Assenza di scambi d'informazione tra gli interessati

- Mancanza di esperienza tra i responsabili amm.vi
- Mancanza di conoscenza dei procedimenti nelle SMEs
- Amm.vi non disposti ad accettare i waivers
- Dossiers di bassa qualità
- Costi elevati
- Procedure lunghe e non temporizzabili
- Requirements di efficacia del prodotto
- Mancanza di riconoscimento mutuo
- Mercato limitato – SME con bassa capacità finanziaria
- Mancanza di documenti-guida
- Mancanza di appropriate linee-guida per i test



### ERA DECISION TREE



Mensinck BJ et al  
(2007) Biocontrol  
Sci. Technol. 17, 3-20

**Plant protection products considerati NON appropriati per la QPS (Qualified Presumption of Safety)**

***Bacillus thuringiensis aizawai* ABTS 1857**

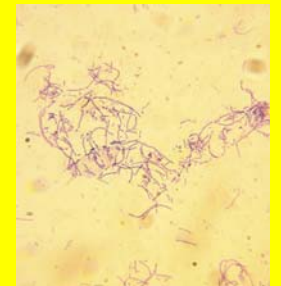
***Bacillus thuringiensis aizawai* GC 91**

***Bacillus thuringiensis israeliensis* AM 6552**

***Bacillus thuringiensis kurstaki* PB 54**

***Bacillus thuringiensis kurstaki* ABTS 351**

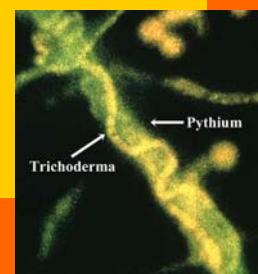
***Bacillus thuringiensis kurstaki* SA11**



The EFSA Journal (2008) 923, 1-48

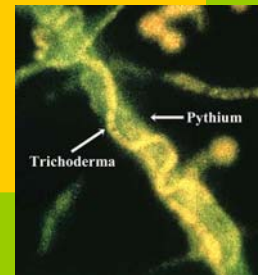
**Problemi di natura scientifica riscontrati od emersi durante la registrazione di m.o. come Plant Protection Products (2007-2009)**

- **Identita' a livello di ceppo**
- **Ciclo biologico**
- **Contaminanti**
- **Mutagenesi e cancerogenesi**
- **Valutazione dell'esposizione**
- **Valutazione d'impatto ambientale (NTO)**
- **Valutazione del rischio cumulativo**
- **Scientificità dei dati**



# Problemi di natura scientifica riscontrati od emersi durante la registrazione di m.o. come Plant Protection Products (2007-2009)

- **Identita' a livello di ceppo**
- **Ciclo biologico**
- **Contaminanti**
- **Mutagenesi e cancerogenesi**
- **Valutazione dell'esposizione**
- **Valutazione d'impatto ambientale (NTO)**
- **Valutazione del rischio cumulativo**
  
- **Scientificità dei dati**



## Criteri tassonomici per la identificazione dei m.o. BCA

Winding A. et al. (2008) OECD WD Env/JM/Mono 36, 15-27

- **Microfunghi**

morfospecie, specie biologiche, specie filogenetiche, specie ecologiche, specie politetiche

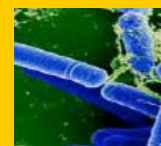
RAPD/AFLP, RFLP di rDNA/ITS/IGS/mDNA, geni delta/COX1



- **Batteri**

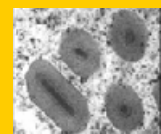
metodi fenotipici, metodi chemotassonomici, metodi filogenetici, metodi genotipici

genomotyping con microarrays



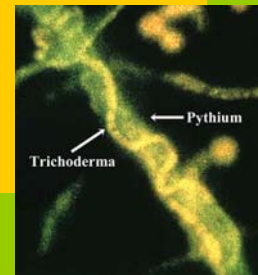
- **Virus**

specie politetiche (criteri molecolari e filogenetici in corso di di definizione)



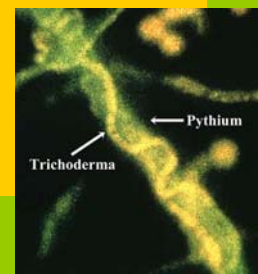
## Problemi di natura scientifica riscontrati od emersi durante la registrazione di m.o. come Plant Protection Products (2007-2009)

- **Identita' a livello di ceppo**
- **Ciclo biologico** (1/K *in vivo*, sporulazione, VC/VNC)
- **Contaminanti**
- **Mutagenesi e cancerogenesi**
- **Valutazione dell'esposizione**
- **Valutazione d'impatto ambientale (NTO)**
- **Valutazione del rischio cumulativo**
  
- **Scientificita' dei dati**



## Problemi di natura scientifica riscontrati od emersi durante la registrazione di m.o. come Plant Protection Products (2007-2009)

- **Identita' a livello di ceppo**
- **Ciclo biologico** (1/K *in vivo*, sporulazione, VC/VNC)
- **Contaminanti (diversi da caso a caso, metodi)**
- **Mutagenesi e cancerogenesi**
- **Valutazione dell'esposizione**
- **Valutazione d'impatto ambientale (NTO)**
- **Valutazione del rischio cumulativo**
  
- **Scientificita' dei dati**



# Contaminanti

per *Bacillus thuringiensis*

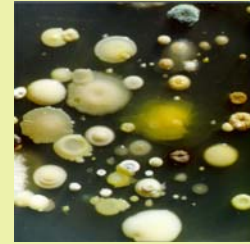
*Salmonella* spp. : 0 cfu/25g or ml

Streptococchi/enterococchi :  $10^5$  cfu/g or ml

Total coliforms :  $10^3$  cfu/g or ml

*Clostridium perfringens* : absence in 1 g or ml

*Staphylococcus aureus* : 0 in 1 g or ml



• per *funghi e attinobatteri*

No potential human pathogen

Total mesophiles :  $10^5$  cfu/g or ml

*Enterobacteriaceae* : <10 cfu/g or ml

Fecal streptococchi/enterococchi : 0 in 1 g or ml

Fecal coliforms : <10 cfu/g or ml

*E.coli* : 0 in 1 g or ml

*Salmonella* spp. : 0 cfu/25g or ml

Staphylococchi : 0 in 1 g or ml

Yeast and moulds: <1000 cfu/g or ml (especially *Aspergillus*)

• per **Baculovirus**

No potential human pathogen

Total mesophiles :  $10^8$  cfu/g or ml

*Bacillus cereus* :  $10^7$  cfu/g or ml

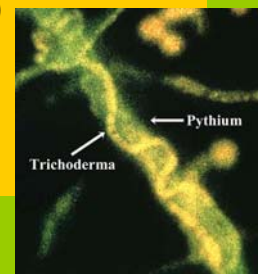
*E.coli* : 0 in 1 g or ml

*Salmonella* spp. : 0 cfu/25g or ml

*Staphylococcus aureus* : 0 in 1 g or ml

Problemi di natura scientifica riscontrati od emersi durante la registrazione di m.o. come Plant Protection Products (2007-2009)

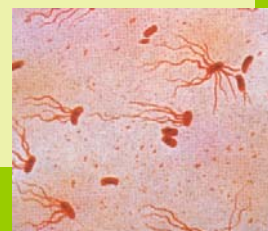
- **Identita' a livello di ceppo**
- **Ciclo biologico** (1/K *in vivo*, sporulazione, VC/VNC)
- **Contaminanti** (diversi da caso a caso, metodi)
- **Mutagenesi e cancerogenesi (tests)**
- **Valutazione dell'esposizione**
- **Valutazione d'impatto ambientale (NTO)**
- **Valutazione del rischio cumulativo**
- **Scientificità dei dati**



## Mutagenicità e cancerogenesi

I saggi di genotossicità sono significativi per i batteri ?

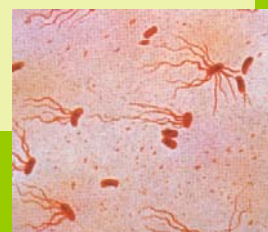
La maggior parte dei tests standard di mutagenicità sono inadeguati e non applicabili per la valutazione del potenziale genotossico del materiale microbico



## La valutazione dell'esposizione

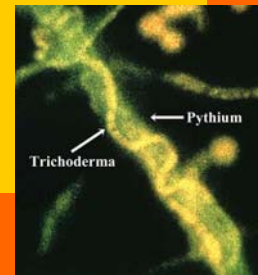
**I modelli di valutazione dell'esposizione per operatori e bystanders sono adeguati ?**

**I modelli di valutazione tedesco ed inglese appaiono inadeguati e non applicabili alla valutazione dell'esposizione per quei m.o. che non sono nè infettivi nè patogeni ma causano human distress e problemi di natura respiratoria**



## Problemi di natura scientifica riscontrati od emersi durante la registrazione di m.o. come Plant Protection Products (2007-2009)

- **Identita' a livello di ceppo**
- **Ciclo biologico** (1/K *in vivo*, sporulazione, VC/VNC)
- **Contaminanti** (diversi da caso a caso, metodi)
- **Mutagenesi e cancerogenesi (tests)**
- **Valutazione d'impatto ambientale (NTO)**
- **Valutazione del rischio cumulativo**
  
- **Scientificità dei dati**



## ERA Assessment (EFSA 2008,2009)

- NTO testing based on “surrogate species” (classic ecotoxicological approach) or “ecologically relevant species” (field testing required) (EFSA Colloquium 8,2008)
- Based on literature review on effect assessment, the PPR Panel concludes that for soft bodied soil organisms (earthworms, enchytraeids, nematodes) and plants in close contact with the soil solution, **pore water mediated uptake of pesticides** seems mainly responsible for the effects caused, and would therefore be **the relevant metric** for effects assessment, and consequently also for exposure assessment (EFSA Journal 922, 1-90,2009)
- For a number of relevant soil taxa with different life and feeding strategies (e.g. mites and isopods), no information is available. For these organisms, additional routes of uptake (e.g. feed, contact with substrates in soil and litter) may need to be considered for terrestrial risk assessment.
- Soil microorganisms are generally overlooked (SANCO/10329/2002)



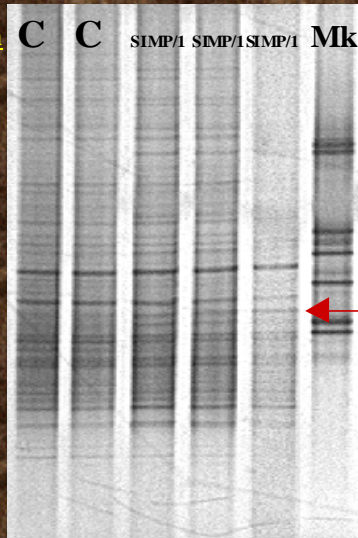
## monitoring the effects of a BCA on soil m.o. with DGGE

(greenhouse exp.; Felici,2005)

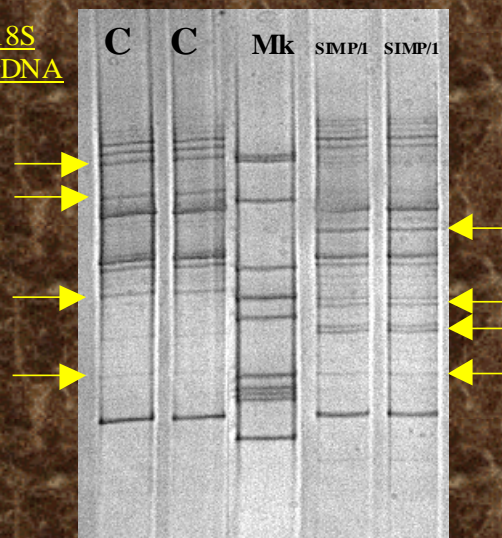
### *Bacillus subtilis* SIMP/1

#### Effect on rhizospheric microbial community

V6V8 region  
of 16S rDNA

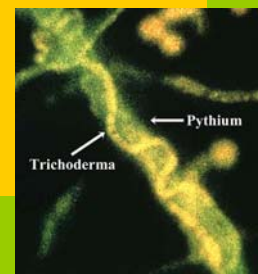


18S  
rDNA



## Problemi di natura scientifica riscontrati od emersi durante la registrazione di m.o. come Plant Protection Products (2007-2009)

- **Identita' a livello di ceppo**
- **Ciclo biologico** (1/K *in vivo*, sporulazione, VC/VNC)
- **Contaminanti** (diversi da caso a caso, metodi)
- **Mutagenesi e cancerogenesi** (tests)
- **Valutazione d'impatto ambientale** (NTO)
- **Valutazione del rischio cumulativo**
- **Scientificità dei dati**



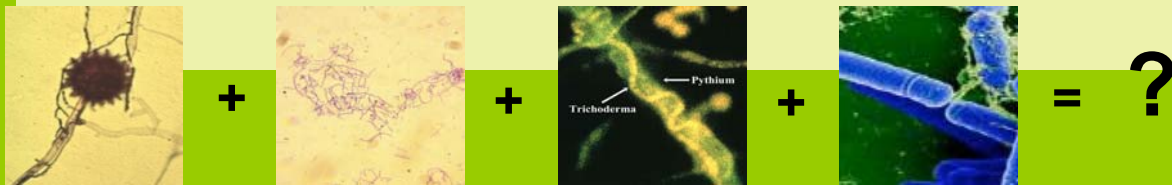
## Valutazione del rischio cumulativo (Reg. 396/2005)

1. non viene effettuata al momento

2. può essere di varie tipologie:

rischio cumulativo (è presente più di una sostanza  
nello stesso momento)

rischio aggregato (considera tutte le vie di esposizione)  
valutazione probabilistica dell'esposizione (uso delle  
distribuzioni anziché le stime puntuali dell'esposizione)



## Aree di ricerca (Chandler et al. 2008)

- Migliore conoscenza della **filogenia** degli MCA naturali
- Comprensione della **biogeografia** dei MCA, dei fattori che ne determinano la distribuzione di specie e ceppi e che influenzano il flusso genico
- Miglior conoscenza dei fattori che determinano la **persistenza e diffusione** dei MCA, incluse le interazioni con l'ambiente biotico/abiotico e le dinamiche di comunità
- Determinazione dei **livelli di fondo** dei MCA in ecosistemi agrari e naturali, inclusa **la prevalenza** e diversità a livello gene-comunità, la biomassa e funzione dell'ecosistema
- Miglior conoscenza delle **dinamiche di popolazione**, incluse quelle ospite-patogeno, e degli effetti indiretti sui non-target

## Indice di rischio per BCA convenzionali e microbici

**Five basic components have been proposed for the calculation of the overall environmental risk score:**

- 1) Persistence of the substance**
- 2) Dispersal potential**
- 3) Range of (non)-target organisms that are affected**
- 4) Direct and indirect effects on the ecosystem**
- 5) Risks regarding vertebrate toxicity**

**Laengle, T. & Strasser, H. Developing a risk index to comparatively assess environmental risks posed by microbial and conventional pest control agents. Biocont. Sci. Technol. (submitted August 2008)**