

Pesticidi a base di microrganismi: aspetti di destino ambientale ed ecotossicologia

Mara Luini, Alessio Riva

Centro Internazionale per gli Antiparassitari e la Prevenzione Sanitaria (ICPS)

Introduzione generale

Si definiscono “Prodotti Fitosanitari” i preparati contenenti una o più sostanze attive, utilizzati per il controllo degli organismi nocivi delle colture, per il controllo delle piante infestanti nelle coltivazioni e per favorire o regolare la produzione vegetale.

Si tratta di sostanze deliberatamente immesse nell'ambiente che per le loro proprietà intrinseche possono risultare nocive per organismi non bersaglio (ad esempio uccelli e mammiferi, organismi acquatici, api e altri artropodi utili, organismi del suolo e piante) e avere effetti indesiderati sulla salute umana e sull'ambiente.

La valutazione, la commercializzazione e l'uso di principi attivi (erbicidi, insetticidi, fungicidi, ecc) presenti in prodotti fitosanitari nell'UE sono definiti dal regolamento (CE) 1107/2009 [1].

Il regolamento si applica alle sostanze, compresi i microrganismi che esercitano

un'azione generale o specifica contro gli organismi nocivi oppure sui vegetali, su parti di vegetali o su prodotti vegetali.

Il regolamento stabilisce inoltre quali dati debbano essere forniti a supporto della richiesta di autorizzazione di un principio attivo/prodotto da parte dell'azienda produttrice (notificante). In sintesi:

- Identità e proprietà chimiche e fisiche, altre informazioni supplementari;
- Metodi analitici;
- Tossicologia umana: studi di tossicità per l'uomo, rischio per l'operatore (colui che applica il prodotto) e per gli astanti;
- Metabolismo e Residui nelle colture;
- Destino ambientale;
- Ecotossicologia;
- Dati ed informazioni sull'efficacia del

prodotto;

- Valutazione della rilevanza tossicologica per l'uomo dei metaboliti rinvenuti nelle acque di falda (utilizzate per il consumo umano).

Destino e comportamento ambientale

Secondo il regolamento 1107/2009, il destino ambientale di una sostanza attiva contenuta in un prodotto fitosanitario e la sua distribuzione nei diversi comparti ambientali (suolo, acque sotterranee, acque superficiali e aria) devono essere ben noti e descritti. Devono essere analizzate le sue capacità di distribuirsi nei diversi comparti, le vie e le velocità di degradazione mediante processi sia di tipo chimico-fisico, sia biologico e l'eventuale accumulo.

Nel descrivere quale siano le basi della valutazione del destino ambientale di fitosanitari a base di microrganismi è opportuno effettuare un confronto con la valutazione dell'esposizione di fitosanitari a base chimica, evidenziando la diversità di dati richiesti a supporto e alcune criticità.

Per quanto riguarda i fitosanitari a base chimica, il regolamento UE n. 283/2013 [2] e il regolamento UE n. 284/2013 [3] stabiliscono gli studi necessari da fornire a supporto della valutazione dell'esposizione ambientale per quanto riguarda i principi attivi e i prodotti, rispettivamente.

Il comportamento nei diversi comparti ambientali (suolo, acque superficiali e acque di falda) viene valutato mediante una serie precisa di studi di laboratorio e di campo, condotti secondo linee guida e protocolli validati a livello internazionale (OECD, EPA, EFSA) che definiscono come uno studio debba essere condotto e i criteri di validità dello stesso.

Per ogni comparto devono essere determinate le concentrazioni ambientali previste (*Predicted Environmental Concentration* -

PEC) della sostanza attiva e dei suoi principali (*major*) metaboliti in seguito all'uso del prodotto.

Il calcolo delle PEC viene effettuato mediante l'utilizzo di complessi modelli matematici validati a livello Europeo.

I valori di PEC vengono poi confrontati con i dati di tossicità ottenuti dagli studi ecotossicologici nella procedura di valutazione del rischio per determinare se, in seguito all'utilizzo di un prodotto fitosanitario, si determina un rischio non accettabile sugli organismi non bersaglio.

Cosa succede però nel caso in cui la sostanza attiva contenuta in un prodotto fitosanitario sia un microrganismo (m.o.)?

In questo caso è opportuno fare alcune premesse partendo dal presupposto che i microrganismi, a differenza delle sostanze chimiche, sono organismi viventi con specifiche proprietà biologiche tra cui quella di proliferare.

L'obiettivo è quello di ottenere tutte le informazioni necessarie a determinare la presenza del m.o. nei diversi comparti ambientali e a determinare l'eventuale esposizione degli organismi non bersaglio.

Come per i fitosanitari a base chimica, il punto di riferimento per quanto riguarda i dati necessari da fornire è il regolamento UE n. 283/2013 (Parte B).

Vengono richiesti tutti i dati e le informazioni riguardanti l'origine del m.o., le sue proprietà, sopravvivenza e le modalità di utilizzo. È inoltre richiesta la caratterizzazione di tutti i metaboliti rilevanti (cioè che implicano un rischio per la salute dell'uomo e/o per l'ambiente) prodotti dal m.o.

Per quanto riguarda il destino ambientale è necessario fornire informazioni riguardanti:

- la persistenza e la moltiplicazione dei m.o. nei diversi comparti ambientali (suolo, acqua ed aria). Deve inoltre essere fornita una stima delle quantità di m.o. presente nei diversi comparti in seguito all'applicazione;
- la mobilità ovvero la valutazione della possibile diffusione del m.o. e dei suoi prodotti di degradazione nei diversi comparti considerando modalità di utilizzo, ciclo vitale, ecc.

Tutte le informazioni richieste possono essere fornite tramite dati sperimentali o studi di letteratura. Non esistono però al momento linee guida specifiche (al contrario dei fitosanitari a base chimica) su come debbano essere condotti gli studi e su quali siano i criteri di validità.

A decorrere dal 21 novembre 2022 si applicano i nuovi *data requirements* per quanto riguarda i fitosanitari a base di microrganismi (Regolamento UE 2022/1439 [5] e Regolamento UE 2022/1440 [6]).

Secondo i nuovi *data requirements*, devono essere fornite informazioni sufficienti a consentire una valutazione dell'esposizione degli organismi non bersaglio e dell'uomo al microrganismo ed eventualmente ai suoi metaboliti potenzialmente pericolosi attraverso dati sperimentali e/o studi di letteratura.

La presenza ambientale del m.o. viene valutata seguendo un approccio a step:

1. **Densità ambientale:** stima della densità ambientale prevista (PED) del m.o. nel suolo e nelle acque superficiali in seguito al trattamento con il prodotto fitosanitario. La stima delle PED viene fatta applicando delle semplici formule matematiche che considerano la somma delle applicazioni annuali effettuate, l'assenza di declino della popolazione batterica e l'assenza di intercetta da

parte delle foglie della coltura trattata (si assume che tutto ciò che viene applicato finisca sul suolo e nell'acqua superficiale).

2. **Valutazione qualitativa dell'esposizione:** si effettua se sulla base dei valori di PED calcolati precedentemente si riscontrino effetti avversi sugli organismi non bersaglio o nel caso in cui non sia possibile concludere. Questo tipo di valutazione viene effettuata utilizzando dati sperimentali e/o studi di letteratura sul target specifico per cui è stato riscontrato l'effetto.
3. **Valutazione quantitativa dell'esposizione:** si effettua qualora sulla base delle informazioni precedenti (punti 1 e 2) venga determinato un rischio per gli organismi non bersaglio o per l'uomo o qualora le informazioni non siano sufficienti. Si basa sulla misura sperimentale della densità di popolazione del m.o. oggetto della valutazione nel comparto ambientale di interesse.

Come sottolineato precedentemente, non esistono al momento linee guida o indicazioni specifiche su come gli studi sperimentali debbano essere condotti e quali debbano essere i relativi criteri di validità.

Nel caso in cui nell'MPCA fabbricato siano presenti metaboliti pericolosi per la salute umana o per gli organismi non bersaglio, deve essere determinata la concentrazione ambientale prevista dei suddetti metaboliti nei diversi comparti ambientali. Tale richiesta non si applica per eventuali metaboliti pericolosi che sono prodotti *in situ* ma che non sono presenti nell'MPCA fabbricato.

Valutazione degli effetti su organismi non bersaglio

Prima di entrare nel merito di come debba essere eseguita la valutazione ecotossicologica di pesticidi "biologici" in accordo con i nuovi *data requirements*, è oppor-

tuno ribadire quelle che sono le principali differenze tra la valutazione degli effetti sugli organismi non bersaglio per pesticidi “chimici” e pesticidi “biologici”.

Un prodotto fitosanitario a base chimica contiene principi attivi che dispersi in ambiente possono essere soggetti a processi di degradazione e formare metaboliti. In accordo con la Parte A del Regolamento UE 283/2013, la valutazione degli effetti per i principi attivi e i principali metaboliti si basa su studi di tossicità acuta e a lungo termine su organismi non bersaglio, i quali devono essere condotti in accordo con le pertinenti linee guida OECD. Al contrario, i cosiddetti pesticidi “biologici” contengono organismi viventi che dispersi in ambiente possono essere in grado di moltiplicarsi e proliferare. In accordo con il recente Regolamento UE 2022/1439, la valutazione degli effetti dell'MPCA fabbricato si basa sulle informazioni relative alla potenziale infettività e patogenicità del microrganismo, oltre che sulla tossicità dei “metaboliti potenzialmente pericolosi” prodotti dal m.o. stesso. Inoltre, eventuali studi ecotossicologici sull'MPCA vengono di norma condotti seguendo linee guida specifiche dell'US EPA (OPPTS series 885) o tramite adattamenti delle linee guida OECD sviluppate per composti chimici.

Valutazione della potenziale infettività e patogenicità dei microrganismi sugli organismi non bersaglio

Nel Regolamento UE 2022/1439 si definisce “infettività” la capacità di un microrganismo di provocare un'infezione, mentre la “patogenicità” è definita come la capacità non opportunistica di un microrganismo di causare lesioni e danni all'ospite in caso di infezione. In accordo con il suddetto regolamento, il richiedente deve fornire studi pertinenti sull'infettività e sulla patogenicità del microrganismo, salvo nei casi in cui l'infettività e la patogenicità possano essere valutate ed escluse sulla base delle

informazioni già fornite nelle sezioni 1, 2, 3 e 7 (tramite un approccio di *weight of evidence*) o nel caso si dimostri che l'esposizione al microrganismo sia nulla. Quindi, i nuovi *data requirements* lasciano di fatto la possibilità al richiedente di condurre la valutazione degli effetti senza la necessità di fornire nuovi studi.

In mancanza di studi specifici di infettività e patogenicità, le principali informazioni che possono essere considerate come potenziali linee di evidenza nell'approccio di *weight of evidence* riguardano in particolare le proprietà biologiche del m.o., tra le quali il meccanismo d'azione (*MoA*) sull'organismo bersaglio risulta essere una delle informazioni chiave. In relazione al *MoA* potrebbero essere evitati studi non necessari (es. studi su alghe, piante acquatiche e piante terrestri in caso sia escluso un *MoA* di tipo erbicida). Al contrario, nel caso in cui il microrganismo abbia un *MoA* di tipo diretto (es. parassitismo), può essere opportuno condurre studi specifici su specie affini all'organismo bersaglio. A questo proposito, altre proprietà biologiche come la gamma degli ospiti, il ciclo di vita e le condizioni di crescita del microrganismo possono essere considerate come ulteriori linee di evidenza.

In caso di microrganismi naturalmente presenti in ambiente, si potrebbe anche considerare il livello di fondo naturale del m.o. e il suo comportamento nei comparti ambientali come possibile linea di evidenza. Tuttavia, questa informazione può essere usata solo in modo qualitativo e deve essere supportata da altre evidenze per poter escludere l'infettività e la patogenicità. Sono infatti necessari ulteriori approfondimenti, prima di poter utilizzare il livello di fondo naturale a livello quantitativo nella valutazione del rischio ambientale.

Un'altra possibilità per evitare studi specifici su un determinato ceppo è quella di

estrapolare i dati da altri ceppi o specie (*read-across*). Tuttavia, per supportare il *read-across* tra ceppi diversi sono necessarie giustificazioni robuste e informazioni sulla filogenetica da parte del richiedente, oltre che di *expert judgement* da parte dei valutatori.

Studi di infettività e patogenicità su organismi non bersaglio

Come già anticipato, gli studi di infettività e patogenicità con microrganismi non dovrebbero essere condotti seguendo le linee guida sviluppate per composti chimici. Generalmente, questi studi vengono infatti condotti in accordo con specifiche linee guida sviluppate dall'US EPA (OPPTS series 885, 1996) oppure in accordo con le linee guida OECD, le quali devono però essere adattate per poter investigare anche l'infettività e la patogenicità, oltre che la tossicità (acuta e/o cronica). Attualmente, sono state identificate diverse criticità in merito a come debbano essere condotti gli studi con i microrganismi. Per questo motivo, nel nuovo Regolamento UE 2022/1439 sono incluse diverse raccomandazioni a riguardo. Le principali sono riassunte di seguito:

- **Durata degli studi:** deve essere sufficiente a consentire l'incubazione, l'infezione e la manifestazione degli effetti avversi negli organismi non bersaglio, in funzione delle proprietà biologiche del m.o. Generalmente, deve essere di almeno 30 giorni ma in caso non sia fattibile si propone di prolungare lo studio fino al momento in cui la mortalità nei controlli non supera il *trigger* previsto nelle rispettive linee guida (es. 20% nel caso degli studi sulle api e artropodi non bersaglio).
- **Selezione delle concentrazioni/dosi da testare:** deve tenere conto della dose di applicazione e dell'esposizione che può derivare dagli usi previsti

e dal potenziale di proliferazione del m.o. nell'ambiente e nell'ospite. Testare concentrazioni troppo elevate negli studi su organismi acquatici può causare problemi di torbidità.

- **Selezione delle specie da testare:** deve basarsi sulle proprietà biologiche del m.o. (*MoA*, gamma degli ospiti, ecc) e sulle modalità di utilizzo del prodotto fitosanitario. Testare le specie standard raccomandate per i composti chimici potrebbe non essere adeguato in alcuni casi e per alcuni organismi (es. artropodi non bersaglio).
- **Trattamenti di controllo:** oltre al gruppo di controllo non trattato, devono essere inclusi controlli aggiuntivi, quali forme inattivate dei microrganismi vivi e/o controlli sterili con i filtrati/surnatanti. Questi controlli servono per discriminare effetti causati dalla potenziale patogenicità del m.o. da quelli causati dalla tossicità di metaboliti secondari e/o co-formulanti.

Valutazione del rischio su organismi non bersaglio esposti a pesticidi "biologici"

Per i prodotti fitosanitari a base chimica, la valutazione del rischio su organismi non bersaglio è basata sul confronto tra il dato di tossicità e il dato di esposizione ed è quindi di tipo quantitativo sia per i principi attivi e i suoi metaboliti principali che per il prodotto fitosanitario stesso (approcci e *trigger* definiti nella parte A del Regolamento UE n. 546/2011 [4]). Al contrario, in accordo con il Regolamento UE 2022/1441 [7], per i prodotti fitosanitari a base di microrganismi deve essere valutato sia il rischio associato al m.o. e al suo potenziale di infettività e patogenicità, attraverso approcci di tipo qualitativo (es. *weight of evidence* (WoE) e/o *margin of safety* (MoS)), sia il rischio associato ai potenziali effetti tossici dei "metaboliti potenzialmente pericolosi" prodotti dal m.o. e del prodotto

fitosanitario, seguendo gli stessi approcci previsti per i pesticidi “chimici”.

Per quanto riguarda i metaboliti, la linea guida SANCO/2020/12258 [8] fornisce un approccio *step-by-step* con l'obiettivo di descrivere come escludere o identificare i metaboliti potenzialmente pericolosi prodotti dal m.o. e come debba essere eseguita la valutazione del rischio per i metaboliti identificati come pericolosi.

Va inoltre sottolineato come la disponibilità di studi condotti direttamente con il prodotto fitosanitario stesso potrebbe coprire tutte queste richieste regolatorie, ovvero la patogenicità del m.o. e la tossicità dei metaboliti secondari e/o del prodotto stesso, evitando così ulteriori studi o approfondimenti non necessari.

Conclusioni

I microrganismi a differenza delle sostanze chimiche sono organismi viventi con specifiche proprietà biologiche inclusa la capacità di proliferare.

Rispondono e possono assumere comportamenti diversi a seconda delle condizioni ambientali a cui sono esposti (compresa la produzione di metaboliti).

Per quanto riguarda la valutazione dell'esposizione ambientale, allo stato attuale emerge la necessità di stabilire criteri e linee guida specifiche per questa tipologia di principi attivi, al fine di armonizzare il processo di valutazione.

Per quanto riguarda la valutazione degli effetti e la relativa valutazione del rischio per gli organismi non bersaglio, è altrettanto opportuno stabilire criteri per armonizzare la valutazione della potenziale infettività e

patogenicità dei microrganismi, in relazione alle informazioni e agli studi ecotossologici disponibili.

Bibliografia

1. *REGULATION (EC) No 1107/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.*
2. *COMMISSION REGULATION (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, 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.*
3. *COMMISSION REGULATION (EU) No 284/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for plant protection products, 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.*
4. *COMMISSION REGULATION (EU) No 546/2011 of 10 June 2011 implementing Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council as regards uniform principles for evaluation and authorisation of plant protection products.*
5. *COMMISSION REGULATION (EU) 2022/1439 of 31 August 2022 amending Regulation (EU) No 283/2013 as regards the information to be submitted for active substances and the specific data requirements for micro-organisms.*
6. *COMMISSION REGULATION (EU) 2022/1440 of 31 August 2022 amending Regulation (EU) No 284/2013 as regards the information to be submitted for plant protection products and the specific data requirements for plant protection products containing micro-organisms.*
7. *COMMISSION REGULATION (EU) 2022/1441 of 31 August 2022 amending Regulation (EU) No 546/2011 as regards specific uniform principles for evaluation and authorisation of plant protection products containing micro-organisms.*
8. *Guidance on the risk assessment of metabolites produced by microorganisms used as plant protection active substances (SANCO/2020/12258).*