



Groene gewasbeschermingsmiddelen, een inventarisatie

Menno van der Voort, Tijs van den Bosch, Mariël Pikkemaat, Theo de Rijk



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Groene gewasbeschermingsmiddelen, een inventarisatie

Menno van der Voort, Tijs van den Bosch, Mariël Pikkemaat, Theo de Rijk

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Food Safety Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research en gesubsidieerd door het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, in het kader van het Beleidsondersteunend onderzoekthema 'Healthy & Safe Food Systems' (projectnummer KB-37-002-012).

Wageningen, maart 2024

WFSR-rapport 2023.017

Menno van der Voort, Theo de Rijk, Mariël Pikkemaat, Tijs van den Bosch, 2020. *Groene middelen, een inventarisatie*. Wageningen, Wageningen Food Safety Research, WFSR-rapport 2023.017. 24 blz.; 0 fig.; 2 tab.; 46 ref.

Projectnummer: 1207387501

BAS-code: PJR 2021 KB-37-002

Projecttitel: Detection and determination of active substances in bacterial, fungal, or viral based plant protection products (PPPs)

Projectleider: T.C. de Rijk

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/653264> of op <http://www.wur.nl/food-safety-research> (onder WFSR publicaties).

© 2024 Wageningen Food Safety Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research. Hierna te noemen WFSR.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het WFSR is het niet toegestaan:

- a. *dit door WFSR uitgebrachte rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b. *dit door WFSR uitgebrachte rapport, c.q. de naam van het rapport of WFSR, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c. *de naam van WFSR te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

Postbus 230, 6700 AE Wageningen, T 0317 48 02 56, E info.wfsr@wur.nl, www.wur.nl/food-safety-research. WFSR is onderdeel van Wageningen University & Research.

WFSR aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

WFSR-rapport 2023.017

Verzendlijst:

- NVWA, t.a.v. dhr. Haico Marsman, Ronald van Lubek
- Ctgb, t.a.v. dhr. Rob van Drent

Inhoud

Samenvatting	7
1 Inleiding	9
2 Inventarisatie methoden	10
2.1 Bestaande en potentiële analysemethoden voor groene gewasbeschermingsmiddelen	10
2.1.1 Kwantificatiemethoden	10
2.1.2 Identificatiemethoden	11
2.1.3 Algemene discussie analysemethoden	12
3 Experimentele toetsing van zes <i>Bacillus thuringiensis</i>-bevattende groene gewasbeschermingsmiddelen	13
3.1 Kwantificering van <i>B. thuringiensis</i> in de onderzochte gewasbeschermingsmiddelen	14
3.2 Whole Genome Sequencing analyse van <i>B. thuringiensis</i> isolaten	14
3.3 Bacteriële verontreiniging in <i>B. thuringiensis</i> producten	14
4 Conclusie en aanbevelingen	16
Literatuur	17
Bijlage 1 Beoordeling en overzicht van methoden voor identificatie en kwantificering van groene gewasbeschermingsmiddelen	19



Samenvatting

Chemische gewasbeschermingsmiddelen (GWBs) worden nauwgezet gevolgd door het publiek, ngo's en autoriteiten (b.v. neonicotinoïden, fipronil). De verwachting is dat de toepassing van chemische GWBs de komende jaren verder beperkt zal worden. Ter bestrijding van plagen en ziektes zullen de chemische middelen in toenemende mate vervangen worden door "groene" producten, op basis van b.v. bacteriën, schimmels of virussen.

Uit een eerdere survey (uitgevoerd 17-7-2019) naar groene GWBs is gebleken dat er 51 van dit soort middelen als GWB in Nederland geregistreerd staan op basis van 11 bacteriële, 14 schimmel- en drie virale biologische agentia. WFSR heeft tot dusver geen methoden operationeel voor monitoring en controle van deze GWBs, noch voor identificatie noch voor kwantificering van de biologische agentia in deze GWBs. Ook zijn er geen methoden voor het aantonen van de werkzame stoffen van deze middelen in voeding en diervoeder beschikbaar.

Binnen dit project is een verkennende literatuurstudie uitgevoerd naar bestaande identificatie methoden voor het testen van groene GWBs en is hun praktische haalbaarheid beoordeeld. De EFSA-assessments welke zijn opgesteld bij de aanvraag voor toelating van de producten op de markt zijn hierbij als basis gebruikt. Het resultaat laat een grote diversiteit zien in de kwaliteit en effectiviteit van de analysemethoden. Slechts voor een beperkt aantal van de door EFSA geëvalueerde agentia blijken geschikte identificatie methoden beschikbaar. Dit betreft methoden gebaseerd op DNA sequentie informatie. Beschreven methoden gebaseerd op DNA- en eiwit "fingerprinting" technieken worden ongeschikt geacht omdat het onderscheidend vermogen van deze methoden te gering is voor onweerlegbare identificatie. Voor een aantal producten wordt in de EFSA assessments door de producenten geen duidelijke identificatiemethode aangedragen. Dit is opvallend omdat competente autoriteiten dit vereisen bij de registratie van een GWB.

Als proof of principle zijn zes groene GWBs op basis van *B. thuringiensis* onderworpen aan laboratoriumonderzoek. Deze zes GWBs zijn bestudeerd op de aanwezigheid van *B. thuringiensis* met conventionele microbiologische methoden en werden vervolgens geïdentificeerd met behulp van Whole Genome Sequencing (WGS). Daarnaast zijn de producten getest op bacteriële contaminatie. Met behulp van WGS analyse bleek het mogelijk om onderscheid te maken tussen de verschillende stammen die in de diverse producten aanwezig zijn. Tevens is bacteriële contaminatie gevonden in enkele producten dat erop wijst dat ze verontreinigd zijn met pathogene sporevormers, zoals *B. cereus* en *C. perfringens*.

Concluderend kan worden gesteld dat uitsluitend WGS of de methode van het sequencen van markergenen (indien de onderzochte stammen niet nauw-verwant zijn) voldoende onderscheidend vermogen hebben om als identificatiemethode voor op micro-organismen gebaseerde groene GWBs te dienen. Echter, aangezien de producenten van deze middelen de genetische informatie van de gebruikte stam (tot dusver) niet openbaar maken en doorgaans als vertrouwelijk beschouwen, zijn de juridische consequenties van het publiceren en dus openbaar maken van de WGS uitkomsten in deze onderzoekscontext nog onduidelijk. Het ontbreken van genetische detailinformatie bemoeilijkt daarnaast het ontwerpen van standaard controlemethoden voor deze groene GWBs. Een dringend advies is dan ook om als dwingende voorwaarde te stellen bij toekomstige registraties van producten gebaseerd op micro-organisme dat de genoomsequentie van het betreffende organisme (geheel of gedeeltelijk) beschikbaar is voor de controlerende instanties.

De uitkomst van dit project is een startpunt voor de verdere ontwikkeling en toepassing van methoden voor monitoring en controle van groene gewasbeschermingsmiddelen.

1 Inleiding

Het gebruik van traditionele chemische gewasbeschermingsmiddelen (GWBs) in de land- en tuinbouw staat onder grote maatschappelijke druk. Het gebruik wordt in toenemende mate aan banden gelegd en hieraan gekoppeld is de trend ontstaan deze middelen meer en meer te vervangen door zgn. "groene" producten, alternatieven gebaseerd op natuurlijke "actieve stoffen" o.a. bacteriën, schimmels en virussen (biologische agentia).

Een eerder uitgevoerde survey naar toegelaten groene GWBs in Nederland leverde 11 bacteriële, 14 schimmel en drie virale biologische agentia registraties op, met een totaal van de 51 formuleringen van GWBs voor professioneel en thuis gebruik (17-7-2019, CTGB, <https://www.ctgb.nl/>). Hieronder bevonden zich drie *Bacillus thuringiensis* spp., drie *Bacillus amyloliquefaciens* (voorheen *Bacillus subtilis*) spp., en vijf *Trichoderma* spp.

WFSR heeft geen methoden operationeel voor de controle van deze producten. Het ontbreekt aan standaardmethoden voor identificatie en kwantificering van de biologische agentia in deze gewasbeschermingsmiddelen, maar ook voor de detectie van deze biologische agentia in voedsel en diervoeder. Tenslotte ontbreekt het aan richtlijnen/handvaten om het derde kwaliteitscriterium, de afwezigheid van (biologische en chemische) contaminanten, te adresseren.

Om deze problematiek onder de aandacht te brengen is in 2020 een R&D project (SIP) uitgevoerd, bestaande uit de volgende twee onderdelen:

- Inventariserende literatuurstudie (gebaseerd op EFSA product assessments) van bestaande en potentiële analyse methoden voor agentia zoals aanwezig in groene GWBs.
- Een 'proof of principle' onderzoek bij vijf producten op basis van *B. thuringiensis*.

In de inventariserende literatuurstudie is op basis van de EFSA product assessments van de biologische agentia gekeken naar de mate waarin de beschreven methoden in staat zijn authenticiteit van het middelen aan te tonen. Daaruit is een rangschikking gemaakt van hoe goed de verschillende agentia kunnen worden beoordeeld op authenticiteit en hoe goed de werkzame stoffen gekwantificeerd kunnen worden. In het tweede onderdeel van het onderzoek was de focus op meer inzicht te krijgen in mogelijkheden om *B. thuringiensis* producten te onderzoeken. *B. thuringiensis* producten zijn gekozen omdat 90% van de wereldwijde verkoop van biopesticiden producten betreft die zijn gebaseerd op *B. thuringiensis* (Sanchis & Bourguet, 2009). Bij deze onderzoeken is gekeken naar de aanwezigheid van de juiste *B. thuringiensis* stam door middel van klassiek microbiologische methoden in combinatie met Whole Genome Sequencing (WGS).

2 Inventarisatie methoden

2.1 Bestaande en potentiële analysemethoden voor groene gewasbeschermingsmiddelen

Binnen de EU zijn 41 biologische agentia als GWB toegelaten (https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances_en, medio 2019) waarbij sommige biologische agentia met verschillende strains vertegenwoordigd zijn. Van deze GWBs is geïnterpreteerd welke analysemethoden geschikt zijn om deze agentia te identificeren en te kwantificeren. Het actieve bestanddeel van 19 van deze middelen is een schimmel, van 16 middelen zijn het bacteriën en van vier middelen zijn het virussen. Van twee groene GWBs is het actieve bestanddeel geen levend organisme, maar een extract of product ervan. In hoofdstuk 2.1.1 en 2.1.2 worden kwantificatie- en identificatiemethoden besproken die toegepast kunnen worden bij het analyseren van deze 41 biologische agentia.

Een overzicht van de 41 groene gewasbeschermingsmiddelen en de individuele assessments hiervan m.b.t. potentiële analysemethoden staat vermeld in Bijlage 1.

2.1.1 Kwantificatiemethoden

Voor bijna alle biologische agentia die als actief bestanddeel een levende bacterie dan wel schimmel bevatten zijn klassieke microbiële methoden toepasbaar. Voor bacteriële producten kunnen Plate Counts uitgevoerd worden door verdunningen van het originele product uit te platen op nutriënt-agar. Producten op basis van een schimmel kunnen op vergelijkbare wijze geteld worden op gist-malt extract agar.

Voor een aantal biologische agentia is in de EFSA conclusies geen kwantificatiemethode beschreven. Dit betreft *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* AM65-52, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strains ABTS-351, PB54, SA-11, SA-12 and EG2348, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* strains BIPESCO 5 en *Trichoderma harzianum* Rifai strain T-22 en ITEM-908. Het is echter wel de verwachting dat deze agentia op vergelijkbare manier gekwantificeerd kunnen worden als andere subspecies van dezelfde bacteria.

Kwantificatie van de overige biologische agentia (de virussen en non-microbials) is niet mogelijk door middel van tellingen op een voedingsbodem, aangezien deze geen kolonies vormen. Wel zijn er in de conclusies van de EFSA risk assessments een aantal alternatieve methoden beschreven voor kwantificering van deze middelen. Het virus CpGV, dat wordt gebruikt om fruitmotten (*Cydia pomonella*) te bestrijden, vormt grote granulaire occlusion bodies die zichtbaar zijn onder een lichtmicroscop. Deze zijn daardoor te kwantificeren. De concentraties van de overige drie gewasbeschermingsmiddelen (bevattende Pepino Mosaic virus varianten) zijn met kwantitatieve PCR te bepalen (Gutiérrez-Aguirre et al., 2009). Echter het is met kwantitatieve PCR niet vast te stellen of de virusdeeltjes daadwerkelijk actief, ofwel infectieus zijn. Voor het vaststellen van de aanwezigheid van actieve virusdeeltjes zijn zeer specifieke bioassays noodzakelijk, die voor deze virale agentia niet in de EFSA conclusies beschreven zijn. Deze bioassays zijn gebaseerd op het kweken van infecteerbare gastheer cellen, waardoor deze assays zowel bewerkelijk als duur zijn. Voor WFSR is het daarmee geen haalbare techniek om op te gaan zetten.

Kwantificatie van de non-microbials COS-OGA (een complex van oligochitosans en oligopectaten dat het immuunsysteem van tomatenplanten activeert) en Cerevisane (een extract van celwanden van een giststam dat hetzelfde effect heeft) moet plaatsvinden met (bio)chemische toetsing. Concentraties van COS-OGA zijn aan te tonen met colorimetrische methoden. Voor de kwantificatie van Cerevisane is gerapporteerd dat dit kan gebeuren met metingen van o.a. polysacchariden, koolhydraten en eiwitten door middel van gaschromatografie en massaspectrometrie.

2.1.2 Identificatiemethoden

Om de authenticiteit van aanwezige micro-organismen in groene GWBs te kunnen bevestigen is het van belang om geschikte identificatiemethoden beschikbaar te hebben. In dit onderzoek is de haalbaarheid (feasibility) bepaald van diverse potentieel geschikte analysemethoden. Deze beoordeling is gebaseerd op de EFSA assessments van elk van deze biologische middelen. In alle gevallen geldt dat inschatting van de accuraatheid van een identificatiemethode afhankelijk is van de beschikbare detailinformatie die betrekking heeft op dat specifieke organisme. Hieronder worden de gangbare methoden toegelicht.

2.1.2.1 Whole Genome Sequencing (WGS)

Whole genome sequencing, het bepalen van de volledige DNA sequentie van een organisme, is op dit moment de "golden standard" voor identificatie van een organisme. Bovendien is het toepasbaar op zowel virussen alsmede op micro-organismen uit alle domeinen van het leven.

Om tot een onweerlegbare identificatie van een organisme te kunnen komen is het noodzakelijk dat de volledige genoomsequentie van een organisme (en daarmee het actieve bestanddeel van een specifiek groen GWB) bekend is. WGS is relatief eenvoudig uit te voeren voor bacteriën, maar voor complexe genomen van eukaryoten zoals schimmels is het aanzienlijk moeilijker. Het ontbreken van volledige referentiegenomen vormt meestal de bottleneck voor onbetwistbare identificatie. Als niet voldoende onderscheidend vermogen mogelijk is, wordt fraude met nauwverwante organismen mogelijk. WGS is relatief duur en vereist expertise m.b.t. de data analyse. Binnen WFSR worden routinematig WGS analyses van bepaalde bacterie-species uitgevoerd, wat de implementatie van nieuw-te analyseren organismen eenvoudiger maakt.

WGS wordt in de risk assessments van de EFSA aangegeven als geschikte identificatiemethode voor *Bacillus amyloliquefaciens* str. FZb24, en voor het Pepino mosaic virus strain CH2 isolate 1906. Het is aannemelijk dat de methode ook goed te implementeren is voor de meeste andere bacteriële gewasbeschermingsproducten en eventueel ook schimmel- en virusgerelateerde producten.

2.1.2.2 Sequencing van genetische markergenen

Een alternatieve identificatiemethode is het beperken van het sequencen tot zogenaamde markergenen. Bepaalde DNA markers zijn bij uitstek geschikt voor het identificeren van doelorganismen. Welke dit zijn is afhankelijk van het doelorganisme. Er kan gekozen worden voor het sequencen van sterk geconserveerde regio's (bijvoorbeeld de ITS regio in schimmels, of het 16S rRNA gen in bacteriën), of voor het sequencen van niet-geconserveerde, stam-specifieke markergenen. Echter, hoe geconserveerder (d.w.z. de sequentie van het markergen blijft stabiel over lange evolutionaire periode) des te lager is het onderscheidend vermogen van de identificatie. Deze methode is dan minder geschikt om b.v. twee nauw-verwante stammen te onderscheiden.

Het sequencen van korte stukjes DNA m.b.v. Sanger sequencing is tegenwoordig erg goedkoop, zeker als de te gebruiken primers algemeen bekend zijn. Deze methode wordt door EFSA beoordeeld als geschikt en genoemd als de te gebruiken identificatiemethode voor o.a. *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 en DSM 14941, *Bacillus pumilus* QST2808, en *Lecanicilium muscarium* str. Ve6. Deze methode is geschikt voor identificatie, maar zoals genoemd is het onderscheidend vermogen sterk afhankelijk van het target gen. Daarnaast is de keuze van een geschikt target afhankelijk van beschikbare genetische informatie betreffende het doelorganisme.

2.1.2.3 DNA/eiwit fingerprinting methoden

Methoden als Ribotyping, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) en Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP) zijn analysemethoden die een uniek bandenpatroon op een gel genereren, welke vergeleken kan worden met databases van bekende profielen. Nadelen van deze methoden zijn dat resultaten vaak een interlaboratorium variatie vertonen, dat de interpretatie afhankelijk is van beschikbaarheid van referentiegegevens en dat het onderscheidend vrij laag is vanwege eerdergenoemde beperkingen in de keuzes van targets.

Fingerprinting methoden worden in de EFSA assessments genoemd als de identificatie methode van o.a. *Bacillus firmus* I-1582, *Coniothyrium minitans* strain CON/M/91-8 en *Pseudomonas* sp. strain DSMZ 13134. Omdat het onderscheidend vermogen niet hoog is en de methoden niet makkelijk vergelijkbaar zijn tussen laboratoria, zijn deze fingerprinting methoden ongeschikt voor laboratoria zoals WFSR die met veel verschillende soorten doelorganismen te maken hebben. Fingerprinting methoden zijn daarmee niet geschikt als identificatietechniek voor groene GWBs voor WFSR.

2.1.3 Algemene discussie analysemethoden

Naar aanleiding van bovenstaande inventarisatie van de methoden voor het bepalen van authenticiteit van de biologische agentia is een rangschikking van de beschikbare analysemethoden gemaakt per gewasbeschermingsmiddel (Bijlage 1). Deze beoordelingen zijn voornamelijk gebaseerd op de "Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance" die EFSA (EFSA assessment) heeft gepubliceerd.

Een terugkerend thema met betrekking tot de specificiteit van de verschillende detectiemethoden is dat het vaak niet duidelijk is wat het onderscheidend vermogen van de detectiemethode is. De inclusiviteit- en exclusiviteitsparameters zijn veelal onbekend of niet gerapporteerd in de EFSA assessments. Inclusiviteit geeft aan in welke mate een methode voldoet om correct het doelorganisme te identificeren, en exclusiviteit geeft aan in welke mate een methode voldoet om correct een non-doelorganisme uit te sluiten.

Als het onderscheidend vermogen van een identificatie methode niet voldoende is, is de methode niet geschikt om eventuele fraude met nauw verwante organismen vast te stellen. In een aantal EFSA assessments wordt geconcludeerd dat accurate identificatie van een product mogelijk is, bijvoorbeeld van *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 en DSM 14941, en het Pepino mosaic virus strain CH2. Echter, voor andere gewasbeschermingsmiddelen worden door EFSA beoordeelde methoden voor identificatie als minder accuraat beoordeeld, bijvoorbeeld bij middelen gebaseerd op *B. thuringiensis* en de non-microbiële middelen Cerevisane en COS-OGA.

Volgens de betreffende assessment van EFSA is *Bacillus amyloliquefaciens* goed te identificeren middels WGS, terwijl voor andere *Bacillus* strains WGS niet is opgevoerd als methode. Mogelijk is dit veroorzaakt doordat WGS ten tijde van de evaluatie van deze producten nog geen gangbare techniek was. Op dit moment is WGS de beste analysetechniek om het juiste onderscheidend vermogen te bereiken voor identificatie op stam niveau. Om onbetwistbare identificatie op basis van WGS mogelijk te maken is het noodzakelijk dat de sequentie informatie van het organisme waarop een product is gebaseerd, beschikbaar is. De species waarvoor WGS te implementeren is om de identificatie te verbeteren, mits de sequentie informatie bekend is, zijn aangegeven in Bijlage 1.

Voor meerdere GWBs gebaseerd op micro-organismen wordt de specificiteit van de voorgestelde identificatiemethode onvoldoende geacht. Het verdient dan ook sterk aanbeveling om in de productregistratie procedure een identificatiemethode op basis van specifieke marker genen te verplichten (waarbij aangetoond is dat deze voldoende differentiërend vermogen hebben om verschillende nauw gerelateerde stammen van elkaar te onderscheiden). Een alternatief is de producent te verplichten de sequentie informatie van de stam openbaar te maken om WGS analyses als identificatie methode te faciliteren.

3 Experimentele toetsing van zes *Bacillus thuringiensis*-bevattende groene gewasbeschermingsmiddelen

Om inzicht te krijgen in verschillende aspecten van het onderzoek van groene GWBs is *B. thuringiensis* als voorbeeld genomen.

Zoals eerder aangegeven is *B. thuringiensis* op basis van de beschikbare informatie uit EFSA assessments onvoldoende te bepalen op stam niveau. Dit wordt onder andere veroorzaakt doordat *B. thuringiensis* onderdeel uitmaakt van een nauw verwante groep van bacteriën, de *Bacillus cereus* groep, welke algemeen voorkomt in de bodem. Species die onderdeel uitmaken van deze groep zijn o.a. *B. thuringiensis* en de voedselpathogeen *B. cereus*, maar bijvoorbeeld ook *B. anthracis*, de veroorzaker van miltvuur. De verschillende species uit deze groep zijn genetisch nauw verwant en om onderscheid te kunnen maken is een analyse met een hoog onderscheidend vermogen noodzakelijk. Traditioneel worden de verschillende species uit deze groep onderscheiden op basis van fenotypische eigenschappen, zoals biochemische karakteristieken. De methoden hiervoor zijn vaak omslachtig en tijdrovend. Bovendien is het onderscheidend vermogen volstrekt ontoereikend om onderscheid te kunnen maken op stam niveau. Ze zijn daarmee ongeschikt om de authenticiteit van een specifiek biologisch agens vast te stellen.

Er zijn zes commerciële GWBs gebaseerd op *B. thuringiensis* onderzocht (zie Tabel 1). Ze zijn onderzocht op kwantiteit van het aanwezige *B. thuringiensis*, de specificiteit is onderzocht met WGS en tenslotte is gekeken naar mogelijke bacteriële verontreiniging van de GWBs. Dit laatste is van groot belang omdat *B. thuringiensis* nauw verwant is aan toxische bacteria als *B. cereus* en *B. anthracis*.

Tabel 1 Gewasbeschermingsmiddelen gebaseerd op *B. thuringiensis* welke zijn onderzocht in dit onderzoek.

GWB	Toelatingshouder	Active component (<i>Bacillus thuringiensis</i> strain)
Delfin WG	Mitsui AgriScience International Toelatingsnummer 10944	<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> , str SA-11
XenTari raupenfrei	Sumitomo Chemical Agro Europe Toelatingsnummer 12437	<i>Bt</i> subsp. <i>aizawai</i> , str ABTS-1857
Rupsvrij	Mitsui AgriScience International Toelatingsnummer 15977	<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> , str SA-11
Turex WG	Mitsui AgriScience International Toelatingsnummer 15039	<i>Bt</i> subsp. <i>aizawai</i> str GC-91
Turex spuitpoeder	Mitsui AgriScience International Toelatingsnummer 11702	<i>Bt</i> subsp. <i>aizawai</i> str GC-91
Costar WG	Mitsui AgriScience International Toelatingsnummer 15885	<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> , str SA-12

3.1 Kwantificering van *B. thuringiensis* in de onderzochte gewasbeschermingsmiddelen

Voor de kwantificering is een ISO-methode gebruikt voor het aantonen van *B. thuringiensis*/*B. cereus* (ISO 7932, inhouse equivalent MIC04-WV111). Een verdunningsreeks vanuit 1 gram product is uitgeplaat op specifieke MYP platen voor *B. thuringiensis*/*B. cereus*. Parallel hieraan is een verdunningsreeks op (meer generiek) TSA medium uitgeplaat. Beide methoden gaven vergelijkbare resultaten. Het aantal kolonie vormende eenheden (kve ofwel kiemgetal) in de geteste producten (Delfin, XenTari Raupenfri, Ecostyle Rupsvrij, Turex WG, Turex SP, Costar WG) bedroeg respectievelijk 0,73E+10, 2,30E+10, 5,70E+10, 4,40E+10, 3,05E+10 en 1,55E+10 kve per gram van het product. Deze hoge aantallen geven aan dat de GWBs, zoals verwacht, voornamelijk bestaan uit bacteriën. Een vergelijking met de dosis zoals aangegeven op de verpakking is niet direct mogelijk, omdat niet duidelijk is hoe de vertaling dient te worden gemaakt naar de aangegeven eenheid (IU/mg) (Tabel 2).

Voedselisolaten worden binnen WFSR routinematig geïdentificeerd met behulp van een MALDI-TOF-massaspectrometer. Bevestiging van de geïsoleerde kolonies met deze MALDI Biotyper (TYP01-WV030) gaf aan dat kolonies van alle zes deze gewasbeschermingsmiddelen "*Bacillus*" waren, behorende tot de groep *B. cereus*. Dit is in overeenstemming met het gegeven dat *B. thuringiensis* behoort tot dezelfde groep als *B. cereus*. Maar het maakt tevens duidelijk dat de MALDI-TOF analyse een te laag onderscheidend vermogen heeft voor de identificatie van *B. thuringiensis*. Wel kan met de MALDI Biotyper op een snelle manier een basale screening gedaan worden. Voor verdere identificatie zijn meer specifieke methoden nodig. In een poging om te komen tot een definitieve vaststelling van *B. thuringiensis* inclusief de juiste subspecies en stam, werden de isolaten verder onderzocht m.b.v. WGS.

3.2 Whole Genome Sequencing analyse van *B. thuringiensis* isolaten

Van elk product is een isolaat gesequenced met WGS (SOP-A-1382). Een bacterie isolaat werd opgekweekt in vloeibaar medium, waarna DNA werd geëxtraheerd. Het genereren van de sequencing library en de sequencing-reads middels Illumina sequencing werd extern uitbesteed bij BaseClear BV. De bioinformatica analyse van de verkregen DNA sequenties werd vervolgens uitgevoerd met door WFSR ontwikkelde software. De resultaten van de analyse wijzen uit dat de isolaten verkregen vanuit de GWBs 'Delfin WG' en 'Rupsvrij' een identieke stam betreft. Dit geldt eveneens voor de isolaten verkregen uit de GWBs 'Turex WG' en 'Turex spuitpoeder'. Dit komt overeen met de gedeclareerde stam voor deze producten (Tabel 1). Voor de twee andere producten zijn twee additionele stammen geïdentificeerd, wat eveneens overeenkomt met wat opgegeven is voor deze producten. Omdat de genome sequentie van deze producten niet is vrijgegeven kan geen verdere identificatie uitgevoerd worden. De resultaten laten echter duidelijk zien dat met WGS een hoog onderscheidend vermogen behaald kan worden voor identificatie.

Tijdens dit onderzoek rees de vraag of het rapporteren van de aangetroffen genome sequentie een aantasting is van het bedrijfsgeheim en een verbreking is van de strikte vertrouwelijkheid die aan een GWB registratiedossier gekoppeld is. Deze vraag kon tijdens dit onderzoek niet beantwoord worden maar een eenduidig antwoord hierop is van groot belang voor een succesvolle controle en eventuele handhaving.

3.3 Bacteriële verontreiniging in *B. thuringiensis* producten

Na beoordeling van de telplaten van de zes GWBs zijn geen grote hoeveelheden stoorflora waargenomen. Om eventuele bacteriële verontreiniging op veel lagere concentraties te kunnen aantonen, zijn de producten met specifiekere methoden onderzocht. Om achtergrondflora aan te kunnen tonen zijn een viertal methoden toegepast: aanwezigheid van *Clostridium perfringens* (MIC04-WV112_V06), coagulase positieve Staphylococci (MIC04-WV114_V08), Enterobacteriaceae (MIC04-WV114_V08), en *Salmonella* (MIC04-WV505_V10).

In geen van de zes geteste GWBs zijn coagulase positieve Staphylococceen gevonden en ook *Salmonella* werd niet aangetroffen. Ook waren de producten negatief voor de voedselpathogeen *C. perfringens*. Echter, tijdens het testen voor *C. perfringens* werd in twee GWBs een *Clostridium* sp. aangetroffen, en in één formulering werd een *Paraclostridium* sp. aangetroffen. Tenslotte zijn Enterobacteriaceae stammen aangetroffen in één van de zes onderzochte formuleringen.

De microbiële contaminaties worden gevonden bij het uitplaten van lage verdunningen, wat duidt op aanwezigheid op een laag niveau. De gevonden bacteriën zijn niet de specifieke voedsel pathogenen waarvoor de methoden ontwikkeld zijn. Het zijn echter wel stammen die direct gerelateerd zijn aan deze pathogenen. Het feit dat deze verwante spoorvormers gevonden worden in deze producten geeft aan dat het eventueel mogelijk is dat pathogenen zoals *C. perfringens* en *B. cereus* in deze producten zouden kunnen voorkomen.

Tabel 2 Bacteriële parameters van de gewasbeschermingsproducten gebaseerd op *B. thuringiensis*, op basis van etikettering en laboratorium testen.

Product	Geclaimde Concentratie werkzame stof (iu/mg)*	Getelde concentratie (kve/mg)**
Delfin WG	32.000	0,73E+7
XenTari raupenfrij	- (540 g/kg <i>Bt</i>)	2,30E+7
Rupsvrij	32.000	5,70E+7
Turex WG	25.000	4,40E+7
Turex spuitpoeder	25.000	3,05E+7
Costar WG	90.000	1,55E+7

* Commerciële formuleringen worden uitgedrukt in IU/mg, wat staat voor "international units per milligram". Deze eenheid wordt berekend op basis van activiteit in bioassays en is een mate van potentie, en is daarom niet per se direct vertaalbaar naar het kiemgetal in kve/mg.

**Gebaseerd op gemiddelde van twee tellingen van kolonies op TSA agar.

4 Conclusie en aanbevelingen

Uit de inventarisatie van de EFSA assessments blijkt dat er een grote diversiteit is in de kwaliteit van de identificatie methoden van een groen GWB. Voor een beperkt aantal van deze GWBs wordt een voldoende effectieve methode voor identificatie voorgesteld. Dit zijn methoden gebaseerd op Whole Genome Sequencing (WGS) en sequencing van target genen. Het onderscheidend vermogen van de overige methoden, meestal gebaseerd op eiwit of DNA fingerprinting is te laag voor onomstotelijke identificatie. Om effectieve controle van dit soort producten mogelijk te maken, is het cruciaal dat de genetische informatie van het biologische middelen beschikbaar is, bij voorkeur de genoom sequentie, maar in elk geval de sequentie van specifieke merker genen, waarvan is aangetoond dat ze voldoende differentiërend vermogen hebben om nauw gerelateerde stammen van elkaar te onderscheiden. Het beschikbaar maken (voor officiële controle) van deze gegevens zou door EFSA bij toekomstige aanvragen verplicht moeten worden gesteld.

In dit onderzoek zijn als proof of principle zes middelen op basis van *B. thuringiensis* onderworpen aan laboratoriumonderzoek. De keuze voor deze producten was deels ingegeven door de omvang van het gebruik en het gegeven dat producten van dit type in het verleden door NVWA zijn aangeboden met het verzoek ze te testen. Een andere factor die hierin meespeelde is de nauwe verwantschap van *B. thuringiensis* met de voedsel pathogeen *B. cereus*, een bacterie waarvan WFSR veel ervaring heeft. Dit maakte dat deze producten succesvol konden worden onderzocht, zowel kwantitatief als genetisch. Het is echter van belang op te merken dat de diversiteit aan micro-organismen in de verschillende toegelaten groene GWBs aanzienlijk is, en dat voor iedere soort een specifieke analysestrategie nodig is, wat het inregelen van effectieve controle van deze categorie GWBs tot een flinke uitdaging maakt.

Vanwege de hoge mate van vertrouwelijkheid van GWB dossiers is het belangrijk om te weten of het publiceren van de WGS uitkomsten (als onderdeel van de rapportage van het monsteronderzoek) juridische consequenties heeft. Juridische ondersteuning hierbij is noodzakelijk alsmede contact met het CTGB, de competente autoriteit voor Nederland voor toelating van GWBs op de Nederlandse markt.

De uitkomst van het project vormt een stevige basis voor de ontwikkeling en toepassing van methoden voor monitoring en controle van groene GWBs.

Literatuur

- Gutiérrez-Aguirre, I., Mehle, N., Delić, D., Gruden, K., Mumford, R., & Ravnikar, M. (2009). Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 162(1–2), 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.008>
- Sanchis, V., & Bourguet, D. (2009). Bacillus thuringiensis: Applications in agriculture and insect resistance management - A review. *Sustainable Agriculture*, 28, 243–255. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_16

Link naar EFSA assessments groene middelen:

- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.5078>
- https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.2903%2Fj.efsa.2017.5078&file=efs25078-sup-0001-Appendix_A.pdf
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2011.2435>
- <https://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/180905>
- <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=316>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2016.4494>
- <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3cb4c638-a5a0-11e7-837e-01aa75ed71a1/language-nl/format-PDF>
- http://draaf.paca.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Bacillus_amyloliquefaciens_strain_FZB24_-_Review_Report_Rev_1_VDO_cle011d61.pdf
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2016.4359>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2012.2868>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3346>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3063>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3054>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2012.2540>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3031>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3031>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2944>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3583>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2016.4517>
- https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.2903%2Fj.efsa.2016.4517&file=efs24517-sup-0001-Appendix_A.pdf
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3868>
- <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=595>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2655>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4905>
- https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.2903%2Fj.efsa.2017.4905&file=efs24905-sup-0001-Appendix_A.pdf
- <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=310>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2010.1446>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2020.6121>
- <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=851>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2012.2498>
- [https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4651_\(VC1\)](https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4651_(VC1))
- [https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4650_\(VX1\)](https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4650_(VX1))

-
- https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.2903%2Fj.efsa.2017.4650&file=efs24650-sup-0001-Appendix_A.pdf (Appendix A for VX1)
 - <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0047&from=NL>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3679>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.3977>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4668>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.2903%2Fj.efsa.2017.4668&file=efs24668-sup-0001-Appendix-A.pdf>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2954>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3061>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2666>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3036>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3062>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4092>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3055>
 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5575>
 - https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.2903%2Fj.efsa.2019.5575&file=efs25575-sup-0001-Appendix_A.pdf

Bijlage 1 Beoordeling en overzicht van
methoden voor identificatie en
kwantificering van groene
gewasbeschermingsmiddelen

Stam	Organisme	Methode(s)	Haalbaarheid identificatie	Identificatiemethode			Kwantificatiemethode	
				WGS seq	Genetic marker	Finger printing	Andere of geen methode*	Klassieke plate-count
Aureobasidium pullulans DSM 14940, DSM 14941	Schimmel	RAPD, specific genetic marker	++		x	x		x
Bacillus amyloliquefaciens str. FZb 24	Bacterie	Genome seq, SNP detection	++	x	x			x
Clonostachys rosea strain J1446	Schimmel	RAPD-PCR, RAMS, UPPCR analysis	++			x		x
Lecanicillium muscarium str. Ve6 (nu Akanthomyces muscarius str.Ve6)	Schimmel	ITS and ssrRNA seq	++		x	x		x
Pepino mosaic virus, strain CH2, isolate 1906	Virus	qRT-PCR, genome known	++	x	x			x
Bacillus firmus I-1582	Bacterie	Ribotyping	+	#		x	x	x
Bacillus pumilus QST2808	Bacterie	16S rDNA seq	+	#	x		x	x
Coniothyrium minitans strain CON/M/91-8	Schimmel	RAPD	+			x	x	x
Candida oleophila strain O	Schimmel	SCAR seq	+		x		x	x
Isaria fumosorosea strain Apopka 97	Schimmel	RAPD	+			x	x	x
Mild Pepino Mosaic Virus isolate VC1 and VX1	Virus	qRT-PCR, DAS-ELISA	+	#	x		x	x
Pseudomonas sp. strain DSMZ 13134	Bacterie	Ribotyping	+	#	x	x	x	x
Trichoderma asperellum strain T34	Schimmel	molecular tools (?)	+		#	#	x	x
Trichoderma atroviride strain SC1	Schimmel	qRT-PCR	+		x	x	x	x
Bacillus thuringiensis subsp. aizawai strains ABTS 1857 and GC-91	Bacterie	SDS-PAGE, AFLP, genomotyping (?)	+	#		x	x	x
Ampelomyces quisqualis strain AQ10	Schimmel	RFLP, SSR markers, gene marker, ITS sequencing	+/-		x	x		x
Bacillus amyloliquefaciens (eerder subtilis) str. QST 713	Bacterie	Ribotyping, SNP detection	+/-	x		x		x
Bacillus amyloliquefaciens strain MBI 600	Bacterie	16S rDNA seq	+/-	#	x			x
Cydia pomonella granulovirus	Virus		+/-				x	x
Metarhizium anisopliae var. anisopliae strains BIPESCO 5 / F52 (Nu Metarhizium brunneum Petch)	Schimmel	28S rDNA seq	+/-		x		x	#
Pseudomonas chlororaphis strain MA342	Bacterie	RAPD, RFLP	+/-	#		x		x
Trichoderma asperellum strains ICC012, T25 and TV1, Trichoderma gamsii ICC080	Schimmel	RAPD, ITS seq	+/-		x	x		x
Trichoderma harzianum Rifai strain T-22 and ITEM-908	Schimmel	ITS seq	+/-		x			#
Verticillium albo-atrum strain WCS850	Schimmel	WGS, single gene seq	+/-	x				x
Bacillus thuringiensis subsp. israelensis AM65-52	Bacterie		-	#			x	#
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki strains ABTS-351, PB54, SA-11, SA-12 and EG2348	Bacterie		-	#			x	#
Beauveria bassiana strain ATCC74040 and GHA	Schimmel	AFLP	-			x		x
Cerevisane	geen		-				x	x
COS-OGA	geen		-				x	x
Streptomyces griseoviridis K61 isolate	Bacterie	ISP seq, 16S rDNA seq, DNA-DNA hybridization	-	#	x		x	x

X = Methode beoordeeld door EFSA.

= Potentiele methode, met de mogelijkheid om deze in te voeren met minimale effort.

* Andere methoden bevatten de assessment van microscopie, kolonie morfologie en specifieke biochemische tests.



Wageningen Food Safety Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
wur.nl/food-safety-research

WFSR-rapport 2023.017



De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.600 medewerkers (6.700 fte) en 13.100 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen Food Safety Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
wur.nl/food-safety-research

WFSR-rapport 2023.017

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.600 medewerkers (6.700 fte) en 13.100 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

