

GIORNALE ITALIANO DI



TOSSICOLOGIA

Organo ufficiale della Società Italiana di Tossicologia - SITOX



Anno III n. 1 - Luglio 2024



SOCIETÀ ITALIANA DI TOSSICOLOGIA

Riconosciuta con DPR 16/05/1972, n. 376
Iscritta nel Registro delle Persone
Giuridiche della Prefettura di Milano n. 351
pag. 606 vol. II

SEDE LEGALE E OPERATIVA
Via Giovanni Pascoli, 3 – 20129 Milano
02.29520311

segreteria@sitox.org
www.sitox.org

CONSIGLIO DIRETTIVO

PRESIDENTE
Orazio Cantoni

PRESIDENTE ELETTO
Guido Mannaioni

PAST PRESIDENT
Corrado L. Galli

SEGRETARIO
Roberto Russo

CONSIGLIERI
Santa Cirmi
Fabiana Morroni
Valeria M. Petrolini
Emanuela Testai
Luca Tosti
Barbara Viviani

GIORNALE ITALIANO DI TOSSICOLOGIA

DIRETTORE RESPONSABILE
Sarah Vecchio

COMITATO DI REDAZIONE	
Salvatore Bianco	<i>Dispositivi Medici</i>
Luisa Borgia	<i>Bioetica</i>
Frida Bushati	<i>Comunicazione</i>
Orazio Cantoni	<i>Tossicologia Cellulare,</i> <i>Tossicologia Sperimentale</i>
Claudio Colosio	<i>Tossicologia Occupazionale</i>
Emanuela Corsini	<i>Interferenti Endocrini,</i> <i>Tossicologia Cellulare</i>
Ivano Eberini	<i>New Approach Methodology</i>
Corrado L. Galli	<i>Tossicologia Sperimentale,</i> <i>Emergenze Tossicologiche</i>
Costanza Rovida	<i>Tossicologia Regolatoria</i>
Marinella Trovato	<i>Sicurezza alimentare</i>
Sarah Vecchio	<i>Farmaco-Tossicologia Clinica,</i> <i>Medicina delle Dipendenze,</i> <i>Tossicologia di Genere</i>

SEGRETERIA DI REDAZIONE
M. Elena Scamoni

Pubblicazione iscritta nel
Registrato della Stampa,
Tribunale di Milano, N. 332 del 31.05.97

REALIZZAZIONE GRAFICO EDITORIALE
PUBLIEDIT Edizioni e Pubblicazioni s.a.s -
Cuneo/Roma.

Sommario

p. 1	Introduzione <i>Marina Marinovich, Corrado L. Galli</i>
p. 4	L'evoluzione dei biopesticidi in Italia e in Unione Europea <i>Pasquale Cavallaro, Daniele Scricciolo, Marco Nuti</i>
p. 9	Panoramica sul mercato dei biopesticidi: la visione dell'industria <i>Paolo Tassani</i>
p. 11	Biopesticidi: aspetti regolatori e panoramica in UE <i>Angelo Colagiorgi</i>
p. 19	Gli agenti di controllo microbiologici di funghi e batteri fitopatogeni: presente e futuro della difesa delle colture <i>Riccardo Bugiani</i>
p. 27	Agrofarmaci a base di microrganismi: aspetti tossicologici rilevanti per la valutazione della salute umana <i>Sara Lamperti</i>
p. 32	Pesticidi a base di microrganismi: aspetti di destino ambientale ed ecotossicologia <i>Mara Luini, Alessio Riva</i>
p. 38	Interazioni multitrofiche e bioprotezione sostenibile delle piante <i>Francesco Pennacchio</i>

È possibile inviare contributi per la pubblicazione sul Giornale Italiano di Tossicologia. I contributi potranno essere inviati direttamente alla Segreteria di Redazione del giornale (SITOX, segreteria@sitox.org) o ai referenti delle aree tematiche.

Il Comitato Editoriale si riserva di valutare tempi e modi per la pubblicazione dei contributi.

Introduzione

Marina Marinovich, Corrado L. Galli

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DISFeB), Università degli Studi di Milano

A seguito del Convegno organizzato da SITOX nel febbraio 2024 sul tema dei Pesticidi Biologici, svoltosi presso il Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari di Milano, il Comitato Editoriale del Giornale Italiano di Tossicologia ha scelto di dedicare un numero monografico a questo tema, argomento di notevole attualità e di rilevante impatto per la salute e la sicurezza di tutti i cittadini. L'evento ha voluto esaminare luci e ombre di questo nuovo mercato produttivo, sicuramente in costante evoluzione attraverso l'intervento di autorevoli relatori ai quali la nostra redazione ha richiesto di produrre i contributi riportati alla pagine seguenti.

Nonostante la regolamentazione europea per l'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari sia tra le più cautelative e richieda la presentazione di una documentazione molto approfondita, nell'immaginario collettivo le pratiche di difesa fitosanitaria sono ancora troppo spesso associate ad

un intervento molto impattante e potenzialmente pericoloso. Parallelamente ad un severo iter registrativo, gli Stati Membri hanno anche messo in atto azioni (piani d'azione nazionali per l'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari, previsti dalla direttiva 2009/128/CE, recepita in Italia con il decreto legislativo del 14 agosto 2012) mirate a ridurre i rischi e gli impatti derivanti dall'utilizzo dei prodotti fitosanitari ed implicitamente a ridurre l'uso di molecole di sintesi chimica, soprattutto favorendo un loro corretto impiego e stimolando l'utilizzo di approcci alternativi come i biopesticidi.

Il controllo biologico o biocontrollo (o lotta biologica) è un metodo per controllare i parassiti, siano essi animali nocivi come insetti e acari, erbe infestanti o agenti patogeni che colpiscono animali o piante utilizzando altri organismi. Si basa sulla predazione, sul parassitismo, sugli erbivori o su altri meccanismi naturali, ma in genere

comporta anche un ruolo attivo di gestione da parte dell'uomo. Molto spesso sfrutta i rapporti di antagonismo (in fitopatologia, si riferisce all'azione di qualsiasi organismo che sopprime o interferisce con la normale crescita e l'attività di un agente patogeno delle piante, come le parti principali di batteri o funghi fra gli organismi viventi per contenere le popolazioni di quelli dannosi all'uomo). Questa tecnica si è evoluta a fini agronomici e in genere si applica in campo agroalimentare, ma per estensione si può applicare in ogni contesto che richieda il controllo della dinamica di popolazione di un qualsiasi organismo.

L'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA) definisce un biopesticida come “un pesticida ottenuto da fonti biologiche, cioè da tossine presenti in natura - agenti biologici presenti in natura utilizzati per uccidere i parassiti provocando effetti biologici specifici anziché inducendo avvelenamento chimico”. Inoltre, l'EEA definisce un biopesticida come un pesticida in cui “il principio attivo è un virus, un fungo o un batterio o un prodotto naturale derivato da una fonte vegetale. Il meccanismo d'azione di un biopesticida si basa su effetti biologici specifici e non su specifiche molecole chimiche”.

Il termine “controllo biologico” fu usato per la prima volta da Harry Scott Smith alla riunione del 1919 del Pacific Slope Branch dell'American Association of Economic Entomologists, a Riverside, California. Tuttavia, la pratica è stata utilizzata in precedenza per secoli. Il primo rapporto sull'uso di una specie di insetti per controllare un insetto nocivo proviene da “Nanfang Caomu Zhuang” (circa 304 d.C.), in cui viene menzionato che “...il popolo Jiaozhi vende formiche e i loro nidi attaccati a ramoscelli che sembrano sottili buste di cotone... Senza tali formiche, gli agrumi del sud sarebbero gravemente danneggiati dagli insetti”.

Le tecniche di controllo biologico come le conosciamo oggi iniziarono ad emergere alla fine dell'Ottocento. Negli Stati Uniti, gli entomologi Riley e LeBaron iniziarono la ridistribuzione dei parassitoidi all'interno dei rispettivi Stati (Missouri e Illinois) per controllare i parassiti delle colture. Riley nel 1873 spedì in Francia degli acari predatori per aiutare a combattere la fillossera della vite. La prima importazione di una vespa parassitoide negli Stati Uniti fu quella relativa alla *Cotesia glomerata* nel 1883-1884, importata dall'Europa per controllare l'invasione della farfalla bianca del cavolo. Nel 1888-1889 la coccinella *Novius cardinalis* fu introdotto in California dall'Australia per controllare cocciniglia cotonosa, che era diventata un grosso problema per l'industria degli agrumi in California. A questi primi tentativi di successo seguì, agli inizi del '900, la scoperta e successiva commercializzazione del *Bacillus thuringiensis*.

Oltre ad un approccio “chemical free”, l'utilizzo di microrganismi e microalghe come biopesticidi può ridurre la domanda di energia e il consumo di fertilizzanti sintetici e ripristinare l'efficienza degli agroecosistemi. Questi organismi, se combinati con l'uso di innovazioni biotecniche come la tecnologia RNAi (dall'inglese interferenza dell'RNA), possono svolgere un ruolo significativo nella produzione di metaboliti secondari, biofertilizzanti, bioenergia e prodotti bioprocessati che sarebbero utili anche nel controllo dei parassiti.

La spinta del mercato verso i biopesticidi si basa su alcuni indubbi vantaggi:

- ridotta tossicità verso gli organismi che non rappresentano il *target* di azione (maggior selettività);
- ridotta persistenza nell'ambiente;
- bassa tossicità per i mammiferi (alcuni di essi presentano, se pur basso, un certo livello di tossicità);
- minor rischi per gli operatori legati al loro utilizzo;

- minor rischio di sviluppo di resistenze.

Fra gli svantaggi figurano sicuramente una ridotta *shelf-life*, un maggior costo per l'agricoltore e l'impossibilità, allo stato attuale, di garantire produzioni ottimali per soddisfare l'intero mercato.

L'evoluzione dei biopesticidi in Italia e in Unione Europea

Pasquale Cavallaro*, Daniele Scricciolo *, Marco Nuti**

* Ministero della Salute - Ex Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione - Ufficio 7, Sicurezza e Regolamentazione dei prodotti fitosanitari, Roma

** Institute of Crop Science, Sant'Anna School of Advanced Studies, Pisa

I biopesticidi non sono ad oggi un gruppo ben definito a livello di sostanze e prodotti fitosanitari nella legislazione della Unione Europea. Nella proposta di nuovo regolamento per l'Uso Sostenibile (SUR - *Sustainable Use of pesticides Regulation*) all'art.3, definizioni, il punto 23 (EC, 2022a) riporta:

“biological control means the control of organisms harmful to plants or plant products using natural means of biological origin or substances identical to them, such as micro-organisms, semiochemicals, extracts from plant products as defined in Article 3(6) of Regulation (EC) No 1107/2009, or invertebrate macro-organisms”. Gli agenti di controllo biologico sono composti da o contengono microrganismi (inclusi batteri e attinobatteri, microfunghi, lieviti, microalghe e virus), sostanze o estratti vegetali, feromoni ed hanno attività battericida, fungicida, erbicida, insetticida o nematocida. In Unione Europea vi sono attualmente 73 microrganismi registrati come sostanze

attive (EU, 2024), delle quali 24 hanno attività entomocida nei confronti di lepidotteri, coleotteri ed acari nocivi per le piante. Microfunghi entomocidi includono ceppi di *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella*, *Isaria* e *Lecanicillium*. Batteri e attinobatteri che controllano insetti fitopatogeni sono rappresentati da ceppi *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Pasteuria*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Yersinia*, *Saccharopolyspora* e *Streptomyces*. Tra i virus, i Baculovirus sono specie-specifici contro insetti masticatori principalmente Lepidotteri. Batteri fungicidi comprendono ceppi di *Bacillus velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*; attinobatteri fungicidi comprendono *Streptomyces lydicus*, *S. griseoviridis*, mentre microfunghi fungicidi comprendono *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila*, *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium catenulatum*, *Albifimbria verrucaria* (ex *Myrothecium verrucaria*), *Trichoderma asperellum*, *T. gamsii*, *T. harzianum*, *Ulocla-*

dium oudemansii.

I biopesticidi sono spesso sostanze “*low risk*” cioè a basso rischio (Leahy *et al.*, 2014) dovendo sempre soddisfare i criteri di approvazione. Il “Considerando” 17 del Reg.1107/2009 (EC, 2009) recita: «La valutazione di una sostanza attiva può rivelare che essa è considerevolmente meno rischiosa di altre sostanze. Per favorire l'inclusione di questo tipo di sostanze nei prodotti fitosanitari, è opportuno identificarle e facilitare l'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari che le contengono. Si dovrebbero prevedere incentivi per l'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari a basso rischio.»

Le sostanze attive che soddisfano i criteri di approvazione di cui all'articolo 4 del Regolamento 1107/2009 e i criteri per le sostanze a basso rischio di cui all'articolo 22 del Regolamento sono approvate come sostanze a basso rischio. Le sostanze per essere a basso rischio devono sempre rispondere ai criteri definiti nel Regolamento (UE) 1432/2017 del 7 agosto 2017 (UE, 2017) che modifica l'allegato II, punto 5 del regolamento (CE) n. 1107/2009. Risultano pertanto modificati i criteri di approvazione per le sostanze attive a basso rischio.

Anche i microrganismi possono ricadere in questa categoria. A tal proposito merita attenzione il regolamento (UE) 2022/1438 (EC, 2022b) che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i criteri specifici per l'approvazione delle sostanze attive che sono microrganismi. Tra questi ha particolare rilevanza la resistenza agli antibiotici, cioè la “capacità di un microrganismo di moltiplicarsi in presenza di una sostanza antimicrobica a concentrazioni terapeutiche rilevanti, che rendono la sostanza terapeuticamente inefficace. L'antibiotico-resistenza microbica può essere intrinseca oppure acquisita dal microrganismo” (EC, 2020; entrato in vigore dal 01/05/2021) ed è considerata un

fattore di rischio poiché vi è la possibilità del trasferimento di geni di resistenza dal microrganismo utilizzato per la protezione delle piante ad altri microrganismi patogeni/opportunisti, con potenziali ripercussioni sull'efficacia in campo (*effectiveness*) degli antimicrobici utilizzati nella medicina umana o veterinaria. Tale trasferimento ricade nel più ampio quadro dell'HGT (*Horizontal Gene Transfer*), meccanismo che i microrganismi utilizzano in natura per adattarsi alle (avverse) condizioni ambientali ed è particolarmente comune per i batteri. Lo stato delle conoscenze scientifiche sui microrganismi ha consentito di adottare un approccio migliore e più specifico ai fini della loro valutazione, basato sia sul loro meccanismo d'azione che sulle caratteristiche ecologiche delle rispettive specie nonché, se del caso, dei rispettivi ceppi di microrganismi. A tal proposito si ricorda che l'autorizzazione degli organismi attivi per i prodotti fitosanitari si effettua a livello di ceppo e non di specie. In ciò la legislazione UE dei fitosanitari si differenzia dai criteri di valutazione adottati dall'EFSA (*European Food Safety Authority*) in merito all'appartenenza del microrganismo alla categoria QPS (*Qualified Presumption of Safety*). Poiché l'avanzamento delle conoscenze consente di effettuare una valutazione dei rischi più mirata, esse devono essere prese in considerazione nel valutare i rischi che comportano le sostanze attive costituite da microrganismi ai fini della loro autorizzazione come prodotti per la protezione delle piante.

Inoltre, la pubblicazione dei Regolamenti 2022/1439 (UE, 2022a) e 2022/1440 (UE, 2022b) che modificano le norme sui dati da presentare per l'approvazione di una sostanza attiva microbiologica (Regolamento 283/2013; UE, 2013a) e dei relativi formulati (Regolamento 284/2013; UE, 2013b) rappresenta un forte passo in avanti per il settore. La Commissione Europea, inoltre, ha pubblicato il 12 ottobre 2023 un

aggiornamento (UE, 2013c) del documento SANCO/6895/2009. Questa revisione include i nuovi modelli del *draft Registration Report* (dRR) per i microrganismi.

I prodotti fitosanitari contenenti sostanze a basso rischio che soddisfano i requisiti di cui all'articolo 47 par.1 del Reg 1107/2009 sono autorizzati dagli Stati membri come prodotti fitosanitari a basso rischio. Lo Stato membro decide, entro centoventi giorni, se accogliere una domanda di autorizzazione di un prodotto fitosanitario a basso rischio. Nello specifico l'articolo recita: «Qualora tutte le sostanze attive contenute in un prodotto fitosanitario rientrino nella categoria delle sostanze attive a basso rischio di cui all'articolo 22, il prodotto è autorizzato come prodotto fitosanitario a basso rischio, purché dall'analisi del rischio non si rivelino necessarie *specifiche misure di mitigazione del rischio*».

Le misure di mitigazione del rischio sono definite “specifiche” perché affrontano uno scenario d'uso particolare in cui i rischi sono identificati (o si prevede che si verifichino) e in cui è necessario applicare una riduzione dell'esposizione per soddisfare gli obiettivi di protezione fissati dal quadro normativo al fine di garantire un uso sicuro quando i principi attivi sono approvati e/o i prodotti sono autorizzati. La dizione, in etichetta, “contiene microrganismi, il prodotto può provocare reazioni di sensibilizzazione” viene al momento considerata un avvertimento di carattere generale e non richiede misure specifiche di mitigazione. L'interesse degli agricoltori per i biopesticidi si basa sui benefici o vantaggi associati a tali prodotti:

- i biopesticidi sono generalmente intrinsecamente meno dannosi/tossici e

causano meno carico ambientale o inquinamento;

- sono progettati per un solo parassita specifico o, in alcuni casi, per pochi parassiti target a differenza delle sostanze chimiche che hanno un'attività ad ampio spettro;
- hanno una natura di controllo preventiva.

Uno dei punti di forza della maggior parte dei biopesticidi è che funzionano attraverso modalità di azione diverse rispetto ai prodotti chimici; infatti:

- Possono essere utilizzati fino al raccolto poiché di solito non hanno problemi di residui; per molti non è stato necessario fissare limiti massimi di residui (LMR);
- Gli eventi di resistenza al controllo biologico sono rari a differenza dei pesticidi chimici dove la resistenza è un problema serio.

Ovviamente, vi sono anche alcuni potenziali svantaggi:

- La specificità elevata può richiedere un'esatta identificazione del parassita/patogeno bersaglio;
- Lenta velocità d'azione, per cui i biopesticidi sono spesso inadatti se un'epidemia di parassiti è immediata e diventa una minaccia per i raccolti;
- La suscettibilità ai diversi fattori ambientali.

Il numero di sostanze approvate contenute nei biopesticidi sono aumentate nel tempo (Fig. 1).

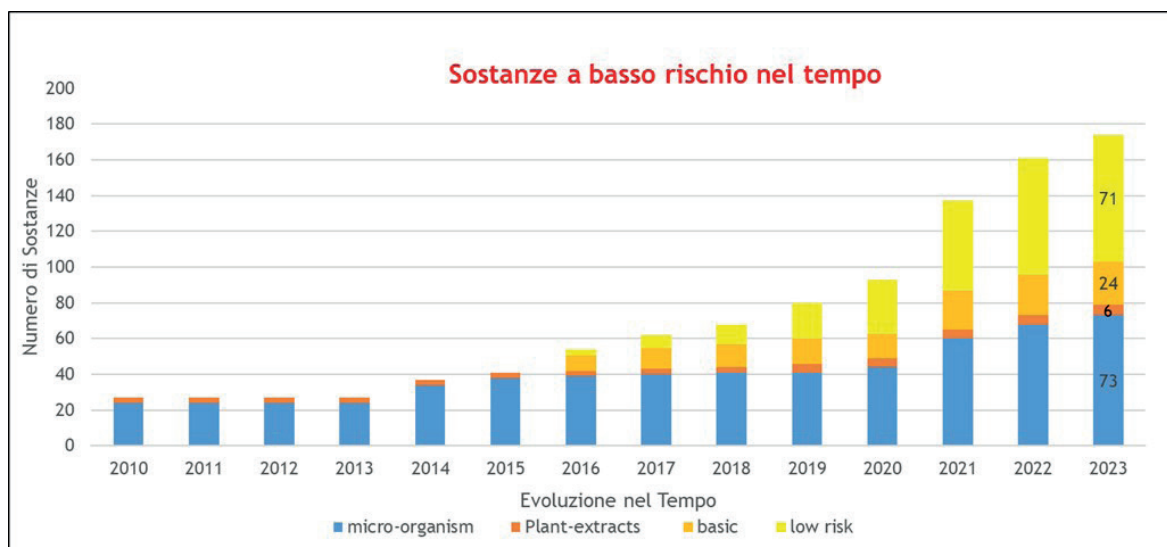


Fig. 1 Sostanze a basso rischio nel tempo



Fig. 2 Prodotti registrati in Italia

In Italia sono registrati 2900 prodotti di cui 125 a base di microrganismi, 12 “low risk” e

66 feromoni (Fig. 2). Da tenere in considerazione anche l'andamento nazionale delle richieste di autorizzazione secondo art. 53 del Reg.1107/2009.

Nel corso del 2023 sono pervenute da parte dei portatori di interesse 100 richieste di cui 74 relative a sostanze chimiche, contenenti anche sostanze attive non approvate, e 26 relative a microrganismi, estratti di piante e feromoni (Fig. 3). Facendo un controllo con i dati degli anni precedenti, si nota un forte aumento di richieste in emergenza. Tale aumento si nota anche per i biopesticidi.

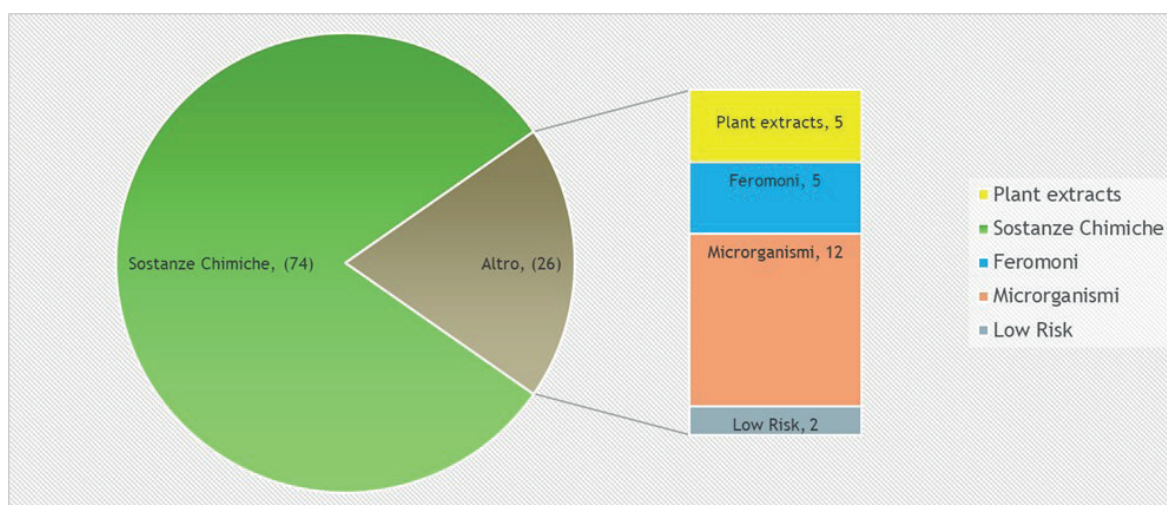


Fig. 3 Sostanze richieste dai portatori di interesse nelle autorizzazioni di emergenza anno 2023

Concludendo, in Italia ed in Europa sono stati registrati decisi passi in avanti per la registrazione di pesticidi e biopesticidi, soprattutto per la individuazione sempre più precisa dei criteri di valutazione dell'efficacia e del rischio tossicologico ed ecotossicologico, del destino ambientale e dei residui. Sono al momento in fase di ulteriore definizione la valutazione dei test di sensibilizzazione per i *microbial*, della eventuale necessità di frasi rischio specifiche per le api, dell'uso di consorzi microbici, in accordo con il principio della legislazione "science-based". Sono alle fasi di approvazione finale e pubblicazione le "*Explanatory notes for the authorisation of plant protection products containing an active substance that is a micro-organism according to Reg. (EC) No 1107/2009*".

Bibliografia

1. EC (2009) Regolamento n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE - Gazzetta Ufficiale UE, L 309 del 24 novembre 2009.
2. EC (2020), Guidance on the approval and low-risk criteria linked to "antimicrobial resistance" applicable to microorganisms used for plant protection in accordance with regulation (EC) no 1107/2009. SANTE/2020/12260, https://ec.europa.eu/food/system/files/2020-11/pesticides_ppp_app-proc_guide_180652_microorganism-amr_202011.pdf
3. EC (2022a) Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on the sustainable use of plant protection products and amending Regulation (EU) 2021/2115. Brussels, 22.6.2022 COM(2022) 305 final 2022/0196 (COD).
4. EC (2022b) Regolamento (UE) 2022/1438 del 31 agosto 2022 che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i criteri specifici per l'approvazione delle sostanze attive che sono microrganismi. Gazzetta Ufficiale UE, L227/2.
5. EU (2023) Pesticide-Database https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en
6. Leahy, J., Mendelsohn, M., Kough, J., Jones, R., & Berckes, N. (2014). Biopesticide Oversight and Registration at the U.S. Environmental Protection Agency. In *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities* (Vol. 1172, pp. 3-18): American Chemical Society.
7. OECD (2017) Report of the 7th Biopesticides Steering Group Seminar on Sensitisation Potential of Micro-Organisms. Series on Pesticides No. 91. ENV/JM/MONO (2017) 8.
8. UE (2017) Regolamento 2017/1432 Della Commissione del 7 agosto 2017 che modifica il Regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari per quanto riguarda i criteri per l'approvazione delle sostanze attive a basso rischio. Gazzetta Ufficiale UE L 205/59 del 8.8.2017.
9. UE (2022a) Regolamento 2022/1439 della Commissione del 31 agosto 2022 che modifica il regolamento (UE) n. 283/2013 per quanto riguarda le informazioni da trasmettere per le sostanze attive e i requisiti specifici relativi ai dati applicabili ai microrganismi. Gazzetta Ufficiale UE L 227/8 del 01.09.2022.
10. UE (2022b) Regolamento 2022/1440 della Commissione del 31 agosto 2022 che modifica il regolamento (UE) n. 284/2013 per quanto riguarda le informazioni da trasmettere per le sostanze attive e i requisiti specifici relativi ai dati applicabili ai microrganismi. Gazzetta Ufficiale UE L 227/38 del 01.09.2022.
11. UE (2013a) Regolamento n. 283/2013 della Commissione, del 1 marzo 2013, che stabilisce i requisiti relativi ai dati applicabili alle sostanze attive, conformemente al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari (Gazzetta Ufficiale UE, L 93 del 3.4.2013, pag. 1).
12. UE (2013b) Regolamento (UE) n. 284/2013 della Commissione, del 1 marzo 2013, che stabilisce i requisiti relativi ai dati applicabili ai prodotti fitosanitari, conformemente al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari (Gazzetta Ufficiale UE, L 93 del 3.4.2013, pag. 85).
13. UE (2013c) Technical guidelines on the presentation and evaluation of plant protection product dossiers in the format of a (draft) Registration Report, updating the document SANCO/6895/2009. 12 October 2023.

Panoramica sul mercato dei biopesticidi: la visione dell'industria

Paolo Tassani

Federchimica Agrofarma

Nel 2020 il mercato dei “biopesticidi” a livello mondiale raggiungeva il valore di € 3,5 miliardi a fronte di quello degli agrofarmaci convenzionali valutabile in € 62,5 miliardi. In futuro si prevede un’ulteriore crescita dell’intero mercato degli agrofarmaci che dovrebbe raggiungere entro il 2031 un valore di € 175 miliardi e dei biopesticidi che si preveda raggiunga un valore di € 17,1 miliardi. Anche il mercato italiano dei biopesticidi è in crescita considerando che nel 2022 il valore era superiore a € 215 milioni e che entro il 2027 dovrebbe raggiungere un valore di circa € 500 milioni.

In Italia, l'introduzione di nuove tecnologie sempre più avanzate ha permesso agli agricoltori di utilizzare meglio i prodotti. Ciò è confermato dall'evoluzione delle vendite di agrofarmaci, in netta contrazione negli ultimi 10 anni con una riduzione complessiva del 12%. Inoltre, si evidenzia che le riduzioni delle vendite di prodotti sono ancora più consistenti quando si considerano i volumi di principi attivi in essi contenuti eviden-

ziando un calo del 17% tra il triennio 2019-21 e quello 2011-13.

Di tendenza opposta, invece, è l'evoluzione delle vendite degli agrofarmaci utilizzabili anche in agricoltura biologica, che ha evidenziato una crescita importante, +102% nello stesso periodo. Ciò dimostra come tali strumenti vengano impiegati non solo nell'agricoltura biologica, ma, largamente, anche in quella integrata, segno evidente di come l'obiettivo ultimo delle imprese agricole italiane sia quello di utilizzare al meglio, combinando e integrando tra loro, tutti gli strumenti a disposizione, portando avanti una visione di complementarità fra tutte le metodologie a disposizione.

Negli ultimi vent'anni la continua riduzione di sostanze attive disponibili in Europa non è stata compensata dallo sviluppo di nuove sostanze alla medesima velocità. Le maggiori difficoltà nell'introdurre sul mercato biopesticidi innovativi, utili anche per consentire agli agricoltori di far fronte alle

avversità emergenti, sono rappresentate dall'assenza di una definizione normativa che ne faciliti l'autorizzazione ed eviti la confusione tra le tipologie di prodotti con utilizzi differenti, spesso a base delle medesime sostanze attive (il cosiddetto "dual use"). Per superare tali limiti e favorire la ricerca di questi prodotti è necessario adeguare le norme esistenti, garantendo tempi certi di autorizzazione e sviluppando linee guida e test dedicati, oltre ad assicurare che i valutatori abbiano competenze specifiche.

Ulteriori ambiti di miglioramento per favorire la diffusione riguardano una struttura adeguata nella filiera per il trasporto e lo stoccaggio, nonché una formazione specifica rivolta agli agricoltori per un corretto impiego e posizionamento tecnico dei prodotti, i quali vanno spesso utilizzati in trattamenti preventivi e che posseggono un'elevata specificità per gli organismi bersaglio.

Proprio in questa direzione si collocano gli investimenti dell'industria che si concentrano non solo nella ricerca e sviluppo di nuovi agrofarmaci, siano essi di sintesi o di origine naturale, ma anche in tecnologie digitali, nelle nuove tecniche di miglioramento genetico e nella formazione che, in un contesto così complesso e variegato, riveste un ruolo particolarmente rilevante, contribuendo in modo significativo al raggiungimento degli obiettivi di sostenibilità che ci si è posti a livello europeo.

In tale contesto, l'industria si è impegnata a investire € 4 miliardi entro il 2030 nella ricerca e sviluppo di soluzioni innovative come i biopesticidi, dei quali 1,75 miliardi sono già stati investiti tra il 2017 e il 2021.

Infine, per profilare un contesto normativo adeguato e stimolare la ricerca e gli investimenti in prodotti innovativi da mettere a disposizione degli agricoltori è fondamentale ed auspicabile il dialogo tra tutti gli attori del comparto.

Biopesticidi: aspetti regolatori e panoramica in UE

Angelo Colagiorgi

Pesticides Peer Review Unit, EFSA

Introduzione

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) è stata istituita nel 2002 dal Regolamento (CE) n. 178/2002 con lo scopo di fungere da fonte imparziale di consulenze scientifiche per i gestori del rischio e di svolgere attività di comunicazione sui rischi associati alla filiera alimentare. Le aree di cui il lavoro dell'EFSA si occupa sono molteplici, tra cui benessere animale, malattie zoonotiche, nutrizione e prodotti fitosanitari.

I prodotti fitosanitari, comunemente chiamati pesticidi, vengono utilizzati per il mantenimento della buona salute delle colture e per prevenire o combattere l'insorgenza di malattie e infestazioni nei confronti delle stesse. Ogni prodotto fitosanitario contiene almeno una sostanza attiva che ne consente di svolgere la propria azione. Prima che una sostanza attiva possa essere utilizzata all'interno di un prodotto fito-

sanitario nell'Unione Europea è necessario che questa sia soggetta ad un approfondita valutazione del rischio che ne deriva dal suo utilizzo. L'esito della valutazione viene fornito alla Commissione Europea, che si avvarrà di tale strumento per decidere se procedere o meno con l'approvazione di tale sostanza a livello comunitario.

Una corposa legislazione UE disciplina la commercializzazione e l'utilizzo dei prodotti fitosanitari e dei loro residui negli alimenti, con un particolare riferimento al Regolamento (CE) n. 1107/2009, che ha l'obiettivo di assicurare un alto livello di protezione per la salute umana, animale e dell'ambiente e, al contempo, di salvaguardare la competitività dell'agricoltura della comunità europea. Il ruolo dell'EFSA all'interno di questo processo è quello di condurre una revisione paritetica (*peer review*) della valutazione dei rischi associati all'uso delle sostanze attive nei confronti dell'uomo, degli animali e dell'ambiente (inclusi gli effetti sugli organismi non bersaglio del

pesticida), in stretta collaborazione con gli Stati Membri dell'UE. Per ogni sostanza attiva uno degli Stati Membri dell'UE funge da stato membro relatore (*Rapporteur Member State*, RMS), con il compito di redigere una relazione iniziale di valutazione (*Draft Assessment Report*, DAR) sulla base delle informazioni sottomesse dal/i richiedente/i all'interno di un dossier di registrazione, che contiene informazioni sia sulla sostanza attiva che su uno o più prodotti fitosanitari che la contengono. La relazione iniziale di valutazione redatta dal RMS è soggetta al processo di *peer review*, che prevede diverse fasi quali la raccolta e valutazione di commenti, l'eventuale richiesta di ulteriori dati e informazioni al richiedente e, se necessario, la discussione tra esperti. Alla fine del processo di *peer review*, EFSA rilascia un documento finale (conclusione) circa la valutazione della sostanza attiva, sulla base della quale la Commissione Europea, insieme agli Stati Membri, potrà decidere se includere o meno la sostanza nell'elenco delle sostanze attive autorizzate nell'Unione. Poiché l'approvazione di una sostanza attiva è limitata nel tempo, questa può essere soggetta al rinnovo, previa sottomissione di un nuovo dossier da parte del/dei richiedente/i e in base alle conclusioni originate da un nuovo processo di *peer review*, in linea con i Regolamenti di esecuzione (EU) n. 844/2012 o n. 2020/1740 della Commissione.

A completamento di tale processo, nell'ambito del sistema in vigore in Europa di valutazione dei pesticidi a due livelli, gli Stati membri dell'Unione hanno il compito di valutare e autorizzare i prodotti fitosanitari (contenenti le sostanze attive approvate dalla Commissione) a livello nazionale.

Sostanze attive di natura microbica

Le sostanze attive oggetto di valutazione del rischio e successiva approvazione a livello Europeo possono essere di natura chimica oppure microrganismi. Il Regola-

mento (CE) n. 1107/2009 definisce microrganismo "qualsiasi entità microbiologica, compresi i funghi e i virus inferiori, cellulari o non cellulari, capaci di replicarsi o di trasferire materiale genetico" (cf. art. 3). Definisce, inoltre, i criteri di approvazione di tali sostanze secondo i quali i microrganismi che sono infettivi o patogeni nei confronti dell'uomo o di altri vertebrati non possono essere approvati. Al momento in cui si scrive questo articolo, sono 71 le sostanze attive microbiche approvate per l'utilizzo in prodotti fitosanitari in UE (Commissione Europea, 2024a).

Mentre il quadro normativo che definisce il processo di *peer review* è lo stesso sia per le sostanze chimiche che per quelle microbiche, i requisiti in maniera di dati e i principi uniformi di valutazione differiscono per le due tipologie di sostanze. In particolare, i regolamenti (UE) della Commissione n. 283/2013 e n. 284/2013, che stabiliscono i requisiti relativi ai dati applicabili, rispettivamente, alle sostanze attive e ai prodotti fitosanitari, si dividono in parte A (applicabile alle sostanze chimiche) e parte B (applicabile ai microrganismi). Un lungo e accurato lavoro di revisione è stato portato recentemente a termine dalla Commissione Europea in collaborazione con i diversi Stati Membri con lo scopo di adeguare la parte B di entrambi i documenti e renderla più in linea con le caratteristiche dei microrganismi. Infatti, la versione precedente dei due regolamenti prevedeva una serie di requisiti relativi ai dati applicabili ai microrganismi basati su principi più simili a quelli applicabili alle sostanze chimiche. Tale lavoro di revisione è culminato nell'agosto del 2022 con la pubblicazione del Regolamento (UE) 2022/1439 della Commissione che modifica il regolamento (UE) n. 283/2013 per quanto riguarda le informazioni da trasmettere per le sostanze attive e i requisiti specifici relativi ai dati applicabili ai microrganismi, e del Regolamento (UE) 2022/1440 della Commissione

del 31 agosto 2022 che modifica il regolamento (UE) n. 284/2013 per quanto riguarda le informazioni da trasmettere per i prodotti fitosanitari e i requisiti specifici relativi ai dati applicabili ai prodotti fitosanitari contenenti microrganismi. A completamento dell'attività di revisione, sono stati aggiornati anche i criteri specifici per l'approvazione delle sostanze attive che sono microrganismi (Regolamento (UE) 2022/1438), e i principi uniformi specifici per la valutazione e l'autorizzazione dei prodotti fitosanitari contenenti microrganismi (Regolamento (UE) 2022/1441).

Valutazione del rischio di microrganismi usati come sostanze attive in prodotti fitosanitari

Molti sono gli aspetti da esaminare durante il processo di valutazione del rischio di una sostanza attiva di natura microbica, legati a determinate caratteristiche che contraddistinguono i microrganismi dalle sostanze chimiche. A differenza da queste, infatti, in quanto esseri viventi i microrganismi possono moltiplicarsi, diffondersi e potenzialmente adattarsi geneticamente; inoltre, potrebbero avere la capacità di produrre sostanze tossiche e potenzialmente pericolose.

Il processo di *peer review* ha come scopo quello di effettuare una attenta analisi della valutazione del rischio legato a questi ed altri aspetti. Poiché queste caratteristiche possono variare anche all'interno della stessa specie o sottospecie, è necessario condurre il processo di valutazione del rischio a livello di ceppo (o isolato, nel caso di virus). In particolare, sono necessari dati ceppo/isolato-specifici per valutare alcuni aspetti fondamentali, quali il meccanismo di azione (che potrebbe essere legato a determinati metaboliti prodotti a livello di ceppo), la possibile produzione di tossine e la potenziale patogenicità nei confronti delle piante, tenendo conto che alcune specie includono sia ceppi patogeni che

non patogeni nei confronti delle piante, come nel caso di *Fusarium oxysporum* (Iida *et al.*, 2022). Ciononostante, è fondamentale anche tenere conto della specie o del genere di appartenenza e delle caratteristiche tipiche di tale specie/genere. Nei casi in cui, ad esempio, le conoscenze scientifiche riguardo alla specie di appartenenza mostrano come questa sia relativamente omogenea e ben studiata, gli esperti possono decidere che alcuni requisiti di dati possono essere gestiti a livello di specie piuttosto che di ceppo. Inoltre, ogni anno, EFSA si occupa di pubblicare una lista di microrganismi a cui è stato attribuito uno stato di "Presunzione Qualificata di Sicurezza" (*Qualified Presumption of Safety*, QPS), in esito a una valutazione preliminare di EFSA che studia la sicurezza per l'uomo, gli animali e l'ambiente (EFSA, 2024). Durante tale processo gli esperti valutano l'identità tassonomica del microrganismo, il relativo *corpus* di conoscenze e i potenziali problemi di sicurezza. Se la sostanza attiva microbica sotto valutazione appartiene ad una specie inclusa nella lista QPS, la valutazione del rischio può essere più lineare e facilitata, pur tenendo conto che la valutazione QPS viene condotta separatamente e indipendentemente dalla valutazione di una richiesta di autorizzazione all'immissione in commercio di un prodotto soggetto a regolamentazione. Pertanto un inserimento nella lista non si traduce necessariamente in un'autorizzazione alla commercializzazione.

Aspetti ricorrenti nella *peer review* dei microrganismi

Nel processo di valutazione del rischio e di *peer review* di una sostanza attiva microbica è importante tenere conto di una serie di aspetti chiave.

Per cominciare, è fondamentale stabilire in maniera chiara l'identità di un microrganismo attraverso due informazioni: tassonomia e filogenesi. L'identità tassonomica

consente l'identificazione del ceppo/isolato e l'inquadramento a livello tassonomico (specie/genere/famiglia) di appartenenza. Cambiamenti anche minimi nella tassonomia di un microrganismo in esame possono avere un impatto importante nella valutazione del rischio dello stesso. Per esempio, se nel corso della *peer review* - in seguito a un'evoluzione delle conoscenze scientifiche - si verifica un cambio nell'identità tassonomica (es. nel genere) attribuita al ceppo in esame, questo può portare a una mancata corrispondenza tra la nuova identità e quella utilizzata dal richiedente per condurre (e includere nel dossier) un'accurata ricerca bibliografica atta a supportare determinate valutazioni alla luce di evidenze scientifiche, che viene spesso effettuata proprio a livello di specie o di genere.

L'analisi filogenetica, che studia le connessioni e i rapporti evolutivi tra le diverse forme viventi, consente invece di verificare l'esistenza di una relazione evolutiva tra la sostanza microbica in esame e altri microrganismi patogeni. Con l'introduzione del nuovo quadro normativo nell'agosto del 2022, è diventato necessario da parte del richiedente fornire nel dossier un albero filogenetico contenente il microrganismo in esame.

Un requisito fondamentale perché un microrganismo possa essere approvato come sostanza attiva in un fitofarmaco è l'identificazione di uno o più metodi analitici in grado di identificare in maniera univoca il microrganismo a livello di ceppo/isolato. Tali metodi sono, anch'essi, soggetti a una valutazione per verificare che siano realmente in grado di fornire un'identificazione univoca della sostanza e distinguerla da altri microrganismi della stessa specie e di specie diverse.

Un ultimo, ma non per importanza, tipo di informazione utile ai fini dell'identificazione dell'identità del microrganismo è rap-

presentata dal genoma dello stesso, ottenuto attraverso tecniche di sequenziamento dell'intero genoma (*whole genome sequencing*, WGS). La sottomissione di dati ottenuti con WGS è, in linea di principio, non obbligatoria, in quanto non richiesta in maniera specifica dai requisiti in materia di dati. Tuttavia, l'utilizzo di tale tecnica consente di identificare in maniera specifica il microrganismo grazie a una panoramica ad alta risoluzione dell'intero genoma, in ogni singola base. Inoltre, un'analisi di tipo WGS è fondamentale per escludere nei batteri la presenza e/o la trasferibilità di geni di resistenza antimicrobica, con potenziali ripercussioni sull'efficacia sul campo degli antimicrobici utilizzati nella medicina umana o veterinaria, ma anche per dimostrare l'assenza di geni codificanti per tossine o metaboliti potenzialmente pericolosi in ceppi appartenenti a specie note per essere in grado di produrre tali sostanze. Proprio per questo il Regolamento (UE) n. 283/2013 della Commissione, così come modificato dal Regolamento (UE) n. 2022/1439 della Commissione, richiede l'utilizzo di metodi genomici appropriati al fine di evidenziare l'assenza di geni necessari per la produzione di metaboliti potenzialmente pericolosi per dimostrare l'assenza di tale pericolo, menzionando in maniera specifica l'utilizzo del WGS (cf. Art. 2.8).

Un altro aspetto fondamentale nella valutazione del rischio di una sostanza microbica da utilizzare in un fitofarmaco è rappresentato dagli effetti sulla salute umana e animale legati al suo utilizzo, che comporta dei potenziali pericoli differenti da quelli derivanti da una sostanza chimica. Infatti, in quanto essere vivente un microrganismo è in grado di crescere e moltiplicare, per cui è necessario escludere che possa avere il potenziale di causare infezione ed essere patogeno nei confronti dell'uomo, oltre a produrre metaboliti potenzialmente pericolosi. Questo prevede la valutazione di tutti gli effetti avversi riscontrati nel

corso delle indagini e dell'eventuale meccanismo implicato in tali effetti, anche alla luce delle proprietà biologiche del microrganismo stesso. È necessario, infatti, che il richiedente l'autorizzazione sottometta all'interno del dossier di registrazione una serie di studi intesi a determinare la potenziale infettività e patogenicità del microrganismo nei confronti degli esseri umani, salvo nel caso in cui il richiedente dimostri, applicando un approccio basato sulla forza probante dei dati, che non sono previsti effetti di questo tipo. Oltretutto, un dossier deve contenere informazioni (ad esempio letteratura scientifica, risultati di studi sperimentali) sulla caratterizzazione tossicologica dei metaboliti e sui pericoli individuati per la salute umana e animale ad essi associati, raccolte o prodotte allo scopo di identificare i metaboliti potenzialmente pericolosi o di escluderne la potenziale pericolosità.

Per quanto riguarda la caratterizzazione tossicologica di un microrganismo, diversamente che per una sostanza chimica, esistono alcune limitazioni di tipo metodologico, ovvero la mancanza di metodi di test appropriati e validati. In particolare, le linee guida dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) per la conduzione di test tossicologici sugli animali sono state concepite per le sostanze chimiche, per le quali sono tipicamente utilizzate, e non tengono conto delle proprietà uniche dei microrganismi. Si aggiunge poi un altro grado di incertezza legato all'utilizzo di questi test con sostanze microbiche: non è sempre possibile escludere che la mancanza di effetti su un modello animale usato nel test di laboratorio si traduca in mancanza di effetti nell'uomo per via sia della gamma di ospiti del microrganismo, che può essere ristretta, che delle differenze esistenti tra l'uomo e gli animali da laboratorio (come il diverso sistema immunitario e il differente microbioma).

Un altro aspetto importante nella valutazione del rischio dei microrganismi è legato alla loro potenziale capacità di causare reazioni di sensibilizzazione (cutanea e/o inalatoria) e altri tipi di effetti, come risposte infiammatorie in seguito ad esposizione per via inalatoria. Tali effetti possono, in molti casi, essere legati non al microrganismo in sé, ma alla presenza di strutture proteiche e/o ai metaboliti secondari. Poiché anche in questo caso mancano test di metodo validati (e appropriati) per effettuare test di sensibilizzazione su modelli animali, e in considerazione della loro natura proteica, tutti i microrganismi devono essere considerati come potenziali agenti sensibilizzanti fino a quando tali test non saranno disponibili (cf. punto 2.5.1.4 del Regolamento (UE) n. 546/2011). A tal riguardo, l'invio di informazioni riguardanti effetti legati all'esposizione a tali sostanze (per esempio negli impianti di produzione) quali la presenza (o assenza) di casi di risposte allergiche da parte dei lavoratori esposti alle stesse può fornire informazioni utili per la valutazione di questo tipo di rischio.

Queste problematiche sono riconosciute a livello internazionale, tanto che l'OCSE, da pochi anni, ha intrapreso una serie di attività a riguardo, a partire da una Conferenza nel 2022 avente come tema l'innovazione dei test sui pesticidi microbici, in cui è stata fornita una panoramica delle innovazioni critiche necessarie nei test di pericolosità per i pesticidi microbici, con lo scopo di sviluppare un piano di lavoro per migliorare le linee guida attualmente esistenti (OCSE, 2022).

Valutazione del rischio derivante dai metaboliti secondari/tossine

I microrganismi (eccezion fatta per i virus) hanno la potenzialità di produrre una serie di metaboliti secondari. La produzione di molti di questi è comune a molti ceppi della stessa specie, ma, come prima accenna-

to, possono anche esistere differenze intra specie. Il numero di metaboliti secondari prodotti da un microrganismo può essere enorme, e di questi se ne conosce solo una parte. Inoltre, la produzione di un metabolita non è costitutiva, ma può dipendere da determinate condizioni ambientali.

Alcuni dei metaboliti secondari prodotti dal microrganismo possono essere potenzialmente pericolosi per la salute umana e/o animale. La presenza di questi metaboliti nel prodotto rappresenta un aspetto importante nel processo di valutazione del rischio di una sostanza attiva microbica, per cui è necessario che il richiedente identifichi ed elenchi all'interno del dossier i metaboliti potenzialmente pericolosi, sulla base della letteratura scientifica o dell'osservazione della tossicità, dell'ecotossicità o dell'attività antimicrobica negli studi condotti sul microrganismo o su ceppi strettamente correlati dal punto di vista tassonomico.

Nel quadro della valutazione del rischio dei metaboliti potenzialmente pericolosi è necessario tenere in considerazione aspetti sia qualitativi (per esempio la presenza/assenza del metabolita nella sostanza attiva fabbricata o nel prodotto) che quantitativi (concentrazione del metabolita nella sostanza attiva fabbricata o nel prodotto). È importante, per esempio, sapere se tali metaboliti si formano durante la fase di fabbricazione della sostanza attiva e/o del prodotto fitosanitario durante il processo di produzione e, ancora, se tali metaboliti finiscono sulle colture durante l'applicazione del prodotto o vengono prodotti nell'ambiente (*in situ*) e assorbiti dalle piante.

Nell'ambito della *peer review* di diversi dossier sottomessi per l'approvazione di sostanze attive microbiche è emerso come i dati forniti dai richiedenti siano risultati insufficienti per poter completare la valu-

tazione dei rischi nei confronti dei consumatori derivanti da tutti gli aspetti sopra riportati, e/o come vi fosse un'insufficienza di informazioni utili alla caratterizzazione dei metaboliti da un punto di vista tossicologico (per esempio informazioni sulla (geno)tossicità di questi o su potenziali effetti nei confronti di organismi non bersaglio).

Il set di dati riguardanti i metaboliti secondari necessari per la valutazione del rischio sono ben definiti nella parte B del Regolamento (UE) n. 283/2013, così come lo sono i principi uniformi di valutazione degli stessi nel Regolamento (CE) 546/2011. Ciononostante, è emersa la necessità di fornire delle linee guida per l'interpretazione accurata e omogenea di tali disposizioni, che come menzionato sopra ha portato alla mancata finalizzazione della valutazione del rischio per queste sostanze in molti casi. Per superare a queste problematiche, al nuovo quadro normativo da poco in vigore si è aggiunto il rilascio di un documento guida per la valutazione del rischio dei metaboliti potenzialmente pericolosi, elaborato dalla Commissione Europea con la collaborazione degli Stati Membri (Commissione Europea, 2024b). Questa guida si propone di fornire ai richiedenti un approccio pratico su come applicare le informazioni richieste nel regolamento dedicato, assicurandosi che questi forniscano tutti i dati disponibili sui metaboliti, inclusa qualsiasi indicazione di effetti pericolosi da parte di qualsiasi di questi metaboliti e che – in specifici casi – provvedano alla generazione di nuovi dati sperimentali atti a consentire una valutazione del rischio appropriata.

Un nuovo orizzonte

La riduzione del 50% dell'uso e del rischio derivante da pesticidi chimici entro il 2030 è uno degli obiettivi fissati nel maggio 2020 nell'ambito della strategia *farm-to-fork* e nel contesto dell'*European Green Deal*. Affinché questo sia possibile, è ne-

cessario mettere in atto tutti gli strumenti che possano consentire lo sviluppo di valide alternative e in questo senso i biopesticidi (e i microrganismi, in particolare) rappresentano uno degli strumenti alternativi più interessanti a disposizione. L'importante lavoro di revisione del quadro normativo riguardante queste sostanze, condotto negli ultimi anni ed introdotto nel 2022, è stato guidato da alcuni principi fondamentali, a cominciare da un nuovo approccio scientifico mirato, avente l'obiettivo di differenziare il più possibile l'approccio tra una sostanza chimica e una microbiologica sulla base delle importanti differenze esistenti tra le stesse. La valutazione del rischio è stata ripensata sulla base delle proprietà biologiche ed ecologiche di ciascun microrganismo, alla luce delle esperienze di valutazione pregresse, dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche e con l'utilizzo di un approccio basato sul peso delle prove. I nuovi requisiti in maniera di dati sono stati riformulati sulla base di un approccio "informazione necessaria" e non "informazione interessante", basandosi su un approccio a livelli che prevede la necessità di fornire alcune informazioni solo al verificarsi di determinate condizioni.

L'obiettivo è quello di aumentare sia la qualità delle valutazioni del rischio delle sostanze microbiche, sia la velocità del processo della *peer review*, così da consentire una diminuzione delle tempistiche necessarie per l'approvazione di nuove sostanze attive microbiche per l'utilizzo in fitofarmaci e per il rinnovo dell'approvazione di sostanze contenute in prodotti già in commercio.

Nota

Le posizioni e opinioni presentate in questo articolo sono quelle del solo autore e non necessariamente rappresentano le opinioni/la posizione ufficiale o i lavori scientifici di EFSA.

Bibliografia

1. Commissione Europea, 2024b. *Guidance on the risk assessment of metabolites produced by microorganisms used as plant protection active substances in accordance with article 77 of Regulation (EC) No 1107/2009*. SANCO/2020/12258 rev 1. 21 Marzo 2024.
2. OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico), 2022. *OECD Conference on Innovating Microbial Pesticide Testing*, 13-16 Settembre 2022, Parigi. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/conferenceoninnovatingmicrobialpesticidetesting.htm>
3. Iida, Y., Ogata, A., Kanda, H., Nishi, O., Sushida, H., Higashi, Y., & Tsuge, T. (2022). *Biocontrol Activity of Nonpathogenic Strains of Fusarium oxysporum: Colonization on the Root Surface to Overcome Nutritional Competition*. *Frontiers in microbiology*, 13, 826677. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.826677>
4. Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. GU L 31 del 1.2.2002, pagg. 1-24.
5. Regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE. GU L 309 del 24.11.2009, pagg. 1-50.
6. Regolamento di esecuzione (UE) n. 844/2012 della Commissione, del 18 settembre 2012, che stabilisce le norme necessarie per l'attuazione della procedura di rinnovo dell'approvazione delle sostanze attive a norma del regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari GU L 252 del 19.9.2012, pagg. 26-32.
7. Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1740 della Commissione del 20 novembre 2020 che stabilisce le disposizioni necessarie per l'attuazione della procedura di rinnovo dell'approvazione delle sostanze attive a norma del regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio e che abroga il regolamento di esecuzione (UE) n. 844/2012 della Commissione GU L 392 del 23.11.2020, pagg. 20-31.
8. Regolamento (UE) n. 283/2013 della Commissione, dell'1 marzo 2013, che stabilisce i requisiti relativi ai dati applicabili alle sostanze attive, conformemente al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari. GU L 93 del 3.4.2013, pagg. 1-84.
9. Regolamento (UE) n. 284/2013 della Commis-

sione, dell' 1 marzo 2013, che stabilisce i requisiti relativi ai dati applicabili ai prodotti fitosanitari, conformemente al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari. GU L 93 del 3.4.2013, pagg. 85-152.

10. Regolamento (UE) 2022/1438 della Commissione del 31 agosto 2022 che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i criteri specifici per l'approvazione delle sostanze attive che sono microrganismi. GU L 227 del 1.9.2022, pagg. 2-7.
11. Regolamento (UE) 2022/1441 della Commissione del 31 agosto 2022 che modifica il regolamento (UE) n. 546/2011 per quanto riguarda i principi uniformi specifici per la valutazione e l'autorizzazione dei prodotti fitosanitari contenenti microrganismi. GU L 227 del 1.9.2022, pagg. 70-116.

Sitografia

1. Commissione Europea, 2024a. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>, consultato il 13/05/2024
2. EFSA (European Food Safety Authority), 2024. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>

Gli agenti di controllo microbiologici di funghi e batteri fitopatogeni: presente e futuro della difesa delle colture

Riccardo Bugiani

Servizio Fitosanitario – Regione Emilia-Romagna

GLI AGENTI DI CONTROLLO MICROBIOLOGICI DI FUNGHI E BATTERI FITOPATOGENI

Per la gestione delle malattie delle piante, le soluzioni per il controllo biologico rappresentano davvero il futuro. A spingere il mondo agricolo in questa direzione ci sono le varie normative europee come il *Green Deal* e la strategia *Farm to Fork*, che hanno l'obiettivo di ridurre l'uso degli agrofarmaci di sintesi entro il 2030. A questo scenario politico si aggiunge la sempre maggiore sensibilità dei consumatori che pretendono prodotti agroalimentari meno impattanti per l'ambiente ed ecco spiegata la spinta verso un sempre maggiore impiego delle tecniche di controllo biologico in agricoltura.

Gli agenti di bio-controllo a basso impatto delle malattie fungine possono essere suddivisi in due gruppi: i botanicals: (principi attivi estratti da vegetali che vengono successivamente formulati in prodotti commerciali) e gli antagonisti Naturali Micro-

biologici (agrofarmaci a base di uno o più microorganismi). Entrambi vengono potenzialmente usati per contenere l'attività patogenetica di alcuni funghi fitopatogeni dannosi per le colture agrarie e forestali. Proprio su questi si focalizzerà il presente articolo.

Gli agenti microbiologici ad azione fungicida attualmente autorizzati sono 24 fra batteri, oomiceti, funghi filamentosi e lieviti. Fra questi vi sono 10 ceppi del fungo antagonista *Trichoderma*, 3 ceppi di *Bacillus amyloliquefaciens*, 2 ceppi di *Pseudomonas*, 1 ceppo di *Ampelomyces quisqualis*, *Bacillus pumilus*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis*, *Coniotirium minitans*, *Metchnikowia fructicola*, *Pythium oligandrum*, *Saccharomyces cerevisiae* e, infine, *Streptomyces* (Tabella 1).

Tabella 1
Agenti di controllo microbico autorizzati in Italia per il contenimento
di alcune avversità delle colture

Tipo di microorganismo	Agente di controllo microbico	N. formulati	Colture Autorizzate (in funzione dei diversi formulati)	Avversità Contenute (in funzione dei diversi formulati)
Funghi filamentososi	<i>Trichoderma asperellum</i> T25 + <i>Trichoderma atroviride</i> T11	1	Lattuga, Fragola, Orticole, ornamentali e floricole	Marciumi radicali: (<i>Phytophthora</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp.)
	<i>Trichoderma asperellum</i> T34	1	Floricole, cucurbitacee in serra	Marciumi radicali: (<i>Pythium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp.)
	<i>Trichoderma asperellum</i> TV1	3	Orticole, ornamentali e floricole, prati e campi sportivi	Marciumi radicali (<i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Verticillium</i> spp.)
	<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	2	Vite Orticole	Malattie del legno, Marciumi radicali (<i>Pythium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.)
	<i>Trichoderma atroviride</i> SC1	1	Vite, pomodoro	Malattie del legno, botrite
	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T-22	2	Orticole, ornamentali e floricole, fragola, piccoli frutti	Marciumi radicali (<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Cylindrocladium</i> spp., <i>Thielaviopsis</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp.)
	<i>Trichoderma harzianum</i> ICC 012 + <i>Trichoderma gamsii</i> ICC 080	9	Orticole, ornamentali e floricole, fragola, piccoli frutti, Colture arboree, Vite, Actinidia	Marciumi radicali (<i>Pythium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Armillaria mellea</i>) Cancri rameali (<i>fusicocco</i> , <i>citospora</i>) Malattie del legno <i>Botrite</i> <i>Stemphylium vesicarium</i>
	<i>Ampelomices quisqualis</i> M-10	1	Orticole e Vite	Oidio
	<i>Coniotirium minitans</i> CON/M/91-08	1	Orticole, ornamentali e floricole	Sclerotinie
Oomiceti	<i>Pythium oligandrum</i> - ceppo M1	1	Orticole, ornamentali e floricole	<i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Botrite</i>

Batteri	<i>Bacillus amylo-liquefaciens</i> - FZB24	1	Orticole	<i>Bremia lactucae</i> , Oidio
	<i>Bacillus amylo-liquefaciens</i> - MBI 600	1	Orticole, fragola, vite	<i>Botrytis cinerea</i>
	<i>Bacillus amylo-liquefaciens plantarum</i> - D747	2		Cancro batterico, oidio, botrite, sclerotinia, Bremia, marciume acido, maculatura bruna
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> - MA 342	1	Orzo e frumento	Concia delle sementi
	<i>Pseudomonas</i> sp. - DSMZ 13134	1	Orticole	Fusarium, Helminthosporium, Rhizoctonia
	<i>Streptomyces</i> K61	1	Semenze e terricciati	Patogeni tellurici
	<i>Bacillus pumilus</i> - QST 2808	2	Vite, Orticole	Oidio
	<i>Bacillus subtilis</i> - QST 713	5	Pomacee, drupacee, vite	Colpo di fuoco batterico, ticchiolatura, botrite, monilia, batteriosi
Lieviti	<i>Metschnikowia fructicola</i> ceppo NRRL Y-27328	1	Vite, fragola e piccoli frutti	Botrite, marciume acido
	<i>Aureobasidium pullulans</i> - DSM 14940 e 14941	3	Pomacee, vite, fragola, solanacee	Colpo di fuoco batterico e malattie da conservazione, Botrite
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LAS02	1	drupacee, fragola, vite, piccoli frutti	Monilia, Botrite
	<i>Candida oleophyla</i> Ceppo O	1	Banane, mele, agrumi	Malattie da conservazione (<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp, <i>Colletotrichum musae</i>)

Le modalità d'azione degli agenti microbici di biocontrollo (*microbials*) sono complesse e comprendono:

- Antibiosi: inibizione della germinazione delle spore e o della crescita dell'agente patogeno
- Esclusione: competizione e compartimentazione dei funghi fitopatogeni da parte dei bio-fungicidi microbici
- Micoparassitismo: parassitizzazione dei funghi patogeni da parte dei bio-fungicidi microbici
- Induzione dei meccanismi di difesa endogeni della pianta
- Biostimolazione: stimolazione della crescita della pianta e resilienza

Molti degli agenti microbici di biocontrollo possiedono due o talvolta anche tre meccanismi di azione contemporaneamente. Molti bio-fungicidi microbici possono colonizzare e crescere agevolmente su suoli trattati o sulla fillosfera, svolgendo con svariate diverse modalità d'azione, microbiche e biochimiche, un'attività di contenimento, talvolta anche a lungo termine,

degli agenti patogeni delle colture.

Antibiosi (Azione Diretta)

Il microrganismo produce tossine e/o enzimi litici che inibiscono la crescita del patogeno. Il genere *Bacillus* comprende diversi ceppi che sono già da tempo commercialmente disponibili come bio-fungicidi. Alcuni ceppi di *Bacillus* come *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, fra i tanti, producono metaboliti antimicrobici come alcuni lipopeptidi, che mostrano un'attività biocida o surfattante e un ampio spettro d'azione. Grazie alla loro struttura lipoproteica, i lipopeptidi sono in grado di penetrare le membrane lipidiche come quelle che circondano il citoplasma cellulare, influenzando e compromettendo la loro integrità e permeabilità.

Le famiglie di lipopeptidi come le Iturine e le Fengicine mostrano una forte attività antifungina per uno spettro piuttosto ampio di funghi fitopatogeni, con le Fengicine che sembrano avere una propensione maggiore verso il contenimento di Oomiceti come *Pythium* e *Phytophthora*.

Un'altra famiglia di lipopeptidi, le Surfactine, possiedono invece proprietà antivirali e antibatteriche. Nonostante abbiano una bassa attività antifungina, le surfactine possono agire sinergicamente in combinazione con le Iturine. Le surfactine, infatti, agiscono anche come bio surfattante, (diminuendo la tensione superficiale delle gocce di acqua) sia come detergente, e sono coinvolte nella formazione di biofilm e nella mobilità batterica, inibendo la formazione di biofilm di batteri fitopatogeni e interferendo con la loro adesività alla pianta ospite.

I batteri del genere *Streptomyces*, gram-positivi, si trovano comunemente in natura, nei suoli e sono in grado di produrre composti antimicrobici (la Streptomina, noto antibiotico viene prodotto da questi batteri).

È tuttavia vero però che la produzione di queste sostanze antibiotiche penalizza il procedimento di autorizzazione a causa della tossicità potenziale anche nei confronti di altri microorganismi e dell'uomo. Pertanto, la maggior parte dei ceppi registrati è stato selezionato per produrre più enzimi che tossine perché per ottenere l'autorizzazione è più complicato provare la non tossicità nei confronti dell'essere umano, dell'ambiente e degli animali.

Competizione

I bio-fungicidi microbici possono competere con gli agenti patogeni per i nutrienti e i siti di infezione sulle superfici fogliari e nel suolo.

Tra i bio-fungicidi che possiedono questo meccanismo d'azione vi sono quelli a base di ceppi di specie diverse di *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. gamsii*) specie fungina fortemente imparentata col suolo, suo ambiente elettivo. Questi funghi filamentosi sono in grado anche di attaccare e sopprimere gli agenti patogeni attraverso un'azione combinata di repulsione attraverso la produzione di composti antimicrobici enzimatici, in grado perciò di degradare la parete cellulare del patogeno (azione diretta). Al di là dei formulati a base di *Trichoderma* spp. che sono ormai già diventati una realtà nel panorama fitoiatrico italiano (basti pensare al loro impiego nei confronti del mal dell'esca e di numerosi agenti patogeni tellurici). La competizione permette al *Trichoderma* di controllare *Botrytis cinerea* sull'uva colonizzando precocemente i siti di contaminazione del patogeno, escludendolo dal suo futuro potenziale sito di infezione. Possiede una buona interazione con la pianta e, dato che il suolo è il suo ambiente elettivo, è in grado di colonizzare bene le radici e produrre fitormoni che ne promuovono la crescita. Recentissime esperienze hanno dimostrato, seppure preliminarmente, che il loro impiego al terreno in prossimità dei

ceppi di vite sarebbe in grado di indurre una buona tolleranza anche agli attacchi di peronospora. Con tale meccanismo d'azione possono essere annoverati anche i lieviti come *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae* e altri che verranno introdotti in futuro.

Aureobasidium pullulans, è un lievito saprofita e ubiquitario dotato di grande adattamento alle condizioni ambientali. Agisce come bio-fungicida nei confronti dei marciumi da conservazione e della botrite. Tuttavia, possiede anche proprietà elicitorie. *Erwinia amylovora*: la sua attività nei confronti del colpo di fuoco batterico si esplica acidificando il substrato colonizzato sulla superficie dei fiori impedendo lo sviluppo del patogeno.

Bacillus amyloliquefaciens ceppo MBI 600 e *Bacillus amyloliquefaciens plantarum* ceppo D747 sono batteri attivi nei confronti delle malattie dell'apparato radicale (*Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* e *Pythium*) e delle malattie fogliari (peronospora della vite, oidio, alternariosi e peronospora della patata, e come battericida), sulle colture orticole, in frutticoltura e sulle colture ornamentali. I batteri, comunemente presenti nel suolo e sulla vegetazione, agiscono per competizione in quanto sono in grado di produrre una amilasi, enzima in grado di liquefare o meglio degradare zuccheri complessi in zuccheri semplici. Costituiscono quindi una barriera fisica che impedisce ai patogeni di entrare in contatto con i tessuti della pianta. *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* ceppo FZB24 svolge la sua attività bio-fungicida per competizione, antibiosi e di induzione di resistenza.

Bacillus pumilus - QST 2808, analogamente agli altri bio-fungicidi precedenti, esplica la sua azione impedendo la germinazione delle spore, ostacolando la formazione della parete cellulare e cagionando la vita-

lità delle cellule fungine. Il microrganismo è inoltre in grado di stimolare i meccanismi di resistenza della pianta ai patogeni competendo anche con questi ultimi per le risorse nutritive.

Pseudomonas chlororaphis - MA 342 è un batterio con una buona efficacia nel contenimento di elmintosporiosi, carie, carboni e septoriosi di frumento e orzo. Una volta applicato al seme il batterio si moltiplica occupando lo spazio trofico e assicurando una protezione prolungata nel tempo. L'efficacia protettiva del prodotto è massima durante la fase di germinazione e si prolunga fino allo stadio di 5 foglie. Al termine della sua azione, il batterio viene integrato nella microflora del terreno, non apportando quindi alcuna alterazione ai biomi esistenti in quanto già naturalmente compreso nella micoflora batterica del suolo.

Il ceppo QST 713 di *Bacillus subtilis* è stato sviluppato dalla società Agraquest e commercializzato dalla Bayer in Europa sotto il nome di Serenade ASO. Il prodotto agisce, oltre che per competizione spaziale e trofica, anche come stimolatore delle difese naturali della pianta e migliora la fisiologia della pianta stessa. Negli USA lo spettro di attività di questo batterio è stato recentemente esteso, anche ai trattamenti al suolo. In questo ambito è particolarmente attivo nei confronti della *Rhizoctonia* e la sua attività sulla scabbia comune e argentata, come anche sulla peronospora potrebbe farne un candidato ideale, per la difesa dalle malattie della patata. Le ricerche stanno procedendo per ottimizzare la formulazione per le applicazioni fogliari. Al momento il microrganismo è autorizzato in Italia su diverse colture frutticole e sulla vite per il controllo di talune avversità fungine e batteriche.

Saccharomyces cerevisiae ceppo LAS02 è un lievito selezionato per la sua capacità di sopravvivere e svilupparsi rapidamente,

colonizzando l'ambiente, sottraendo spazio vitale e nutrimento ai funghi patogeni. È attivo nei confronti della moniliosi delle drupacee, botrite delle orticole, della fragola, dei piccoli frutti e della vite.

Metschnikowia fructicola ceppo NRRL Y-27328 è un biofungicida anch'esso a base di lieviti che agisce entrando in competizione per lo spazio vitale e gli elementi nutritivi con alcuni agenti di marciume di fragola, vite e piccoli frutti. È in grado di colonizzare agevolmente le superfici e, avendo una crescita più rapida rispetto ai patogeni, ne impedisce lo sviluppo. Questo lievito antagonista produce inoltre capsule di polisaccaridi extracellulari che ne favoriscono l'adesione alla superficie della pianta e del frutto formando un biofilm che copre l'intera area trattata.

Parassitismo

Il parassitismo consiste nella crescita di un microrganismo sopra o all'interno del microrganismo patogeno. Questo viene privato delle sostanze nutritive fino alla morte. In natura tutti i parassiti per interesse ecologico non elimineranno mai il patogeno totalmente, in quanto si priverebbero della loro stessa fonte di sopravvivenza. Pertanto, questo meccanismo porta inevitabilmente solo ad una riduzione dell'inoculo, ma non alla sua eliminazione. Va da sé che per poter proliferare il microrganismo parassita deve essere distribuito in presenza di una, seppur piccola, popolazione del patogeno.

Il ceppo M1 del fungo oomicete micoparassita della specie *Pythium oligandrum*, messo a punto dalla società ceca Biopreparaty, è commercializzato in Italia dalla Gowan con il nome Polyversum. Il fungo, che agisce sia per mico-parassitizzazione che stimolando le difese della pianta e la sua crescita, è in grado di parassitizzare oltre le specie del genere *Botrytis*, anche quelle di *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Ophiostoma*,

Phialophora, *Phoma*, *Phytophthora*, *Pseudocercospora*, *Pythium*, *Sclerotinia* e *Verticillium*. Il formulato è autorizzato per il contenimento della muffa grigia e i marciumi del colletto per diverse colture orticole, ornamentali e la vite. *Pythium oligandrum* possiede anche proprietà elicitoria inducendo la pianta a produrre composti fenolici nella parete cellulare e a formare pectato di calcio negli spazi intercellulari e nel floema, rendendola più resistente agli eventuali attacchi dell'agente patogeno.

Il fungo *Ampelomyces quisqualis*, micoparassita di *Uncinula necator*, è un fungo polifago che colonizza rapidamente l'ambiente dove viene distribuito e agisce attaccando il micelio, le ife e i rami conidiofori. Dopo la formazione dell'appressorio penetra nell'ospite degenerando il citoplasma della cellula fungina e distruggendo le colonie di moltissime specie di *Erysiphales* compresi chasmodecteci (organi di svernamento del patogeno). Proprio questa sua caratteristica lo rende in grado di ridurre il potenziale di inoculo svernante di oidio. Deve essere tuttavia applicato in presenza di una popolazione oidica. Il ceppo AQ10 attualmente in commercio è attivo nei confronti dell'oidio su cucurbitacee, solanacee, fragola, rosa, uva da tavola e da vino. Va utilizzato in strategia con altri prodotti per almeno due applicazioni consecutive distanziate dai 7 ai 10 giorni. Non soffre le basse temperature mentre le temperature alte lo disidratano e, se questo avviene prima della penetrazione del patogeno, la sua efficacia diminuisce considerevolmente. È consigliabile, pertanto, nei mesi estivi applicarlo durante le ore serali o al mattino presto.

Induzione localizzata o sistemica dei meccanismi di difesa delle piante

Le piante sono in grado di rilevare attacchi dovuti all'azione di agenti patogeni invasivi e di indurre la produzione di meccanismi endogeni di difesa per contrastarli, quali la

produzione di sostanze chimiche tossiche in grado di distruggere le cellule fungine o batteriche. L'induzione di resistenza permette alla pianta, quando opportunamente stimolata, di acquisire una sorta d'immunità nei confronti dei patogeni virulenti. La stimolazione della resistenza avviene attraverso la produzione di cosiddetti "elicitori", segnali molecolari prodotti direttamente o indirettamente dal patogeno nel momento in cui questo si relaziona con la pianta stessa. L'interazione di questi elicitori con alcuni specifici recettori delle cellule della pianta dà avvio ad una serie di segnali molecolari in grado di attivare, a livello nucleare, la trascrizione dei geni preposti alla difesa. Sostanze elicitori possono essere rappresentate da frammenti di parete cellulare (chitina e chitosano costituenti della parete cellulare di funghi e dell'esoscheletro dell'insetto), proteine e glicopeptidi, acidi nucleici, acidi grassi etc.

Ci possono essere due tipi di resistenza: una resistenza sistemica acquisita (SAR) e una resistenza sistemica indotta (Isr). La Sar si manifesta verso un ampio spettro di patogeni dopo uno, due o più giorni e soprattutto anche in organi distanti rispetto a quelli dove è avvenuto il contatto con l'induttore. L'acquisizione di resistenza è associata all'espressione dei geni che codificano per le proteine di patogenesi (Pr) ed è fondamentalmente mediata dall'acido salicilico. Le Pr poi permettono di produrre enzimi litici e sostanze che irrobustiscono la parete cellulare delle cellule vegetali per conferire alla pianta la resistenza all'infezione.

La resistenza sistemica indotta (Isr) stimola l'attivazione dei meccanismi di difesa latenti che si esprimono in seguito ad un successivo attacco di microrganismi patogeni. Tale attivazione nelle piante avviene più velocemente e intensamente anche a livelli elicitori molto bassi, viene mediata principalmente dall'acido jasmonico e porta alla

produzione di sostanze come la chitinasi e la perossidasi, in grado di degradare le pareti cellulari fungine e altri composti fitochimici antifungini come fenoli, terpeni e alcaloidi.

Oltre alla strategia antifungina diretta, le piante possono inoltre attivare una risposta di ipersensibilità (HR), chiamata anche di "morte cellulare programmata", che limita l'accesso ai biotrofi (gli agenti patogeni che non possono sopravvivere in un ospite morto e che si nutrono di tessuti viventi) ad acqua e nutrienti. La risposta di ipersensibilità è un meccanismo usato dalla pianta per contenere al minimo lo sviluppo del patogeno, mediante l'induzione della morte cellulare rapida e localizzata nella regione immediatamente contigua al punto di infezione. In seguito al riconoscimento del patogeno, l'attivazione dei geni preposti alla resistenza innesca un meccanismo ossidativo legato delle specie di ossigeno reattive (ROS). Queste sono in grado di attirare elettroni dalle membrane dei tilacoidi dei cloroplasti (perossidazione dei lipidi), portando alla perdita di clorofilla e a lesioni clorotiche associate.

La produzione e il mantenimento di questi meccanismi di difesa risultano molto dispendiosi per la pianta in termini energetici per cui non vengono attivati fino a che gli agenti patogeni non sono rilevati dalla pianta. Le strategie di impiego dei bio-fungicidi devono essere in grado di attivare la risposta di induzione alla difesa prima dell'attacco dell'agente patogeno e pertanto devono essere distribuiti preventivamente sulla coltura da proteggere.

Vantaggi

L'utilizzo dei Bio-fungicidi nelle strategie di difesa, ad esempio, può presentare diversi vantaggi tecnici per l'agricoltore sia dal punto di vista della maggiore sicurezza ambientale che della produzione, grazie a:

- un migliore profilo tossicologico;

- riduzione dei residui sulle derrate;
- tempi di carenza o di rientro inferiori;
- assenza di fitotossicità;
- assenza di interferenza con la fermentazione.

Inoltre, alternando l'utilizzo di Bio fungicidi ai prodotti chimici tradizionali con diverso meccanismo d'azione, si possono mettere in atto delle efficaci strategie anti-resistenza riducendo il rischio di comparsa di popolazioni resistenti ai prodotti chimici.

Svantaggi

Fra gli svantaggi, il primo in assoluto è il livello di efficacia che non è quello che si può raggiungere applicando prodotti chimici di sintesi. Pertanto, il primo errore da evitare è aspettarsi una efficacia paragonabile al prodotto fitosanitario chimico. Questo non vuol dire che l'efficacia non possa essere incrementata attraverso idonee strategie di impiego con altri prodotti e soprattutto con adeguate pratiche agronomiche. Anche se le conoscenze e la tecnologia in possesso ci permettono di conservarli adeguatamente, il loro mantenimento nel tempo può non essere ottimale e trascurare questo dettaglio potrebbe inficiare la loro efficacia potenziale. L'impiego di bio-fungicidi deve inoltre tenere conto della compatibilità con applicazioni ravvicinate di Sali di rame e zolfo, solo per citare due tra i fungicidi inorganici ad azione di contatto ammessi in agricoltura biologica. Molto è stato fatto in termini di comprensione dei meccanismi biologici di competizione di questi microorganismi. Ma bisogna riconoscere che siamo all'inizio di un percorso e molto si dovrà studiare per comprendere il momento migliore per il loro impiego durante la stagione. Sono microorganismi vivi che devono interagire con il patogeno in un contesto di nicchia ecologica complessa e ancora non pienamente esplorata. Per esempio, se il microorganismo antago-

nista compete con l'agente patogeno producendo enzimi e sostanze antibiotiche, lo fa quando si trova nelle condizioni microambientali ottimali oppure, al contrario, vengono prodotti quando questo si trova in condizioni di stress ambientale? Come vediamo è necessaria ancora molta ricerca, anche di base, per ottimizzare il loro impiego e sfruttarne appieno le loro proprietà. Inoltre, oltre alla ricerca di base in laboratorio, è successivamente necessaria molta sperimentazione in campo perché è poi quello il luogo in cui si potrà misurare la loro piena efficacia. Sono molti, infatti, gli esempi di potenziali microorganismi che potenzialmente dimostrano di avere una buona efficacia competitiva in ambiente controllato e poi in campo non si dimostrano sufficientemente efficaci. Il successo fitoiatrico di questi microorganismi dipenderà molto da tutti questi fattori e l'assistenza tecnica adeguata, in grado di veicolare le giuste informazioni per il loro impiego efficace, giocherà un ruolo determinante.

Agrofarmaci a base di microrganismi: aspetti tossicologici rilevanti per la valutazione della salute umana

Sara Lamperti
Corteva Agriscience

Introduzione

Negli ultimi anni l'agricoltura, in particolare quella europea, ha assistito ad un notevole aumento dell'uso di fitofarmaci a base microbica.

Per sostenere la transizione europea verso sistemi alimentari sostenibili e supportare la strategia "Farm to Fork - dal produttore al consumatore", ma nel contempo garantire un elevato livello di protezione della salute umana e animale e dell'ambiente, la Commissione Europea ha adottato nuovi regolamenti in ambito di fitofarmaci biologici.

In particolare, per i prodotti fitosanitari a base di microrganismi nel 2022 sono stati approvati i regolamenti EU 2022/1439 e 2022/1440 che rispettivamente specificano i requisiti relativi ai microrganismi come sostanze attive e come prodotti formulati.

Inoltre, nel corso del 2023, la Commissione Europea ha pubblicato due comunicazioni

elencanti i metodi di prova e i documenti di orientamento pertinenti ai due regolamenti 1439 e 1440 e anche delle "Note esplicative" che forniscono ulteriori dettagli sui requisiti richiesti

Le nuove norme riflettono i più recenti sviluppi scientifici e tecnici e si basano sulle proprietà biologiche specifiche dei microrganismi. Poiché i microrganismi sono organismi viventi, è necessario un approccio che tenga conto anche delle nuove conoscenze scientifiche emerse sulla loro biologia.

Valutazione degli effetti sulla salute umana

I punti fondamentali per la protezione della salute umana e animale sono:

1. Valutazione della patogenicità e infettività del microrganismo;
2. Valutazione del rischio di resistenza antimicrobica;

3. Valutazione della possibile produzione di metaboliti secondari pericolosi.

Tutti gli studi usati per la valutazione di effetti potenziali sulla salute umana dovrebbero essere condotti in accordo alle BPL (Buone Pratiche di Laboratorio), unica eccezione è la generazione e l'analisi della sequenza genica (WGS) per attività antimicrobica e la produzione dei metaboliti secondari.

1. La **valutazione della infettività** (capacità del microrganismo di entrare e di replicarsi nell'ospite) e **della patogenicità** (capacità del microrganismo di causare un danno all'ospite dopo infezione) deve avvenire attraverso studi specifici su ratto a seguito di una singola sommi-

nistrazione (in accordo alle linee guida USEPA OPPTS della serie 885.) per via orale, intratracheale e intravenosa/intraperitoneale/sottocutanea. In questi studi viene valutata la tossicità e la replicazione del microrganismo all'interno dell'animale e la eventuale *clearance* dello stesso nei diversi organi e nel sangue fino a 21 gg dopo l'esposizione.

Esiste la possibilità, in base alla normativa, di evitare l'esecuzione dei test *in vivo* nel caso in cui sia possibile dimostrare, tramite un approccio basato sulla forza probante dei dati (*Weight of Evidence*, WoE), che per il microrganismo in analisi non sono previsti effetti di questo tipo.

**cosa considerare
per WoE?**

- Ecologia e condizioni di crescita del microrganismo
- Meccanismo azione
- Presenza naturale nell'ambiente
- Storia di utilizzo sicuro (non limitata ai prodotti per agricoltura)
- Informazioni dalla letteratura o lista QPS*
- Valutazione della sequenza genica (WGS)

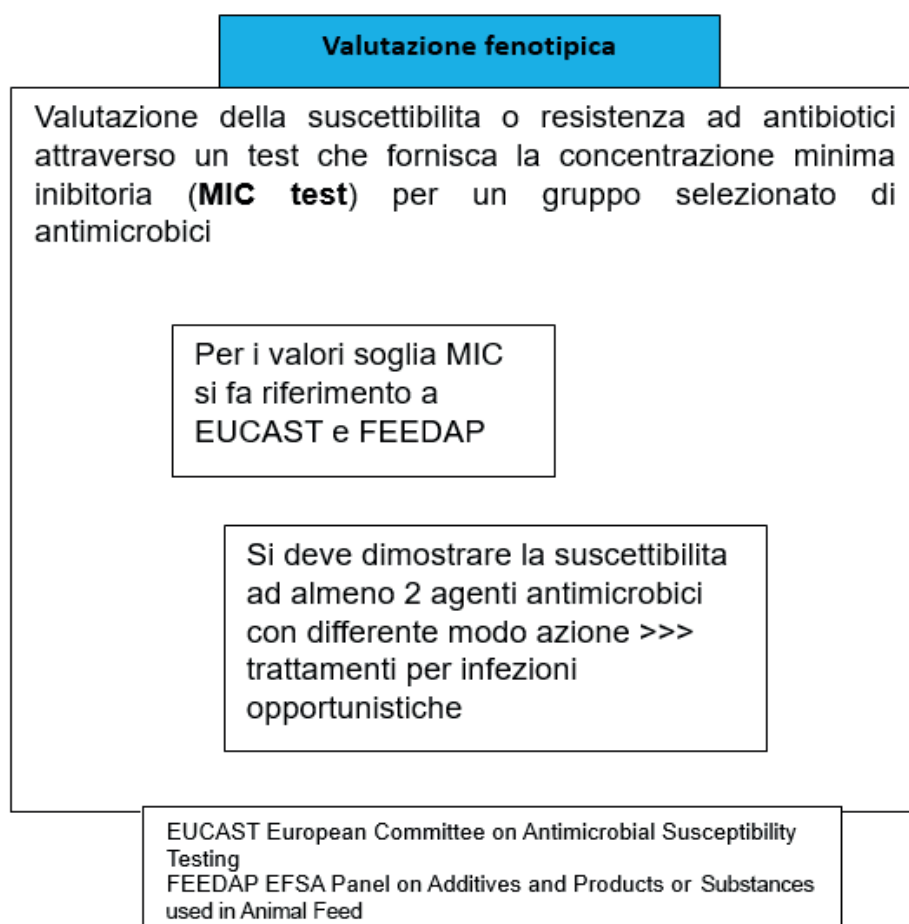
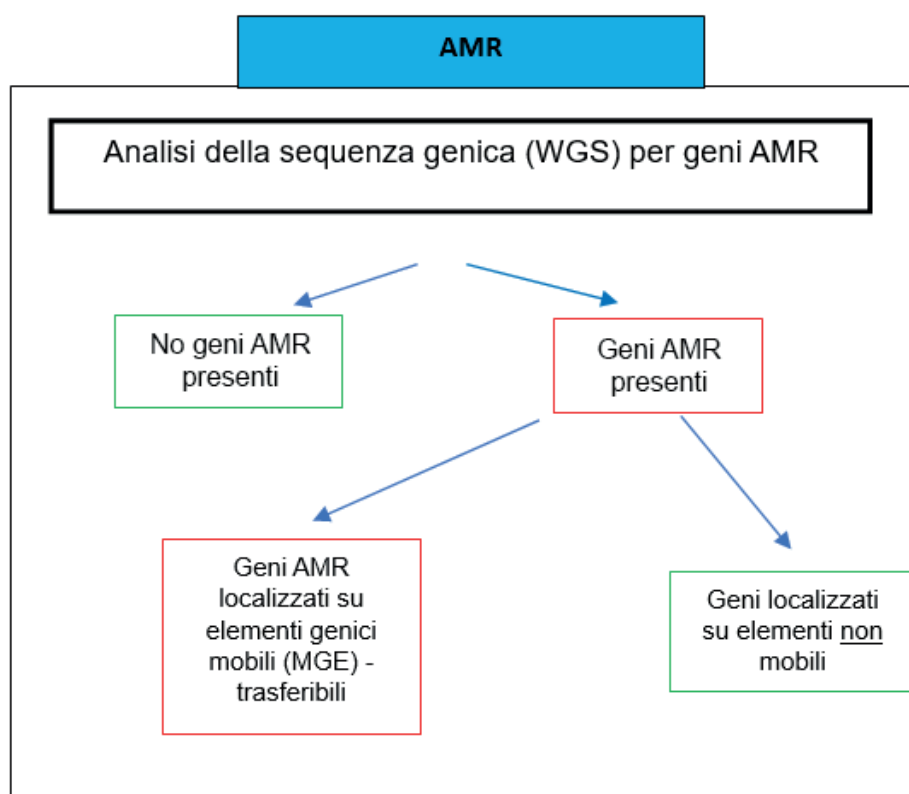
* EFSA presunzione qualificata di sicurezza

2. La **valutazione della resistenza antimicrobica** del microrganismo si basa su due punti fondamentali :

- valutazione della sequenza genica (WGS) e della presenza di geni di resistenza antimicrobica (AMR) ri-

levanti per uso umano o animale e la potenzialità di trasferibilità degli stessi – solo per batteri;

- valutazione fenotipica di suscettibilità ad antibiotici.



3. La **valutazione** della possibile produzione di **metaboliti secondari pericolosi** si basa sulla linea guida della Commissione Europea **SANCO/2020/12258**.

Questa linea guida determina come ef-

fettuare la valutazione per escludere o identificare metaboliti di rilevanza (per tossicità e/o azione antimicrobica) e, nel caso, come effettuare poi la valutazione del rischio.

4 fasi della valutazione:

- Stage 1: determinare il tipo di valutazione per i metaboliti secondari (in base al meccanismo d'azione) - se il metabolita presente nel prodotto fitosanitario è coinvolto nel meccanismo d'azione;
- Stage 2: creare la lista dei metaboliti secondari di potenziale rilevanza in base alle informazioni disponibili rilevanti;
- Stage 3: determinare la lista dei metaboliti di reale rilevanza;
- Stage 4: valutare rischio per i metaboliti di rilevanza.

Per la valutazione dei metaboliti secondari è raccomandato l'utilizzo della *Appendix I* estratta da *Explanatory notes for micro-or-*

ganism riportata nella immagine sottostante.

	Stage 1		Stage 2					Stage 3				Stage 4
Metabolite identifier ¹⁾	Active substance (Y/N)	Secondary contributor to MoA (Y/N/?)	Verification of MoPC-status				Outcome chemical analysis ⁴⁾	Relevant exposed group ⁵⁾	MoC (Y/N)	Ref. values (TOX) and endpoints (ECOTOX)	Exposure level	Unacceptable risk (Y/N) ⁶⁾
			Toxic / antimicrobial effect observed, test species, and strain ²⁾	Potential relevance for MPC ³⁾	WGS-evidenced (Y/N)	MoPC (Y/N/?)						
Name, CAS, and/or IUPAC	Y/N	Y/N/?	<u>Study 1:</u> Effect / test species / strain <u>Study 2, etc...</u>	Metabolite / Effect	Y/N	Y/N/?	<u>MPCA-AM:</u> Y/N or max. <u>MPCP:</u> Y/N or max. <u>Induced:</u> Y/N	TOX; TOX.. / ECOTOX; ECOTOX.. Y/N	Y/N	TOX; TOX.. / ECOTOX; ECOTO		

Ruolo fondamentale nella definizione dei metaboliti di reale *concern* e l'utilizzo della sequenza genica del microorganismo (**WGS-whole genome sequence**).

WGS è molto efficace per la valutazione del rischio (microorganismo e metaboliti secondari), ma anche naturalmente per identificazione tassonomica del microorganismo stesso.

Conclusioni

Per valutare la sicurezza dei prodotti fitosanitari a base di microrganismi è importante:

- Valutare il singolo microorganismo per le sue caratteristiche specifiche di crescita e sviluppo e suo modo d'azione;

- Usare dove possibile dati da WGS e informazioni su microorganismo per ridurre al minimo utilizzo di animali;
- Nel caso di studi di patogenicità/infettività limitare il numero andando a prioritizzare la via di somministrazione in base alla reale esposizione umana;
- Lavorare per un'armonizzazione globale della strategia valutativa in modo da ridurre al minimo i test non necessari *in vivo* e permettere una più accurata e mirata valutazione del rischio.

Bibliografia

1. *REGOLAMENTO (UE) 2022/1439 DELLA COMMISSIONE del 31 agosto 2022 che modifica il regolamento (UE) n. 283/2013 per quanto riguarda le informazioni da trasmettere per le sostanze attive e i requisiti specifici relativi ai dati*

applicabili ai microrganismi.

2. *REGOLAMENTO (UE) 2022/1440 DELLA COMMISSIONE del 31 agosto 2022 che modifica il regolamento (UE) n. 284/2013 per quanto riguarda le informazioni da trasmettere per i prodotti fitosanitari e i requisiti specifici relativi ai dati applicabili ai prodotti fitosanitari contenenti microrganismi.*
3. *Comunicazione della Commissione riguardante la parte B dell'allegato del regolamento (UE) n. 283/2013 della Commissione, che stabilisce i requisiti relativi ai dati applicabili alle sostanze attive, conformemente al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari 2023/C 202/03.*
4. *Comunicazione della Commissione riguardante la parte B dell'allegato del regolamento (UE) n. 284/2013 della Commissione, dell'1 marzo 2013, che stabilisce i requisiti relativi ai dati applicabili ai prodotti fitosanitari, conformemente al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari 2023/C 202/02.*
5. *Explanatory notes for the implementation of the data requirements on micro-organisms and plant protection products containing them in the framework of Reg. (EC) No 1107/2009. European Commission PAFF-PPL-October 2023-Doc.A.07.01 12 October 2023.*
6. *Series 885 - Microbial Pesticide Test Guidelines (USEPA) <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-885-microbial-pesticide-test-guidelines>*
7. *List of qualified presumption of safety (QPS) recommended microorganisms intentionally added to food or feed as notified to EFSA; doi:10.2903/j.efsa.2023.7747.*
8. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) <https://www.eucast.org/>*
9. *EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEED-AP).*
10. *SANCO/2020/12258 rev 1- 21 marzo 2024 GUIDANCE ON THE RISK ASSESSMENT OF METABOLITES PRODUCED BY MICROORGANISMS USED AS PLANT PROTECTION ACTIVE SUBSTANCES IN ACCORDANCE WITH ARTICLE 77 OF REGULATION (EC) No 1107/2009.*

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).*

Interazioni multitrofiche e bioprotezione sostenibile delle piante

Francesco Pennacchio

Università di Napoli Federico II – Dipartimento di Agraria e BAT Center, Portici (NA)

INTERAZIONI MULTITROFICHE E BIOPROTEZIONE SOSTENIBILE DELLE PIANTE

Introduzione

La vita sulla Terra è il risultato dell'evoluzione guidata, in larga misura, dalla competizione per le risorse, che ha portato alla formazione di sistemi complessi quali cellule, organismi pluricellulari, comunità ed ecosistemi. La multifunzionalità degli ecosistemi è resa possibile dalla presenza di biodiversità a diversi livelli trofici che, generando reti complesse di interazioni, conferiscono stabilità e resilienza al sistema. Questo è il principio generale su cui si basa il concetto di "One-Health", che afferma che la salute e il benessere dell'uomo sono indissolubilmente legati alla salute di altri componenti dell'ecosistema come suolo, piante e animali.

In questo contesto, il ruolo dei microrganismi è sempre più riconosciuto come cruciale. Essi sono associati a tutte le forme di vita, creando interconnessioni che condizionano il loro funzionamento e quello degli ecosistemi di cui fanno parte. Infatti,

è ormai ben noto che le comunità microbiche associate a piante, animali ed esseri umani funzionano come un "secondo genoma", contribuendo a un "genotipo esteso" di un'unità evolutiva complessa, "olobionte", che modula la crescita, la sopravvivenza e, in ultima analisi, la *fitness* e l'evoluzione degli organismi viventi. Pertanto, il funzionamento degli ecosistemi si basa sull'efficiente allocazione delle risorse tra gli olobionti che competono per il loro utilizzo, i quali costituiscono un vero e proprio superorganismo regolato da una rete di complesse interazioni trofiche.

Crescenti evidenze scientifiche supportano l'ipotesi che il microbioma del suolo e le sue interazioni con altri microbiomi associati a vari organismi siano di importanza centrale nel contesto "One-Health". Tuttavia, la nostra conoscenza su come queste comunità microbiche interagiscano e influenzino i livelli trofici interconnessi rimane frammentaria, e il quadro che collega il microbioma del suolo alla salute di piante,

animali ed esseri umani è ancora incompleto. L'analisi di queste articolate interazioni, a cavallo di diversi livelli trofici, è attualmente limitata anche per la difficoltà di indagare i complessi legami funzionali che si instaurano fra regni diversi.

Lo studio delle interazioni multitrofiche insetto-pianta offre notevoli opportunità per l'approfondimento di queste conoscenze, in quanto gli artropodi sono elementi centrali in tutti gli ecosistemi naturali e negli agroecosistemi, rivestendo ruoli ecologici ed economici di massima importanza. L'analisi dei processi di co-evoluzione che hanno plasmato le strategie di attacco adottate dai fitofagi per superare le barriere di difesa delle piante ha consentito la scoperta di sostanze naturali di origine vegetale in grado di interferire direttamente con la fisiologia degli insetti, condizionandone sviluppo, sopravvivenza e riproduzione, e la descrizione dei meccanismi molecolari che ne regolano la biosintesi. Queste difese dirette sono affiancate da difese indirette, ovvero da modificazioni metaboliche delle piante che determinano l'emissione di segnali chimici in grado di attrarre antagonisti naturali dei fitofagi, come dimostrato da molteplici studi che hanno contribuito a definire le complesse interazioni tra più livelli trofici. Infine, la crescente disponibilità di tecnologie d'indagine molecolare ha consentito di fare luce sull'importante ruolo dei microrganismi associati agli organismi che interagiscono.

Questa breve nota vuole fornire una visione generale sull'importanza di comprendere i meccanismi alla base delle interazioni tra olobionti all'interno di complesse reti trofiche. Gli studi in questo ambito sono utili per sviluppare (1) una visione olistica della valutazione del rischio associata all'introduzione nell'ambiente di agenti di stress in grado di perturbare queste delicate interazioni trofiche e (2) nuove strategie di controllo ispirate da queste interazioni che

prevedono l'uso di organismi e microrganismi quali agenti di biocontrollo e/o di molecole di origine naturale.

Interazioni multitrofiche insetto-pianta: un modello di studio per una nuova analisi dei rischi ecologici

Le piante catturano l'energia solare consentendo l'organizzazione del carbonio e la sua immissione nella catena alimentare, dove avviene una fitta competizione per le risorse fra organismi che fanno parte di complesse reti trofiche. La condizione di equilibrio dinamico di questi sistemi deve prevedere un'allocazione ottimale delle risorse ad ogni livello trofico e il ritorno al suolo di materia ed energia in grado di supportare in modo adeguato la produzione primaria. Questo equilibrio dinamico è sotteso al funzionamento di tutti gli ecosistemi e ogni fattore di perturbazione esterno può avere un effetto sulla loro stabilità, la cui misurazione può fornire una buona stima dell'impatto ambientale di tale fattore. Tuttavia, l'applicazione di questo principio non è banale, in quanto richiede una conoscenza accurata dei meccanismi di competizione ai diversi livelli trofici della rete, che, a partire dal dettaglio molecolare e funzionale degli organismi, permetta di sviluppare modelli che descrivano il funzionamento di una realtà di complessità crescente, che include, via via, le popolazioni, le comunità e gli ecosistemi. Un tale approccio è oggi reso perseguibile grazie alla crescente disponibilità di raffinati strumenti di indagine molecolare e di potenti sistemi di calcolo, necessari per la simulazione di sistemi complessi.

Le interazioni fra insetti e piante rappresentano un sistema ideale per lo studio delle reti trofiche. Gli insetti, infatti, offrono opportunità uniche per caratterizzare i meccanismi molecolari alla base delle interazioni trofiche a più livelli; essi, inoltre, sono modelli sperimentali relativamente semplici da utilizzare e, fattore ancora più

importante, hanno un ruolo centrale negli ecosistemi terrestri, dove mobilitano un'enorme quantità di materia ed energia.

Esiste una considerevole mole di informazioni sul ruolo svolto dal microbiota del suolo nel promuovere la salute del suolo stesso e delle piante, stimolando in queste ultime la crescita e la difesa contro agenti di stress biotico, come patogeni e parassiti animali. Numerosi studi hanno dimostrato che i microrganismi del suolo possono

attivare nelle piante meccanismi di difesa diretti e indiretti, con effetti, quindi, sia sui fitofagi sia sui loro antagonisti naturali. Un recente studio ha consentito di scoprire che il fungo del suolo *Trichoderma afroharzianum* induce resistenza nelle piante di pomodoro nei confronti delle larve del lepidottero *Spodoptera littoralis*, causando una grave disbiosi intestinale che comporta la riduzione del contributo nutrizionale dei simbionti intestinali (Fig.1).

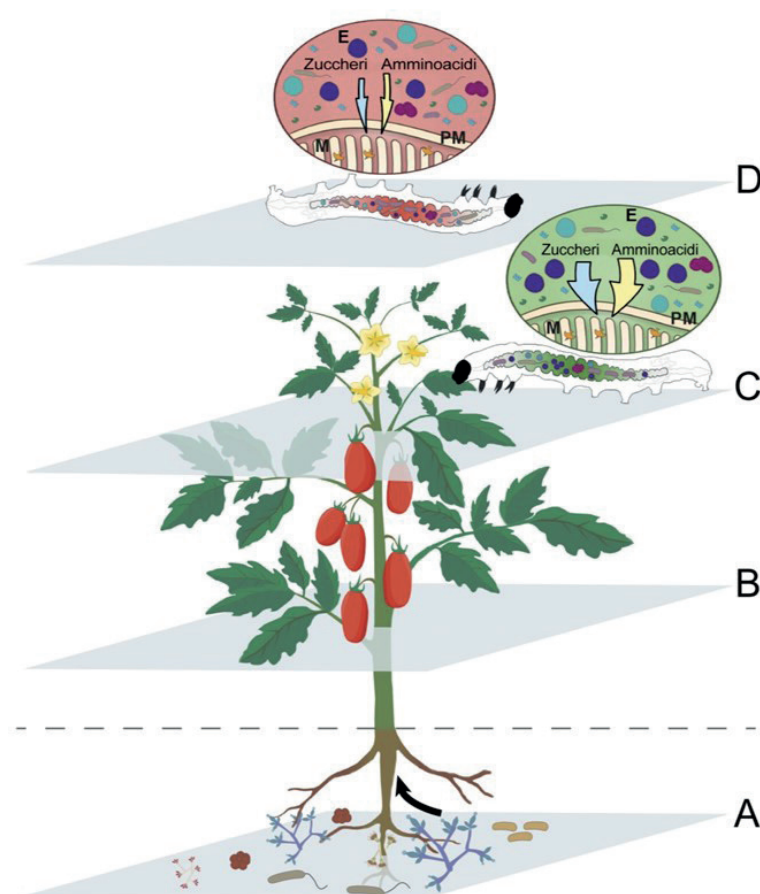


Fig. 1 Rappresentazione schematica delle interazioni fra la pianta di pomodoro (*Solanum lycopersicum*), il fungo del suolo *Trichoderma afroharzianum*, la larva del lepidottero *Spodoptera littoralis* e il suo microbiota intestinale. La colonizzazione delle radici di pomodoro da parte di *T. afroharzianum* (A) condiziona in modo sistemico la pianta (B), che, ingerita dalle larve di *S. littoralis* (D), causa rallentamento dello sviluppo e aumento della mortalità dell'insetto. I meccanismi alla base di questi effetti non dipendono da alterazioni della struttura dell'epitelio intestinale e/o della funzionalità digestiva dell'intestino, ma piuttosto dall'induzione di una disbiosi nella comunità microbica intestinale. La disbiosi causa la riduzione dell'apporto nutrizionale da parte di una componente microbica simbiotica (*Enterococcus casseliflavus*). E: *Enterococcus casseliflavus*; M: microvilli; PM: membrana peritrofica; le varie forme di colore arancione, verde e blu chiaro (legate ai microvilli o presenti nel lume intestinale delle larve) rappresentano gli enzimi digestivi; nel lume intestinale è anche rappresentata la comunità microbica.

Tale disbiosi è associata a un alterato profilo di espressione di geni immunitari nell'intestino e a una ridotta immunocompetenza sistemica delle larve, che risultano così più suscettibili all'attacco di agenti patogeni. Questo effetto del microbiota del suolo, che attraverso il potenziamento delle difese delle piante compete attivamente con agenti di stress biotici epigei per assicurarsi il ritorno di maggiori risorse, è contrastato da effetti opposti innescati da parassiti e patogeni dei fitofagi che, riducendo la competenza immunitaria dei loro insetti ospiti per poterli attaccare, ne determinano una minore capacità di elicitare le risposte di difesa delle piante, che risulterebbero, indirettamente, dannose anche per loro. Ciò discende dal fatto che immunità e composizione del microbiota intestinale negli insetti sono funzionalmente interconnessi. Ad esempio, la soppressione immunitaria indotta da un virus simbiote di alcuni parassitoidi di larve di lepidotteri determina un'alterazione del microbiota intestinale che, a sua volta, causa un abbassamento dei livelli di elicitatori di origine batterica coinvolti nell'induzione delle risposte di difesa delle piante. L'effetto risultante è un ovvio incremento della *fitness* dei parassitoidi che inducono tali alterazioni. Inoltre, queste modifiche metaboliche indotte in pianta hanno effetti non solo sulle interazioni epigee appena descritte, ma possono avere effetti anche sulle interazioni fra la pianta e i microrganismi del suolo, condizionando la strutturazione della comunità microbica della rizosfera, in linea con l'esigenza di ridurre l'induzione di risposte di difesa della pianta.

Queste evidenze sperimentali mettono in risalto che per comprendere i complessi meccanismi alla base delle intricate interazioni multitrofiche è fondamentale considerare le "entità" interagenti come olobionti e che la propagazione di queste onde di perturbazione opposte, che attraversano livelli trofici differenti, è in parte

mediata dalla cross-modulazione tra il microbioma intestinale e la risposta immunitaria, aspetto funzionale di ampia validità, ben caratterizzato negli insetti e in altri animali, compresi i mammiferi. Pertanto, gli effetti che agenti di stress, sia biotici che abiotici, possono avere su microbiota intestinale e immunità vanno considerati con grande attenzione poiché possono avere un impatto rilevante sulle interazioni. Questa assunzione è corroborata da diverse osservazioni sperimentali sugli effetti che alcuni agrofarmaci di sintesi, come gli insetticidi neonicotinoidi, hanno sulla competenza immunitaria e la composizione del microbiota intestinale, concorrendo al declino della salute delle api e alla proliferazione di parassiti e patogeni che si osserva in associazione alla sindrome del collasso delle colonie. La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano le interazioni fra olobionti è, quindi, di cruciale importanza per analizzare la dinamica delle reti trofiche, per studiare in modo approfondito le interazioni che si instaurano fra regni diversi e comprenderne il significato funzionale. Questo aspetto è essenziale per valutare il rischio associato a qualsiasi strumento o agente di controllo utilizzato in agricoltura per il controllo di patogeni e insetti dannosi, in particolare per valutare l'impatto che essi possono avere sulle reti trofiche e quindi sugli ecosistemi.

Tuttavia, la transizione dalla conoscenza molecolare delle interazioni fra olobionti alla valutazione delle loro implicazioni a livello di popolazione, comunità ed ecosistema è molto complessa. Sono necessari approcci modellistici che prendano in considerazione fattori dipendenti dal contesto spazio-temporale, indispensabili per valutare le modifiche del sistema in risposta a una perturbazione applicata a una qualsiasi delle sue componenti. Questi sistemi possono essere efficacemente rappresentati da reti di interazioni, dove i nodi sono le componenti individuali e i segmen-

ti le loro interazioni. L'analisi di queste reti consente di individuare i nodi-chiave, di comprendere i modelli di connettività e di predire come le perturbazioni applicate in un punto specifico possano influenzare la dinamica e la stabilità dell'intero sistema. Questi sono i principali obiettivi che la ricerca deve perseguire per potere comprendere l'intricato funzionamento degli ecosistemi e predirne il comportamento in scenari mutevoli, al fine di sviluppare strategie efficaci per ridurre l'impatto ambientale delle attività umane, fra le quali l'agricoltura ha un peso rilevante.

Un approccio di questo tipo rende possibile la valutazione del rischio associato all'uso di qualsiasi strategia e/o strumento di protezione della produzione agricola, inclusi gli agrofarmaci, per i quali esiste una consolidata e valida procedura di valutazione del rischio tossicologico, mentre manca una procedura di valutazione olistica, basata su solide evidenze scientifiche, dell'impatto che queste sostanze hanno sulle interazioni trofiche che sono alla base della stabilità degli agroecosistemi, garantendone, così, la loro resilienza. Questa è un'importante esigenza non solo per gli agrofarmaci di sintesi, ma anche per tutti gli antagonisti naturali degli agenti dannosi alle piante e molecole di varia origine rientranti fra i pesticidi considerati a basso rischio tossicologico, ma che non necessariamente lo sono anche a livello ecologico. Dare una risposta concreta in questa direzione fornirebbe un notevole contributo al complesso scenario di valutazione del rischio, rendendolo molto più completo, e garantirebbe le conoscenze di base per una valutazione degli effetti associati all'uso di determinate sostanze/organismi molto più ampia e realistica.

Le interazioni antagonistiche degli insetti come fonte di nuovi strumenti e strategie di bioprotezione delle piante

Gli insetti all'interno delle reti trofiche degli

ecosistemi terrestri hanno instaurato innumerevoli forme di simbiosi che vanno dal mutualismo all'antagonismo. Il mutualismo, in molti casi, ha consentito la colonizzazione di nicchie ecologiche particolarmente difficili dal punto di vista nutrizionale. Il controllo simbiotico degli insetti, proposto in particolare per i fitomizi, è finalizzato proprio all'interruzione di un intimo mutualismo con specifici microrganismi, essenziale per la sopravvivenza. Diverse sono le strategie perseguibili a tale fine, ma la loro trattazione esula dalle finalità di questo contributo, che, invece, è focalizzato sulla utilizzazione delle conoscenze dei meccanismi sottesi alle interazioni antagonistiche, modellate da lunghi processi co-evolutivi, al fine di mimare strategie naturali di soppressione degli insetti. Lo studio dei meccanismi di virulenza e delle barriere di difesa che si contrappongono nelle diverse interfacce di contatto fra gli insetti e i loro antagonisti naturali consente di individuare nuove molecole con attività insetticida o geni la cui alterazione dei livelli di espressione può determinare una riduzione della *fitness* delle specie dannose. Questa non è certamente una novità, se si considera la notevole letteratura relativa alle sostanze insetticide di origine vegetale e microbica e i non pochi prodotti commerciali da esse derivati, non necessariamente a basso impatto ambientale e tossicologico solo perché di origine naturale.

In natura, le barriere di difesa delle piante sono molteplici, complementari e sinergiche, il cui effetto complessivo, non di rado, passa attraverso l'induzione di modifiche del microbiota intestinale dei fitofagi, attraverso forme di disbiosi disfunzionali che, talora, vedono talune specie batteriche passare da commensali a patogene. Tali barriere di difesa delle piante vengono attivate attraverso meccanismi di trasduzione del segnale di danno, i cui dettagli molecolari sono oggetto di approfonditi studi funzionali. Le crescenti conoscenze

che ne scaturiscono consentono la definizione di strategie di modulazione dei percorsi di attivazione delle risposte di difesa, anche attraverso l'utilizzazione di molecole segnale prodotte dalle piante in risposta al danno.

In questo ambito, un esempio molto interessante dal punto di vista applicativo è l'uso di un peptide ormonale, la sistemina, originariamente individuata in pomodoro e poi in altre solanacee, la cui somministrazione in pianta, ottenibile non solo attraverso un approccio transgenico, ma anche con trattamento fogliare a dosi femtomolari, induce l'espressione di geni di resistenza che esercitano un'efficace azione di controllo nei confronti di larve di lepidottero (*S. littoralis*) e di patogeni necrotrofici (*Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea*). Studi più recenti hanno dimostrato che la porzione del pro-ormone prosistemina, che precede la sequenza del peptide attivo, ha una spiccata capacità di attivazione di analoghe risposte di difesa in pianta contro parassiti animali e patogeni. L'analisi *in silico* di queste sequenze ha consentito l'individuazione di brevi regioni ripetute, facilmente sintetizzabili, che inducono, a seguito di trattamenti fogliari o radicali a dosaggi femtomolari, efficaci risposte di difesa non solo nelle solanacee. Inoltre, piante trattate con questi peptidi presentano incrementi di crescita e di produzione. Tali peptidi, coperti da brevetto internazionale, rappresentano uno strumento molto promettente per lo sviluppo di prodotti commerciali in grado di stimolare crescita e difesa delle piante. Inoltre, l'uso combinato di questi peptidi con microrganismi benefici mostra interessanti effetti sinergici certamente degni di attenzione.

Passando dall'interfaccia pianta-insetto al livello trofico superiore insetto-antagonisti naturali, ritroviamo un serbatoio di biodiversità molecolare ricco di soluzioni in grado di impattare in modo negativo sul-

la fisiologia e sopravvivenza degli insetti, sviluppate attraverso il continuo confronto evolutivo fra strategie di virulenza di chi attacca e barriere immunitarie di chi si difende. I predatori, quali ad esempio ragni e scorpioni, così come alcuni imenotteri parassitoidi (ectofagi che inducono paralisi dell'ospite) hanno veleni che contengono un numero significativo di tossine, molte delle quali colpiscono il sistema nervoso, in grado di indurre paralisi e morte negli invertebrati ospiti. In alcuni casi queste neurotossine sono altamente selettive, avendo tossicità elevata nei confronti degli artropodi e nulla per i mammiferi. Ciò rende queste molecole particolarmente interessanti per il controllo degli insetti dannosi e sono impiegate in molte attività di sviluppo industriale di nuovi prodotti insetticidi. Poiché queste neurotossine sono essenzialmente peptidi o proteine, la messa a punto di adeguate formulazioni deve prevedere lo sviluppo di strategie per esaltare la permeabilità intestinale nei loro confronti, naturalmente ridotta o nulla, in modo da renderle attive anche a seguito di somministrazione orale. Questo obiettivo viene perseguito sviluppando proteine di fusione costituite dalla neurotossina bioattiva e da un dominio proteico che ne facilita il passaggio attraverso la barriera intestinale (Fig. 2). Fra le diverse opzioni disponibili, ci sono la lectina del bucanave o l'albumina bovina, proteine in grado di superare tale barriera e che si sono dimostrate validi *carrier*. La produzione su scala industriale di queste proteine di fusione può essere realizzata in modo economicamente sostenibile utilizzando come sistema di espressione il lievito *Pichia pastoris*.

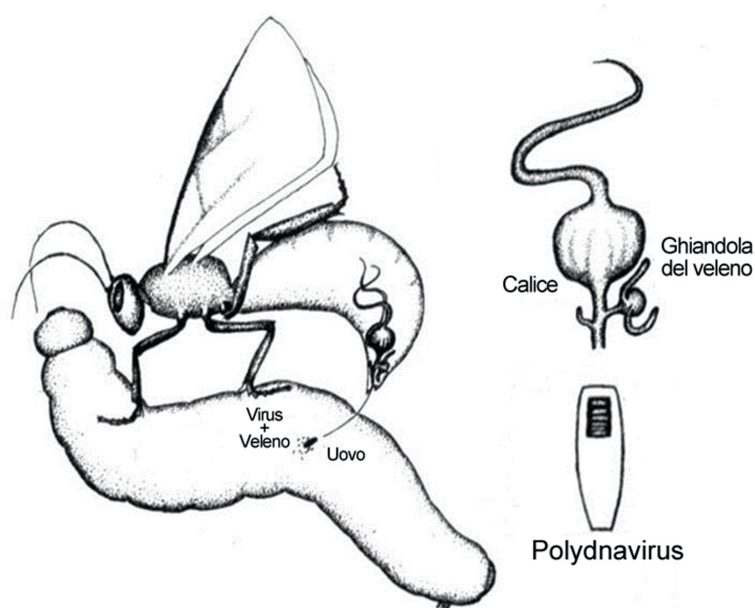


Fig. 2 Le femmine di alcuni imenotteri parassitoidi endofagi di larve di lepidotteri iniettano nell'ospite con l'ovopositore l'uovo e secreti materni, veleno e fluido del calice ovarico, quest'ultimo ricco di virus appartenenti alla famiglia Polydnviridae. Questi secreti hanno un ruolo fondamentale nella regolazione della fisiologia dell'ospite perché inducono immunosoppressione e una serie di alterazioni metaboliche e neuroendocrine necessarie a favorire lo sviluppo degli stadi giovanili del parassitoide.

Le femmine adulte dei parassitoidi endofagi di insetti mostrano strategie molto fini di regolazione della fisiologia dell'ospite, che non viene paralizzato o portato a morte in tempi rapidi, ma soggiace a una profonda soppressione del sistema immunitario e a diverse alterazioni metaboliche, di sviluppo e riproduzione. La risultante regolazione dell'ospite ha essenzialmente la funzione di evitare la soppressione immunitaria delle uova del parassitoide o dei suoi stadi giovanili e di realizzare nel corpo della vit-

tima le condizioni nutrizionali idonee a garantirne lo sviluppo ottimale. I fattori di regolazione coinvolti nell'induzione di queste modifiche funzionali sono di origine principalmente materna, in quanto le femmine iniettano all'ovideposizione il veleno e, in alcuni casi, anche virus simbiotici (polydnvirus) che codificano fattori di virulenza esclusivamente espressi nei tessuti dell'ospite che sono in grado di infettare, senza replicarsi (Fig. 3).

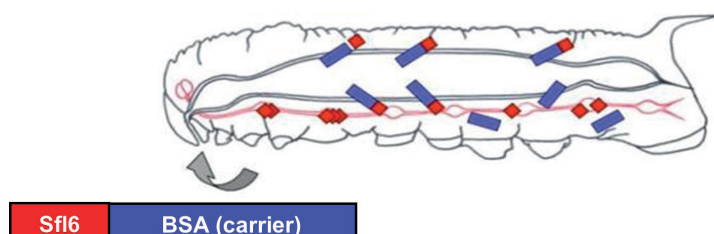


Fig. 3 La neurotossina Sfl6, presente nel veleno del ragno predatore *Segestria florentina*, interferisce con la trasmissione dell'impulso nervoso alterando i canali voltaggio-dipendenti per il sodio degli artropodi. Per consentire a questa molecola di raggiungere il target (le cellule del sistema nervoso) e di esercitare la sua azione tossica a seguito di somministrazione orale, è necessario veicolarla attraverso la barriera intestinale, naturalmente non permeabile alla neurotossina. L'utilizzo di una proteina di fusione con l'albumina bovina (BSA) ne consente il trasporto transepiteliale, data la capacità della BSA di essere assorbita per transitosi.

Pertanto, veleno e polydnavirus sono un “concentrato naturale” di molecole che hanno un notevole impatto negativo sulla fisiologia e sopravvivenza degli insetti e rappresentano, quindi, un serbatoio unico di molecole naturali a potenziale azione insetticida. Esse possono essere utilizzate alla stessa stregua delle neurotossine presenti nel veleno dei predatori e di altri parassitoidi, attraverso lo sviluppo di prodotti di fusione che sono in grado di superare la barriera intestinale e raggiungere i *target* presenti nella cavità del corpo dell'insetto (emocele). Recenti studi hanno dimostrato, però, che una proteina codificata da un polydnavirus associato a un parassitoide di larve di lepidotteri, ricca di domini ripetuti di anchirina, esercita da sola tossicità orale nei confronti del lepidottero *S. littoralis*, dell'afide delle leguminose, *Acyrtosiphon pisum*, e della mosca mediterranea della frutta, *Ceratitis capitata*, interferendo con la capacità di assorbimento dei nutrienti a livello intestinale e/o alterando la struttura epiteliale dell'intestino medio.

Lo studio delle basi funzionali delle interazioni ospite-parassitoide ha consentito di individuare i target dei fattori di virulenza del parassitoide nell'insetto ospite e i percorsi di regolazione fisiologica da essi controllati. Ciò ha permesso l'identificazione dei geni immunitari dell'ospite la cui modulazione negativa in seguito alla parassitizzazione genera fenotipi immunosoppressi. Tali fenotipi possono essere riprodotti in modo molto efficiente attraverso silenziamento mediato da RNA interference (RNAi) dei geni individuati. Di particolare interesse è risultata l'induzione di un fenotipo immunosoppresso attraverso il silenziamento nelle larve di *S. littoralis* di un gene immunitario denominato *S102*. Le larve che ingeriscono il dsRNA102 sono molto più suscettibili all'azione della δ endotossina del batterio *Bacillus thuringiensis*, in quanto la setticemia letale che essa induce risulta molto più marcata in queste

larve rispetto ai controlli, con una riduzione della DL_{50} di un fattore superiore a 5. Questa sinergia consente una significativa riduzione dei dosaggi, con ovvi vantaggi economici e un più basso rischio d'insorgenza di resistenza. Inoltre, dal punto di vista ecologico, una strategia di lotta che esalta il contributo degli agenti di controllo biologico senza rilasciare sostanze tossiche tutela i servizi ecosistemici, riducendo il rischio che si inneschino squilibri nelle reti trofiche quale conseguenza dell'immissione nell'ambiente di molecole ad attività insetticida di qualsiasi origine.

Il gene *S102*, oltre a essere espresso nelle cellule immunitarie e avere un ruolo nelle risposte di difesa dell'insetto, viene espresso anche negli embrioni, regolandone lo sviluppo. Il silenziamento di questo gene durante lo stadio embrionale, attraverso immersione delle uova in una soluzione contenente dsRNA102, comporta una mortalità prossima al 90% e le poche larve che schiudono mostrano, a loro volta, una mortalità prossima all'80% a due giorni dalla schiusa. Questo risultato è anch'esso estremamente interessante, visti i recenti risultati in termini di formulazione di prodotti a base di dsRNA che ne consentono il passaggio sia attraverso la cuticola sia attraverso il corion delle uova. La definizione di formulazioni di sostanze di origine naturale o di prodotti a base di microrganismi volte a proteggere la componente attiva dalla degradazione ambientale e/o ad aumentare il raggiungimento del *target*, è uno dei più importanti ambiti da sviluppare nell'immediato futuro, sfruttando in modo virtuoso gli enormi progressi tecnologici realizzati in questa importante area di ricerca e sviluppo.

Conclusioni

Questa breve nota, senza avere la pretesa della completezza di analisi della vasta letteratura esistente sui numerosi aspetti considerati, consente di apprezzare la

grande importanza che hanno per la gestione ambientale le conoscenze dei meccanismi alla base del funzionamento delle complesse interazioni esistenti nelle reti trofiche degli ecosistemi naturali e agrari. Attraverso queste conoscenze è possibile, infatti, non solo sviluppare nuovi metodi di bioprotezione delle piante, apprendendo dalla natura strategie di soppressione degli insetti dannosi, ma anche misurarne il loro impatto sulle relazioni trofiche che sono alla base della stabilità e resilienza degli ecosistemi. Tutto questo dà un notevole contributo all'incremento della sostenibilità della produzione alimentare, grazie a una conoscenza approfondita della natura, da usare sempre più responsabilmente per preservarla e consegnarla alle generazioni future.

Bibliografia

1. Annoscia, D., Di Prisco, G., Becchimanzi, A., Caprio, E., Frizzera, D., Linguadoca, A., Nazzi, F., Pennacchio, F. (2020) Neonicotinoid Clothianidin reduces honey bee immune response and contributes to Varroa mite proliferation. *Nature Communications*, 11 (1): 5887. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19715-8>
2. Banerjee, S., van der Heijden, M.G.A. (2023). Soil microbiomes and one health. *Nature Reviews Microbiology*, 21(1):6-20. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00779-w>
3. Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D. et al. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8 (103). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
4. Biere, A., Bennett, A.E. (2013). Three-way interactions between plants, microbes and insects. *Functional Ecology*, 27:567-573. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12100>
5. Caccia, S., Di Lelio, I., La Stora, A., Marinelli, A., Varricchio, P., Franzetti, E., Banyuls, N., Tettamanti, G., Casartelli, M., Giordana, B., Ferré, J., Gigliotti, S., Ercolini, D., Pennacchio, F. (2016). Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (34): 9486-9491. DOI: <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1521741113>
6. Caccia, S., Astarita, F., Barra, E., Di Lelio, I., Varricchio, P., Pennacchio, F. (2020) Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity by feeding *Spodoptera littoralis* larvae with bacteria expressing immune suppressive dsRNA. *Journal of Pest Science*, 93: 303-314. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01140-6>
7. Castaldi, V., Langella, E., Buonanno, M., Di Lelio, I., Aprile, A. M., Molisso, D., Criscuolo, M. C., D'Andrea, L. D., Romanelli, A., Amoresano, A., Pinto, G., Illiano, A., Chiaiese, P., Becchimanzi, A., Pennacchio, F., Rao, R., Monti, S. M. (2024). Intrinsically disordered Prosystemin discloses biologically active repeat motifs. *Plant Science*, 340: 111969. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111969>
8. Di Lelio, I., Forni, G., Magoga, G., Brunetti, M., Bruno, D., Becchimanzi, A., De Luca, M.G., Sinno, M., Barra, E., Bonelli, M., Frusciante, S., Diretto, G., Digilio, M.C., Woo, S.L., Tettamanti, G., Rao, R., Lorito, M., Casartelli, M., Montagna, M., Pennacchio, F. (2023) A soil fungus confers plant resistance against a phytophagous insect by disrupting the symbiotic role of its gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120 (10): e2216922120. DOI: <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2216922120>
9. Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F. (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (46): 18466-18471. DOI: <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1314923110>
10. Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., Pennacchio, F. (2016) A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and Health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (12): 3203-3208. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1523515113>
11. Levin, S. A. (1992). The problem of pattern and scale in ecology: The Robert H. MacArthur Award Lecture. *Ecology*, 73(6):1943-1967. <https://doi.org/10.2307/1941447>
12. Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Vedova, G.D., Cattonaro, F., Caprio, E., Pennacchio, F. (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens*, 8 (6): e1002735. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002735>
13. Pennacchio, F., Strand M. R. (2006) Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 51: 233-258. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151029.
14. Shikano, I., Rosa, C., Tan, C. W., Felton, G. W. (2017) Tritrophic Interactions: Microbe-Medi-

- ated Plant Effects on Insect Herbivores. Annual Review of Phytopathology*, 55: 313-331. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035319.
15. Topping, C.J., Alroe, H.F., Farrell, K.N., Grimm, V. (2015) *Per Aspera ad Astra: Through Complex Population Modeling to Predictive Theory. American Naturalist*, 186(5):669-674. <https://doi.org/10.1086/683181>



22° Congresso Nazionale

Società Italiana di Tossicologia

**Il rapporto dose-effetto
nella valutazione
del rischio tossicologico**

BOLOGNA

10-12 Febbraio 2025



22° Congresso Nazionale

Società Italiana di Tossicologia

BOLOGNA

10-12 Febbraio 2025

Il rapporto dose-effetto nella valutazione del rischio tossicologico

TOPICS

- Alimenti
- Biotrasformazione Xenobiotici
- Botanicals e integratori alimentari
- Farmaci
- Fitofarmaci
- Nanomateriali
- Nuovi Approcci Metodologici (NAM)
- Tossicologia clinica e analitica
- Tossine naturali

SEDE DEL CONGRESSO

Savoia Hotel Regency
Via del Pilastro 2
40127 Bologna
www.savoia.it

SEGRETERIA SCIENTIFICA



SITOX

Società Italiana di Tossicologia
Via Giovanni Pascoli 3
20129 Milano
sitox@segr.it
www.sitox.org

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA



Via Sassonia, 30
47922 Rimini
T 0541 305873
c.imola@adriacongrex.it
www.adriacongrex.it

Immagine di copertina

Dea Igea, figlia di Asclepio e di Lampeggia, venerata come dea della salute. Veniva raffigurata ora sotto l'aspetto di una giovane donna prosperosa nell'atto di dissetare un serpente, ora seduta con la mano sinistra appoggiata a un'asta, mentre con l'altra mano porge una patera a un serpente che, lambendola, si innalza da un'ara posta davanti a lei.

Il culto era associato a quello del padre e di Panacea, sua sorellastra. Oltre che dea della salute (o del risanamento in generale), era la divinità di ogni cosa pulita. A differenza del padre, direttamente e unicamente associato alla cura delle malattie, Igea veniva invece associata alla prevenzione dalle malattie e al mantenimento dello stato di salute.

La presenza del serpente è dovuta al fatto che gli antichi attribuivano al rettile intelligenza e sentimenti particolari: suscitava grande impressione per la vita misteriosa e sotterranea, per la capacità di secernere veleni mortali, per la grande velocità, nonché per l'abilità nell'ipnotizzare le prede. Il serpente è comunque legato da sempre al mondo della farmacologia: il suo veleno, in minime dosi, rappresentava spesso l'unico rimedio contro moltissime malattie.

I frammenti in cui è scomposta l'immagine rappresentano uno specchio che riflette le diverse sfaccettature della nostra disciplina (ambientale, clinica, preclinica etc).



Siamo lieti di informarvi che SITOX è operativa anche sui principali canali social: Facebook e Twitter

Potete seguire le nostre attività su questi canali:

Facebook: <https://www.facebook.com/societa.tossicologia.sitox/>

Twitter: <http://twitter.com/sitoxita>

Vi chiediamo di sostenere le attività di comunicazione di SITOX, mettendo mi piace alla pagina Facebook, seguendo il profilo Twitter e ricondividendo i post che ritenete interessanti per i vostri contatti, in modo da ottenere maggior visibilità per le attività di comunicazione della Società.

Il Giornale Italiano di Tossicologia è scaricabile online.

Visita il nostro sito www.sitox.org