

**Relazione sull'attività svolta e sui risultati ottenuti  
nell'ambito del progetto APENET  
per la tematica “Effetti del mais conciato sulle api”  
Anno 2011**



Relazione aggiornata al 6 ottobre 2011; contiene anche le informazioni relative alle sperimentazioni 2010, non pubblicate nel report di agosto 2010, perché ottenute successivamente a tale data.

## SOMMARIO

|  |           |
|--|-----------|
| DATI 2010.....   | 5         |
| <b>1. Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais e persistenza nella pianta dei principi attivi usati per la concia.....</b>  | <b>6</b>  |
| 1.1 Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais.....   | 6         |
| 1.1.1 Prove agronomiche .....  | 6         |
| 1.1.2 Monitoraggio insetti ipogei.....   | 9         |
| 1.1.3 Prove strip-test utilizzando seme conciato con i diversi principi attivi.....  | 16        |
| 1.2 Studio della persistenza nella pianta dei principi attivi usati per la concia.....   | 18        |
| <b>2. Effetti dell'impolveramento delle api durante il sorvolo di un campo seminato con mais conciato .....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1 Premessa .....   | 20        |
| 2.2 Api in volo libero .....   | 20        |
| 2.2.1 Materiali e metodi .....   | 20        |
| 2.2.2 Risultati .....  | 21        |
| 2.3 Api in gabbie mobili .....   | 23        |
| 2.3.1 Materiali e metodi .....   | 23        |
| 2.3.2 Risultati .....  | 23        |
| 2.4 Conclusioni .....  | 24        |
| <b>3. PER-test per saggiare gli effetti di clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam e fipronil somministrato attraverso le polveri contaminate.....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1 Materiali e metodi .....   | 26        |
| 3.2 Risultati .....  | 27        |
| DATI 2011.....   | 32        |
| <b>4. La rete di monitoraggio .....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1 Il sistema delle segnalazioni .....  | 37        |
| <b>5. Determinazione del minimo livello di concentrazione di polveri emesse dalle seminatrici modificate durante la semina di mais conciato tecnicamente ottenibile con interventi sulle seminatrici ed effetti sulle api.....</b>                                   | <b>40</b> |
| <b>PARTE A: Prove statiche per la messa a punto di una metodologia di valutazione dell'efficienza di dispositivi di abbattimento delle polveri da abrasione e verifiche sperimentali di un prototipo di dispositivo di abbattimento realizzato dal CRA-ING .....</b> | <b>40</b> |
| 5.1 Introduzione .....   | 40        |
| 5.2 Attività effettuata .....  | 40        |
| 5.3 Materiali.....   | 41        |
| 5.3.1 Sistema di prova a punto fisso .....   | 41        |
| 5.3.2 Seminatrice utilizzata nelle prove.....  | 42        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.3.3 Seme.....   | 43        |
| 5.3.4 Prototipi di modifica messi a punto dal CRA-ING.....  | 44        |
| 5.4 Metodi .....  | 45        |
| 5.4.1 Valutazione dell'efficacia del materiale filtrante e caratterizzazione fisica delle polveri da abrasione.....   | 45        |
| 5.4.2 Osservazioni sulla deriva delle polveri.....  | 47        |
| 5.4.3 Trattamento e analisi dei campioni.....   | 47        |
| 5.4.4 Elaborazione dei risultati delle analisi.....   | 47        |
| 5.5 Risultati.....  | 48        |
| 5.5.1 Sistema di prove a punto fisso.....   | 48        |
| 5.5.2 Valutazione dell'efficacia del materiale filtrante utilizzato e caratterizzazione fisica delle polveri da abrasione.....  | 50        |
| 5.5.3 Osservazioni sulla deriva delle polveri.....  | 51        |
| 5.5.4 Previsione delle concentrazioni in campo .....  | 54        |
| 5.6 Conclusioni .....   | 55        |
| <b>Parte B - Prove di semina in campo: collaudo funzionale della seminatrice equipaggiata con il prototipo 2 CRA-ING per l'abbattimento della polvere da abrasione; valutazione della deposizione a terra e della concentrazione nell'aria del principio attivo residuo; prove di sorvolo del campo seminato con le api .....</b> | <b>57</b> |
| 5.7 Obiettivi delle prove.....  | 57        |
| 5.8 Materiali e metodi .....  | 57        |
| 5.8.1 Qualità di semina .....   | 57        |
| 5.8.2 Dispersione di polvere da abrasione contenente principio attivo.....  | 58        |
| 5.8.3 Prove di sorvolo con api.....   | 59        |
| 5.9 Risultati e discussione .....   | 60        |
| 5.9.1 Qualità di semina .....   | 60        |
| 5.9.2 Dispersione di polvere da abrasione contenente principio attivo.....  | 62        |
| 5.9.3 Prove di sorvolo.....   | 63        |
| <b>6. Effetti sub letali di neonicotinoidi e fipronil sull'apprendimento e la memoria olfattiva e sulle capacità di orientamento.....</b>   | <b>68</b> |
| 6.1 Introduzione .....  | 68        |
| 6.2 Effetti della contaminazione per contatto con polveri a ridotto contenuto di neonicotinoidi e fipronil su apprendimento/memoria olfattiva - PER test.....   | 73        |
| 6.2.1 Materiali e metodi.....   | 73        |
| 6.2.2 Risultati.....  | 74        |
| 6.3 Effetti della contaminazione con polveri contenenti thiamethoxam sulla capacità di orientamento in un labirinto semplice e sul riconoscimento dei colori.....   | 79        |
| 6.3.1 Materiali e metodi.....   | 79        |
| 6.3.2 Risultati.....  | 80        |
| 6.4 Effetti dell'ingestione di nanodosi di clothianidin e fipronil sulle capacità di homing e sul comportamento di bottinatrici all'alveare.....  | 80        |
| 6.4.1 Materiali e metodi.....   | 81        |
| 6.4.2 Risultati.....  | 82        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>6.5 Prova di disorientamento nel labirinto complesso con le api.....</b>  | <b>85</b>  |
| <i>6.5.1 Materiali e metodi.....</i>   | <i>86</i>  |
| <i>6.5.2 Risultati.....</i>  | <i>90</i>  |
| <b>6.6 Conclusioni .....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>7. Possibilità di applicazione della lotta integrata per il controllo delle virosi<br/>nella coltura del mais .....</b> | <b>98</b>  |
| <b>7.1 Materiali e metodi .....</b>  | <b>98</b>  |
| <i>7.1.1 Siti.....</i>   | <i>98</i>  |
| <i>7.1.2 Tesi a confronto.....</i>   | <i>98</i>  |
| <i>7.1.3 Schemi sperimentali.....</i>  | <i>100</i> |
| <i>7.1.4 Rilievi.....</i>  | <i>100</i> |
| <i>7.1.5 Elaborazione dei dati.....</i>  | <i>102</i> |
| <b>7.2 Risultati .....</b>   | <b>102</b> |
| <i>7.2.1 Rilievi agronomici.....</i>   | <i>102</i> |
| <i>7.2.2 Rilievi entomologici.....</i>   | <i>105</i> |
| <b>7.3 Conclusioni .....</b>   | <b>107</b> |
| <b>8. Interazioni sinergiche tra agenti di stress e collasso delle colonie d'api .....</b>                                 | <b>108</b> |
| <b>8.1 Introduzione .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>8.2 Materiali e metodi .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>8.3 Analisi statistica.....</b>   | <b>109</b> |
| <b>8.4 Risultati .....</b>   | <b>110</b> |
| <b>8.5 Conclusioni .....</b>   | <b>112</b> |
| <b>Considerazioni conclusive relative ai diversi aspetti indagati .....</b>  | <b>114</b> |
| <b>Responsabili delle ricerche descritte nei singoli capitoli .....</b>  | <b>116</b> |

# DATI 2010

non pubblicati nel report di Agosto 2010  
perché ottenuti successivamente a tale data

# 1. Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais e persistenza nella pianta dei principi attivi usati per la concia

## 1.1 Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais

La valutazione dell'utilità agronomica e produttiva della concia del mais è stata effettuata attraverso diverse prove, svolte in parte dall'Unità di Ricerca per la Maiscoltura di Bergamo, in collaborazione per gli aspetti entomologici con Veneto Agricoltura, il DiSTA dell'Università di Bologna e il DIVAPRA dell'Università di Torino (paragrafo 1.1.2); in parte da Veneto Agricoltura (paragrafo 1.1.3).

### 1.1.1 Prove agronomiche

La sperimentazione, in corso presso il CRA - Unità di Ricerca per la Maiscoltura di Bergamo (CRA-MAC), è volta allo scopo di confrontare la resa produttiva di materiali derivanti da semente trattata con solo fungicida (Celest), rispetto a quella di materiali derivanti dalla stessa semente concia, in aggiunta al fungicida, anche con i 4 principi attivi studiati, utilizzati contro insetti terricoli e fitomizi in genere (imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam e fipronil).

Le prove agronomiche sono state allestite e raccolte in 20 località distribuite per lo più nelle regioni a vocazione maidicola (Lombardia, Piemonte Veneto, Friuli, Emilia Romagna) e Toscana (Tabella 1).

**Tabella 1** - Elenco delle 20 località nelle quali sono state allestite le prove agronomiche APENET 2010.

| Regione        | Località                     |
|----------------|------------------------------|
| Lombardia      | Bergamo                      |
|                | S. Angelo Lodigiano (LO)     |
|                | Luignano (CR)                |
|                | Caleppio di Settala (MI)     |
|                | Castenedolo (BS)             |
|                | Pudiano (BS) * NON -RACCOLTA |
|                | Ostiglia (MN)                |
| Piemonte       | Vigone (TO)                  |
|                | Chivasso (TO)                |
|                | Castelceriolo (AL)           |
| Veneto         | Lonigo (VI)                  |
|                | Montagnana (PD)              |
|                | Villadose (RO)               |
|                | Noventa Vicentina (VI)       |
| Emilia Romagna | Ambrogio (FE)                |
|                | Parma                        |
| Friuli         | Mortegliano (UD)             |
|                | Palazzolo della Stella (UD)  |
|                | Codroipo (UD)                |
| Toscana        | Marciano della Chiana (AR)   |

### ***Materiali e metodi***

Per la sperimentazione 2010 sono stati utilizzati, come concordato nell'ambito del Progetto APENET, materiali forniti dall'Associazione Italiana Sementi - Assosementi, che ha fornito un ibrido diverso da quello inviato per la sperimentazione 2009 (che era stato peraltro richiesto anche per il secondo anno di prove); si tratta infatti dell'ibrido commerciale di Mais PR32G44- FAO 600 anziché dell'ibrido PR31N27-FAO 700.

I materiali forniti da Assosementi sono stati preparati partendo da un lotto di semente omogenea, secondo le seguenti 5 tesi:

| <b>TESI</b>   | <b>Fungicida</b> | <b>Principio attivo insetticida</b> |
|---------------|------------------|-------------------------------------|
| 1 - Testimone | *Celest          | Nessuno                             |
| 2 - Cruiser   | *Celest          | Thiamethoxam                        |
| 3 - Gaucho    | *Celest          | Imidacloprid                        |
| 4 - Poncho    | *Celest          | Clothianidin                        |
| 5 - Regent    | *Celest          | Fipronil                            |

\*Il fungicida Celest contiene fludioxonil e metalaxyl.

Le 5 tesi oggetto di indagine sono state saggiate nell'ambito di ciascuna prova agronomica, in uno schema a blocchi randomizzati con 4 repliche; per la sperimentazione sono state impiegate parcelle di 30 m<sup>2</sup> nelle quali le tesi sono state seminate ad una densità di 7 piante/m<sup>2</sup>.

Nell'ambito di ciascuna prova agronomica, per ciascuna delle 5 tesi sotto studio, sono stati effettuati rilievi e valutazioni agronomiche standard, più precisamente:

- produzione (q/ha-15.5% U.R.)
- umidità della granella (U.R. %)
- peso ettolitrico (kg/hl)
- altezza pianta (cm)
- altezza inserzione spiga (cm)
- percentuale piante spezzate (%)
- percentuale piante allettate (%)

I dati medi relativi a tali parametri, registrati nelle 19 prove agronomiche (la tesi di Pudioano-BS non è stata raccolta) sono riportati in Tabella 2.

### ***Risultati***

L'analisi statistica dei dati, condotta tramite analisi della varianza (ANOVA per  $p \leq 0,05$ ) per confrontare le tesi sotto studio, condotta assumendo le tesi come fattore fisso e le località come fattore random, ha indicato che le medie relative ai parametri rilevati non differiscono significativamente (trattato vs controllo) per i diversi caratteri esaminati. Tuttavia, come riportato in Tabella 2, si può notare una "tendenza", in alcune località, ad un maggior livello produttivo nel caso dei semi trattati con concianti insetticidi, rispetto al controllo (testimone). In particolare nel caso di semente trattata con clothianidin (tesi 4-PONCHO) la produzione ha mostrato un incremento medio di circa 6 q/ha-(15.5% U.R.) rispetto al controllo.

**Tabella 2** - Dati medi di 19 prove agronomiche APENET 2010.

| TESI          | Principio attivo insetticida | Produzione (q/ha 15.5%u.r.) | Umidità granella (u.r. %) | Peso ettolitrico (kg/hl) | Altezza pianta (cm) | Altezza inserzione spiga (cm) | % piante spezzate | % piante allettate |
|---------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| 1 - TESTIMONE | nessuno                      | 132,15                      | 23,59                     | 73,11                    | 260,06              | 129,25                        | 8,11              | 5,12               |
| 2 - CRUISER   | thiamethoxam                 | 134,90                      | 23,50                     | 73,12                    | 260,64              | 129,44                        | 6,83              | 5,92               |
| 3 - GAUCHO    | imidacloprid                 | 134,60                      | 23,29                     | 72,85                    | 262,19              | 129,55                        | 7,78              | 4,14               |
| 4 - PONCHO    | clothianidin                 | 138,17                      | 23,28                     | 72,96                    | 264,69              | 131,73                        | 7,05              | 5,03               |
| 5 - REGENT    | fipronil                     | 135,99                      | 23,48                     | 72,88                    | 262,72              | 131,94                        | 8,04              | 5,25               |
| LSD 0,05      |                              | 4,37                        | 0,28                      | 0,44                     | 3,67                | 2,73                          | 1,31              | 1,72               |

Entrando nel dettaglio delle singole località, (Tabella 3), in 6 delle 19 totali (quindi nel 31,5% dei casi), si è notata una differenza significativa (positiva o negativa) nella produzione tra uno o più concianti rispetto al testimone o agli stessi altri concianti. In particolare, in 2 di queste 6 località, si è notato un effetto negativo da parte di uno dei concianti, rispetto al testimone e/o alcuni degli altri concianti; specificatamente, a Bergamo con imidacloprid (Gaucho) e presso Ambrogio (FE) con fipronil (Regent) (Tabella 3). Nelle restanti 4 località (quindi nel 21% dei casi), Castenedolo (BS), Castelceriolo (AL), Montagnana (PD), Palazzolo della Stella (UD), clothianidin (Poncho) risulta avere un effetto significativamente positivo sulla produzione rispetto ad alcuni degli altri concianti e/o al testimone.

**Tabella 3** - Dati di produzione (q/ha-15.5%U.R.) delle 19 prove agronomiche APENET 2010.

| Regione   | Località                 | PRODUZIONE (q/ha-15.5%U.R.) |                        |                       |                       |                   | Analisi Varianza    |
|-----------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
|           |                          | Testimone                   | Thiamethoxam (Cruiser) | Imidacloprid (Gaucho) | Clothianidin (Poncho) | Fipronil (Regent) |                     |
| Lombardia | Bergamo                  | 145,75                      | 142,75                 | 128,35                | 149,33                | 138,68            | LSD (0,05)<br>13,55 |
|           | S. Angelo Lodigiano (LO) | 124,80                      | 140,33                 | 134,40                | 124,20                | 138,73            | N.S.                |
|           | Luignano (CR)            | 107,93                      | 101,70                 | 122,63                | 108,65                | 115,43            | N.S.                |
|           | Caleppio di Settala (MI) | 167,83                      | 179,85                 | 170,73                | 178,78                | 167,13            | N.S.                |
|           | Castenedolo (BS)         | 112,50                      | 120,25                 | 101,50                | 125,75                | 115,50            | LSD (0,01)<br>11,52 |
|           | Pudiano (BS)             | -                           | -                      | -                     | -                     | -                 |                     |
|           | Ostiglia (MN)            | 114,65                      | 121,55                 | 132,50                | 126,33                | 134,58            | N.S.                |
| Piemonte  | Vigone (TO)              | 157,00                      | 152,58                 | 154,33                | 153,65                | 163,83            | N.S.                |
|           | Chivasso (TO)            | 133,95                      | 130,75                 | 126,60                | 129,65                | 127,70            | N.S.                |
|           | Castelceriolo (AL)       | 132,65                      | 140,53                 | 132,05                | 148,08                | 151,10            | LSD (0,01)<br>10,05 |



|                |                             |        |        |        |        |        |                     |
|----------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
| Veneto         | Lonigo (VI)                 | 119,58 | 120,50 | 123,18 | 123,65 | 127,13 | N.S.                |
|                | Montagnana (PD)             | 139,98 | 140,68 | 146,75 | 162,68 | 150,43 | LSD (0,01)<br>8,30  |
|                | Villadose (RO)              | 140,98 | 148,25 | 138,58 | 143,75 | 142,45 | N.S.                |
|                | Noventa Vicentina (VI)      | 133,65 | 142,70 | 140,20 | 141,48 | 131,78 | N.S.                |
| Emilia Romagna | Ambrogio (FE)               | 133,73 | 129,10 | 147,75 | 140,28 | 124,48 | LSD (0,05)<br>14,49 |
|                | Parma                       | 143,65 | 141,98 | 147,28 | 140,10 | 138,75 | N.S.                |
| Friuli         | Mortegliano (UD)            | 135,15 | 146,38 | 133,83 | 149,10 | 147,00 | N.S.                |
|                | Palazzolo della Stella (UD) | 73,18  | 83,80  | 90,33  | 96,35  | 94,93  | LSD (0,01)<br>9,39  |
|                | Codroipo (UD)               | 153,28 | 156,60 | 157,00 | 152,98 | 154,20 | N.S.                |
| Toscana        | Marciano della Chiana (AR)  | 140,73 | 122,83 | 129,43 | 130,53 | 120,08 | N.S.                |

Inoltre, come precedentemente specificato, l'ibrido commerciale invariato da Assosementi per la sperimentazione 2010 è diverso da quello fornito per la sperimentazione 2009; si tratta infatti dell'ibrido commerciale di Mais PR32G44- FAO 600 anziché dell'ibrido PR31N27-FAO 700. Tale sostituzione di ibrido potrebbe aver determinato un'interazione genotipo-ambiente, diversa e non confrontabile con quanto osservato lo scorso anno, anche in risposta all'utilizzo della concia insetticida.

### *1.1.2 Monitoraggio insetti ipogei*

In alcune delle località in cui sono state allestite le prove agronomiche, ove possibile, sono state elaborate mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei del mais (elateridi e diabrotica), grazie alla collaborazione con Veneto Agricoltura, il DiSTA dell'Università di Bologna e il DIVAPRA dell'Università di Torino.

L'attività di monitoraggio degli insetti ipogei è suddivisa in due azioni:

- 1) rilievi delle popolazioni larvali degli investimenti e degli attacchi in appezzamenti monitorati con le trappole a feromoni per elateridi nel 2009
- 2) monitoraggio con trappole a feromoni YATLORf innescate per adulti delle principali specie di elateridi e di diabrotica

### *Materiali e metodi*

1) Rilievi popolazioni larvali, investimenti, attacchi in appezzamenti monitorati con le trappole a feromoni per elateridi nel 2009

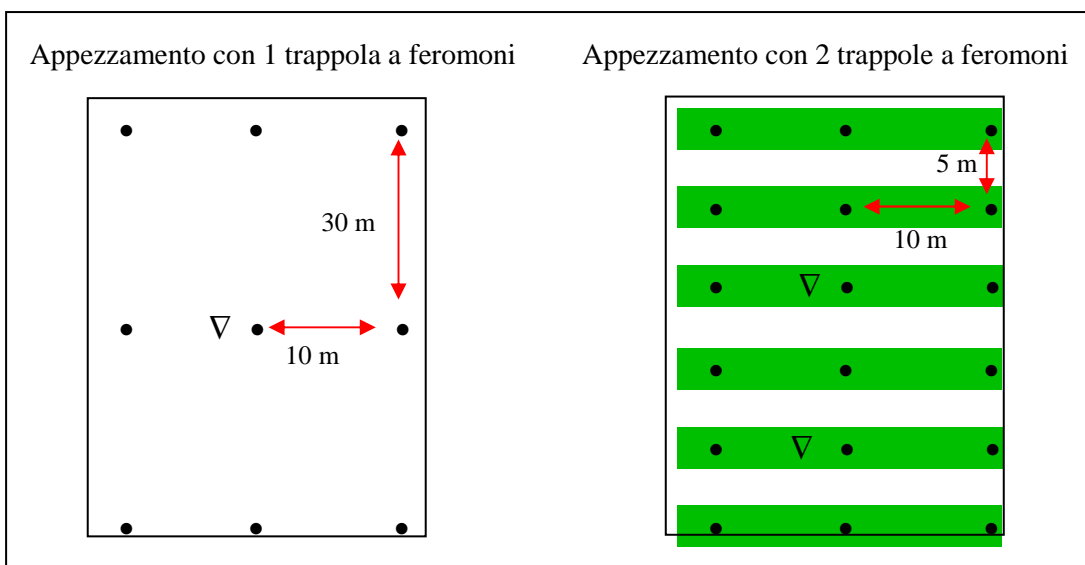
In parte cospicua degli appezzamenti ove sono state poste le trappole a feromoni nel 2009 si è individuata la posizione delle trappole stesse, segnalandola con un paletto ben visibile; quindi si è proceduto alla posa delle trappole per le larve e si è delimitata una porzione di campo tutt'attorno da non trattare con geoinsetticidi o altro.

Le trappole attrattive per larve (Chabert e Blot, 1982) sono costituite da vasetti in plastica drenanti (diam. 10 cm) riempiti per metà con vermiculite e 30 ml di semi di mais più 30 ml di semi di frumento, quindi colmati con altra vermiculite. Dopo essere stati abbondantemente bagnati, i vasetti sono stati interrati in modo che il bordo superiore risultasse a 5 cm dalla superficie del terreno. All'atto dell'interramento sono stati collocati sopra i vasetti circa 2 cm di terra, un sottovaso

rovesciato (diam. 18 cm) e infine si è coperto tutto con altro terreno per arrivare alla superficie. La posa è avvenuta con temperature del terreno superiori ai 9 °C e buona umidità; nelle posizioni ove sono state installate le trappole il terreno era nudo o perlomeno libero da vegetazione. Dopo 7-10 giorni i vasetti sono stati raccolti, codificati e messi in sacchetti. Ciascun vasetto è stato osservato sminuzzando fra le mani la vermiculite frammista ai semi ed alle radici formatesi, per individuare le larve di elateridi presenti, stimando così il numero medio di larve per trappola. Il materiale osservato è stato posto su imbuto con una provetta all'estremità per raccogliere le larve, che con il disseccamento del materiale scendono verso il basso.

La posa delle trappole per le larve è avvenuta nel seguente modo:

- Individuazione esatta della posizione di ciascuna delle trappole a feromoni 2009;
- Posa delle trappole per larve secondo schema di Figura 1;
- Raccolta trappole, mantenimento segnalazioni parcella NON trattata;



**Figura 1** - Schema posizionamento trappole: ∇ = posizione trappola a feromoni 2009; • = posizione trappola per larve nel 2010.

Lo scopo di posizionare le trappole per larve 2010 tutto attorno alle trappole a feromoni per adulti del 2009 era di correlare la popolazione di larve con gli adulti dell'anno precedente, al fine di valutare le capacità previsionali della trappola a feromoni.

Nelle diverse stazioni che hanno ospitato trappole a feromoni nell'anno precedente si è proceduto a garantire l'assenza di trattamenti insetticidi e quindi a individuare a caso nella zona attorno alla posizione della trappola 5-6 sub-parcelle di lunghezza 20 metri e larghezza pari a 3-6 file ove si è proceduto ai seguenti rilievi:

- investimento emergenza
- attacco seme - plantule
- investimento 4-8 foglie
- attacco 4-8 foglie
- altri attacchi (afidi, virus,...) 4-8 foglie
- investimento alla raccolta

## 2) Monitoraggio con trappole a feromoni YATLORf innescate per le principali specie di elateridi e di diabrotica

Per quanto possibile si è cercato di posizionare le trappole nelle stesse posizioni del 2009 o in prossimità in modo da verificare l'andamento nel tempo delle popolazioni e quindi la stabilità delle indicazioni del monitoraggio nonché avere ulteriori dati per studiare la correlazione tra il livello delle popolazioni di adulti e quello delle larve e gli attacchi alla coltura.

In ciascuna stazione della griglia sono state installate 1 o 2 trappole a feromoni in appezzamento con la coltura tipica in precessione del mais per quella rotazione. La distanza delle trappole entro stazione era di almeno 50 metri. Il posizionamento è stato fatto entro l'appezzamento o sul bordo se la coltura era molto fitta.

La gestione indicativa della trappola per adulti di elateridi e diabrotica Yf è stata la seguente:

- 1 Sono state individuate le coordinate della posizione della trappola;
- 2 La trappola è stata posta a livello terreno con la punta terminale basale completamente infissa nel terreno e mettendo un po' di terra attorno al bordo della stessa;
- 3 Il 20 marzo 2010 circa è stata posizionata la trappola al centro dell'area sperimentale con l'erogatore<sup>a</sup> di feromone (Kartel 730) per *A. brevis* in posizione bassa ed il tappo in basso;
- 4 Il 10 aprile 2010 circa sono stati prelevati<sup>b</sup> gli insetti catturati ed aggiunta l'erogatore<sup>a</sup> di feromone per *A. sordidus* in posizione media ed il tappo in basso;
- 5 Il 10 maggio 2010 circa sono stati prelevati<sup>b</sup> gli insetti catturati e sostituito l'erogatore<sup>a</sup> di feromone per *A. sordidus* con uno nuovo in posizione media ed il tappo in basso;
- 6 Il 20 maggio 2010 circa sono stati prelevati<sup>b</sup> gli insetti catturati e sostituita l'erogatore<sup>a</sup> di feromone per *A. brevis* con quella per *A. litigiosus* in posizione bassa ed il tappo in basso;
- 7 Il 15 giugno 2010 circa sono stati prelevati<sup>b</sup> gli insetti catturati e sostituita l'erogatore<sup>a</sup> di feromone per *A. litigiosus* con una nuova e aggiunta in posizione alta i feromoni *A. ustulatus* e diabrotica insieme;
- 8 Il 10 agosto 2010 sono stati prelevati<sup>b</sup> gli insetti catturati.

Nel caso fosse posta in una coltura fitta (ad es. erbaio, frumento) e comunque dopo l'inserimento del feromone sessuale per diabrotica nel fondo della trappola è stata inserito un pezzo di collarino con insetticida (tipo per cani).

<sup>a</sup> = Come manipolare le esche a feromoni (capsule Kartel 730 per *A. brevis*, *A. sordidus* ed *A. litigiosus*, *A. ustulatus*)

Le esche vanno conservate nella confezione sigillata in freezer a -18°C o a temperature prossime allo zero (piuttosto in frigo a 0-4°C).

Le esche una volta tirate fuori dalla confezione, non vanno mai toccate con le mani e manipolate tramite la linguetta. Le esche non devono mai essere aperte.

<sup>b</sup> = Come prelevare gli insetti dalla trappola

- 1- togliere la trappola dal terreno;
- 2- Prima di aprire la trappola, metterla in un sacchetto trasparente e largo e tenendolo più chiuso possibile, staccare la base dal resto della trappola facendo cadere gli insetti nel sacchetto;
- 3- chiudere immediatamente il sacchetto;
- 4- sostituire le e sistemare la trappola;
- 5- riposizionare la trappola nel terreno;
- 6- contare tutti gli insetti presenti;
- 7- allegare al sacchetto un biglietto con le seguenti indicazioni: nome, luogo, sigla della trappola, data del prelievo e numero di insetti contati.



**Tabella 5** - Risultati del monitoraggio degli elateridi e dei loro effetti sulla coltura del mais su campione di appezzamenti delle principali regioni maidicole (n.r.= non rilevato).

| Regione               | Appezzamenti monitorati | Con fattori di rischio ( <i>A.brevis</i> , <i>A.sordidus</i> ) | Con fattori di rischio ( <i>A.litigiosus</i> , <i>A.ustulatus</i> ) | Adulti 2009                            |  |  |   | Mais 2010                                      |                             |   |   |                              |
|-----------------------|-------------------------|--|---|--|--|--|---|--|-----------------------------|---|---|------------------------------|
|                       |                         |  |   | <i>A. brevis</i> media (e.s., min-max) | <i>A. sordidus</i> media (e.s., min-max) | <i>A. litigiosus</i> media (e.s., min-max) | <i>A. ustulatus</i> media (e.s., min-max) | Investimento pp/mq sane media (e.s., min, max) | Mmedia (sane % su deposito) | % piante attaccate ( <i>A.griotes sordidus</i> ) media (e.s., min, max) | Danni visibili senza conseguenze su produzione (fino macchie 10% erose) | Danni gravi (>20%, risemina) |
| <b>Veneto</b>         | 51                      | 6  | 6   | <b>76</b> (18,3, 0-691)                | <b>523</b> (53,1, 91-2129)               | n.r.                                       | <b>548</b> (88,4, 0-2786)                 | <b>6,46</b> (0,07, 5,30-7,38)                  | 90,3                        | <b>1,14</b> (0,024, 0,0-7,0)  | 2   | 0                            |
| <b>Emilia Romagna</b> | 105                     | 7  | 4   | n.r.                                   | <b>245</b> (26,44, 4-2201)               | <b>253</b> (24,29, 6-1141)                 | n.r.                                      | n.r.   | n.r.                        | n.r.  | 1   | 0                            |
| <b>Lombardia</b>      | 10                      | 2  | 1   | n.r.                                   | <b>983</b> (243,9, 189-2349)             | <b>629</b> (202,3, 63-2087)                | n.r.                                      | <b>6,48</b> (0,06, 4,80-7,3)                   | 93,2                        | <b>0,17</b> (0,071, 0,10-0,81)  | 1   | 0                            |
| <b>Piemonte</b>       | 6                       | 1  | 0   | n.r.                                   | <b>553</b> (242, 46-2153)                | <b>781</b> (232, 123-2311)                 | n.r.                                      | <b>7,00</b> (0,12, 6,40-7,40)                  | 94,6                        | <b>5,8</b> (0,017, 0-12)  | 1   | 0                            |
| <b>Friuli</b>         | 11                      | 2  | 0   | <b>169</b> (19,70, 86-323)             | <b>335</b> (66,58, 59-763)               | <b>12</b> (6,41, 0-52)                     | n.r.                                      | <b>6,63</b> (0,05, 6,35-6,90)                  | 90,7                        | <b>0,059</b> (0,01, 0,05-0,1)   | 0   | 0                            |
| <b>Totale</b>         | 183                     | 18   | 11  |  |  |  |   |  |                             |   | 5   | 0                            |
| <b>Incidenza (%)</b>  |                         |  |   |  |  |  |   |  |                             |   | 2,7   | 0                            |

## Risultati

1) Rilievi popolazioni larvali, investimenti, attacchi in appezzamenti monitorati con le trappole a feromoni per elateridi nel 2009

La sintesi dei risultati è riportata nelle Tabelle 4 e 5. Nel campione di appezzamenti il numero di larve per trappola è stato sempre sotto la soglia di tolleranza e non sono stati osservati attacchi gravi da insetti del terreno. In sintesi i risultati confermano quanto emerso nell'ultimo decennio di sperimentazioni sull'argomento, incluso il primo anno di sperimentazione APENET.

L'attacco grave (in grado di influire sulla produzione) di fitofagi ipogei su mais si è confermato evento raro; gli investimenti sono stati buoni e gli attacchi inferiori o di poco superiori all'1% delle piante includendo anche le piante con sintomi facilmente reversibili (strisce gialle);

E' stata riscontrata una chiara correlazione tra specie di adulti catturate con le trappole a feromoni e popolazioni di larve.

2) Monitoraggio con trappole a feromoni YATLORf innescate per le principali specie di elateridi e di diabrotica

I risultati del monitoraggio negli appezzamenti della regione Veneto sono sintetizzati in Tabella 6. Al secondo anno, salvo limitati casi, la distribuzione degli adulti delle principali specie ricalca quella del primo. La variabilità tra areali è elevata e si conferma che è possibile applicare una lotta integrata differenziando le aree a seconda dei livelli di rischio.

**Tabella 6** - Catture di adulti di elateridi e diabrotica con trappole YATLORf negli appezzamenti della regione Veneto (n.r.= non rilevato; n.d. = non determinato).

| Prov. | Comune            | Coltura 2010         | Precessione | Totale <i>A. brevis</i> |      | Totale <i>A. sordidus</i> |      | Totale <i>A. ustulatus</i> |      | Totale diabrotica anno 2010 |
|-------|-------------------|----------------------|-------------|-------------------------|------|---------------------------|------|----------------------------|------|-----------------------------|
|       |                   |                      |             | 2009                    | 2010 | 2009                      | 2010 | 2009                       | 2010 |                             |
| VE    | San Donà di Piave | mais                 | mais        | 30                      | 60   | 430                       | 677  | 365                        | 492  | 0                           |
| VE    | Caorle            | mais                 | soia        | 22                      | 28   | 655                       | 557  | 252                        | 750  | 1                           |
| VE    | S. Stino          | mais                 | soia        | 31                      | 1    | 786                       | 758  | 243                        | n.r. | n.r.                        |
| VE    | S. Stino          | mais                 | soia        | 50                      | 1    | 1015                      | 486  | 278                        | 1010 | 0                           |
| VE    | S.Stino           | mais                 | soia        | 47                      | 9    | 1170                      | 767  | n.d.                       | 1063 | n.r.                        |
| VE    | Motta di L.       |                      |             | 45                      | 7    | 805                       | 856  | 90                         | 95   | n.r.                        |
| TV    | Motta di L.       | mais                 | mais        | 36                      | no   | 1080                      | no   | n.d.                       | no   | n.r.                        |
| TV    | Chiarano          | mais                 | mais        | 40                      | 41   | 422                       | 750  | 55                         | 50   | n.r.                        |
| TV    | Chiarano          | mais                 | mais        | 48                      | 40   | 644                       | 864  | 150                        | 100  | 0                           |
| TV    | Chiarano          | bietole              | mais        | 4                       | 50   | 941                       | 1500 | 9                          | 30   | n.r.                        |
| TV    | Chiarano          | bietole              | mais        | 4                       | 45   | 891                       | 920  | 22                         | 35   | n.r.                        |
| VE    | Caorle            | medicaio             | medicaio    | 274                     | 147  | 361                       | 1920 | n.d.                       | 900  | n.r.                        |
| VE    | Caorle            | medicaio             | medicaio    | 145                     | 197  | 185                       | 1111 | 24                         | 687  | n.r.                        |
| VE    | Caorle            | medicaio             | medicaio    | 30                      | 191  | 602                       | 1650 | 10                         | n.d. | n.r.                        |
| VE    | Caorle            | Mais                 | Bietole     | 36                      | 198  | 2129                      | 1424 | 27                         | 111  | 0                           |
| VE    | Caorle            | Loietto/<br>soia II  | Bietole     | no                      | 125  | no                        | 619  | no                         | 1275 | n.r.                        |
| VE    | Caorle            | Frumento/<br>soia II | Bietole     | no                      | 303  | no                        | 1188 | no                         | 755  | n.r.                        |
| VE    | Torre di Mosto    |                      |             | 10                      | no   | 570                       | no   | n.d.                       | no   | n.r.                        |
| VE    | Torre di Mosto    |                      |             | 12                      | no   | 729                       | no   | n.d.                       | no   | n.r.                        |
| VE    | Concordia         |                      |             | 20                      | no   | 1871                      | no   | 119                        | no   | n.r.                        |

|    |                   |          |              |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-------------------|----------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|
|    | Sagittaria        |          |              |      |      |      |      |      |      |      |
| VE | Concordia         |          |              | 49   | no   | 875  | no   | n.d. | no   | n.r. |
| VE | Caorle            | mais     | orzo         | 3    | 4    | 206  | 1084 | 2786 | 1421 | n.r. |
| VE | Caorle            | mais     | colza        | 0    | 17   | 505  | 1022 | 2754 | 1353 | 0    |
| VE | Caorle            | mais     | orzo-soia    | 8    | 39   | 529  | 887  | 2541 | 1100 | n.r. |
| VE | Caorle            | mais     | orzo         | 1    | 25   | 467  | 1580 | 1616 | 1910 | n.r. |
| VE | Caorle            | Soia     | bietola      | 0    | 22   | 225  | 1435 | 1340 | n.r. | n.r. |
| VE | Caorle            | Soia     | bietola      | no   | 20   | no   | 757  | no   | 2568 | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | bietole      | 36   | 3    | 535  | 438  | 300  | 1533 | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | bietole      | 30   | 4    | 414  | 460  | 320  | 1955 | n.r. |
| VE | Eraclea           | soia     | mais         | 13   | 5    | 456  | 525  | 974  | 1878 | n.r. |
| VE | Eraclea           | soia     | mais         | 10   | 3    | 324  | 612  | 750  | 1105 | n.r. |
| VE | Eraclea           |          |              | 18   | no   | 344  | no   | 615  | no   | n.r. |
| VE | Eraclea           |          |              | 21   | no   | 344  | no   | 512  | no   | n.r. |
| TV | Ponte di Piave    | mais     | soia         | no   | 745  | no   | 782  | no   | 28   | n.r. |
| TV | Cessalto          | soia     | mais         | no   | 78   | no   | 1665 | no   | n.r. | 0    |
| TV | Cessalto          | soia     | mais         | no   | 120  | no   | 2562 | no   | n.r. | n.r. |
| TV | Cessalto          | soia     | soia         | no   | 110  | no   | 1541 | no   | n.r. | n.r. |
| TV | Ceggia            | mais     | soia         | n.r. | 100  | n.r. | 1500 | 821  | n.r. | n.r. |
| TV | Ponte di Piave    |          |              | 64   | no   | 165  | no   | 720  | no   | n.r. |
| TV | Ponte di Piave    |          |              | 22   | no   | 133  | no   | 72   | no   | n.r. |
| TV | Ponte di Piave    |          |              | 42   | no   | 148  | no   | 600  | no   | n.r. |
| TV | Ponte di Piave    |          |              | 144  | no   | 489  | no   | 410  | no   | n.r. |
| TV | Cessalto          |          |              | 35   | no   | 1040 | no   | 177  | no   | n.r. |
| TV | Cessalto          |          |              | 40   | no   | 1175 | no   | n.d. | no   | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | mais         | 78   | 97   | 287  | 1015 | 1000 | n.r. | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | mais         | 4    | 2    | 245  | 250  | 620  | n.r. | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | mais         | 0    | 3    | 264  | 619  | 880  | n.r. | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | mais         | 1    | n.r. | 235  | n.r. | 800  | n.r. | n.r. |
| VE | San Donà di Piave | mais     | mais, mais   | 49   | 50   | 301  | 305  | 284  | 200  | 0    |
| VE | San Donà di Piave | mais     | mais, mais   | 56   | 28   | 178  | 389  | 543  | n.r. | 0    |
| VE | San Donà di Piave | mais     | mais, medica | 35   | 4    | 101  | 425  | 518  | n.r. | n.r. |
| VE | San Donà di Piave | mais     | soia         | 79   | 361  | 767  | 1500 | 1766 | 1511 | 0    |
| VE | San Donà di Piave | soia     | mais         | 54   | 72   | 639  | 934  | 1322 | 990  | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | mais, mais   | 41   | 10   | 269  | 458  | 393  | 300  | 0    |
| VE | Eraclea           | mais     | mais, mais   | 33   | 6    | 519  | 743  | 628  | 610  | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | soia         | 36   | 47   | 126  | 348  | 496  | 297  | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | soia         | 39   | 24   | 139  | 320  | 397  | 422  | n.r. |
| VE | Eraclea           | mais     | soia         | 15   | 26   | 91   | 208  | 329  | 745  | 0    |
| VE | Torre di Mosto    | mais     | mais         | 167  | 98   | 471  | 403  | 602  | n.r. | n.r. |
| VE | Ceggia            | sioa     | mais         | 47   | no   | 273  | no   | 719  | no   | n.r. |
| TV | Cessalto          | mais     | mais         | 71   | 196  | 574  | 2335 | n.r. | 230  | n.r. |
| TV | Cessalto          | mais     | mais         | 691  | 234  | 1464 | 1520 | n.r. | n.r. | 3    |
| TV | Cessalto          | medicaio |              | 506  | 96   | 416  | 730  | n.r. | n.r. | n.r. |

I risultati ottenuti negli appezzamenti delle regioni Lombardia, Piemonte e Veneto indicano variabilità tra le località, per quanto riguarda le catture delle diverse specie di adulti (*Agriotes brevis*, *Agriotes sordidus*, *Agriotes litigiousus*, *Diabrotica virgifera*) (Tabella 7).

**Tabella 7** - Dati relativi al monitoraggio di elateridi e diabrotica in 8 località delle prove agronomiche APENET 2010 (elencate complessivamente in Tabella 1).

| Regione   | Località                    | ADULTI<br>(catture: totale/trappola per sito) |                              |                                |                               |                                 | Cattura<br>larve<br>elateridi |
|-----------|-----------------------------|---|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
|           |                             | <i>Agriotes<br/>s<br/>brevis</i>              | <i>Agriotes<br/>sordidus</i> | <i>Agriotes<br/>litigiosus</i> | <i>Agriotes<br/>ustulatus</i> | <i>Diabrotica<br/>virgifera</i> |                               |
| Lombardia | Bergamo                     | 189   | 0                            | 131,5                          | N.D.                          | 52                              | 0                             |
|           | Ostiglia (MN)               | N.D.  | 131                          | 632                            | N.D.                          | 0                               | N.D.                          |
| Piemonte  | Vigone (TO)                 | N.D.  | 453,5                        | 454                            | N.D.                          | 66,5                            | N.D.                          |
|           | Chivasso (TO)               | N.D.  | 395                          | 1026                           | N.D.                          | 211                             | N.D.                          |
| Friuli    | Mortegliano (UD)            | 0   | 1012,5                       | 28,5                           | 19                            | N.D.                            | N.D.                          |
|           | Palazzolo della Stella (UD) | 0   | 904,5                        | 17,5                           | 332                           | N.D.                            | N.D.                          |
|           | Codroipo (UD)               | 0   | 15                           | 578                            | 0                             | N.D.                            | N.D.                          |
| Toscana   | Marciano della Chiana (AR)  | N.D.  | 1                            | 253,5                          | 0                             | 0                               | N.D.                          |

N.D.: non determinato (per problemi di danni alle trappole, eccesso d'acqua).

### *1.1.3 Prove strip-test utilizzando seme conciato con i diversi principi attivi*

#### *Materiali e metodi*

In alcuni campi della regione Veneto sono state eseguite prove agronomiche in cui la semina è stata fatta a strisciate realizzando parcelloni (strip-test) adiacenti di 300-1200 mq. Il seme utilizzato era l'ibrido commerciale PR32G44 (PIONEER) conciato con i seguenti prodotti:

- 1) Solo fungicida: metalaxil+fludioxonil (Celest<sup>®</sup>) alla dose di 100 ml/q di seme;
- 2) Cruiser: seme trattato con fungicida come sopra e thiametoxam (Cruiser<sup>®</sup>), alla dose di 0,65 mg di p.a./seme;
- 3) Regent: seme trattato con fungicida come sopra e fipronil (Regent<sup>®</sup> TS) alla dose di 0,50 mg di p.a./seme p.a.
- 4) Gaucho: seme trattato con fungicida come sopra e imidacloprid (Gaucho<sup>®</sup>) alla dose di 1,0 mg di p.a./seme.
- 5) Poncho: seme trattato con fungicida come sopra e clothiadinin (Poncho<sup>®</sup>) alla dose di 1,25 mg di p.a./seme

Le principali caratteristiche dei diversi campi sono sintetizzate in Tabella 8. Lo schema sperimentale prevedeva 2-4 ripetizioni per sito e sette località interessate.

I rilievi sperimentali eseguiti sono stati:

- investimento emergenza
- attacco seme - plantule
- investimento 4-8 foglie
- attacco 4-8 foglie
- altri attacchi (afidi, virus,...) 4-8 foglie
- investimento alla raccolta



**Tabella 8** - Caratteristiche dei campi sperimentali utilizzati nella sperimentazione 2010.

| Azienda          | Comune                  | PV | Terreno         | Coltura precedente | Popolazione elateridi             |   | Dimensione parcelloni (mq) | Data di semina | Densità di semina (semi/mq) | Data di raccolta |
|------------------|-------------------------|----|-----------------|--------------------|-----------------------------------|---|----------------------------|----------------|-----------------------------|------------------|
|                  |                         |    |                 |                    | larve/trappola <i>A. sordidus</i> | larve/trappola altri                              |                            |                |                             |                  |
| Greggio          | Eraclea, Ponte Crepaldo | VE | sabbioso-limoso | mais               | 0,50                              | 0,00  | 297                        | 18-apr         | 7,84                        | 23-ott           |
| Parcianello      | Eraclea, Coda di Gatto  | VE | medio impasto   | soia               | 0,05                              | 0,00  | 364                        | 21-apr         | 7,24                        | 07-ott           |
| San Donà, Isiata | Florian                 | VE | medio impasto   | mais               | 0,05                              | 9,95 <i>A. ustulatus</i>                          | 951                        | 17-apr         | 7,21                        | 21-ott           |
| Vallevecchia     | Caorle                  | VE | medio impasto   | soia               | 0,17                              | 0,00  | 459                        | 20-apr         | 7,25                        | 20-ott           |
| Zanazzo          | Cessalto                | TV | argilloso       | mais               | 0,33                              | 0,83 <i>A. ustulatus</i><br>0,25 <i>A. brevis</i> | 390                        | 20-apr         | 6,87                        | 14-ott           |
| Diana            | Mogliano Veneto         | TV | medio impasto   | frumento           | 0,08                              | 0,58 <i>A. ustulatus</i><br>0,25 <i>A. brevis</i> | 722                        | 15-apr         | 7,28                        | 11-ott           |
| Sasse Rami       | Ceregnano               | RO | medio impasto   | frumento           | 0,20                              | 0,06 <i>A. litigiosus</i>                         | 1395                       | 16-apr         | 7,13                        | 15-set           |

I risultati sono sintetizzati in Tabella 9. Le differenze tra investimenti non sono risultate statisticamente significative malgrado le piante attaccate, sia pur poche, siano risultate in modo statisticamente significativo superiori nel testimone.

Le contenute differenze tra le produzioni medie dei diversi trattamenti non sono risultate statisticamente significative. La media delle produzioni dei semi concianti con insetticidi è risultata pari a 119,85 q/ha, quella del testimone non trattato 119,3 q/ha.

**Tabella 9** - Effetto dei trattamenti concianti del seme sulla coltura del mais. Dati medi di 7 campi. Medie che non presentano alcuna lettera in comune sono statisticamente differenti a  $p < 0,05$ .

| TESI                | Investimento (pp sane/mq) |               | Piante attaccate |      | Produzione         |
|---------------------|---------------------------|---------------|------------------|------|--------------------|
|                     | <i>emergenza</i>          | <i>6-8 fg</i> | <i>pp/mq</i>     | %    | <i>q.li/ha 14%</i> |
| Fungicida solo      | 6,56a                     | 6,70a         | 0,16b            | 2,33 | 119,3a             |
| Fungicida + Cruiser | 6,34a                     | 6,67a         | 0,02a            | 0,29 | 117,4a             |
| Fungicida + Regent  | 6,46a                     | 7,03a         | 0,05a            | 0,71 | 119,4a             |
| Fungicida + Gaucho  | 6,43a                     | 6,69a         | 0,03a            | 0,45 | 119,5a             |
| Fungicida + Poncho  | 6,46a                     | 6,77a         | 0,04a            | 0,59 | 123,1a             |
| F 4,95 (ANOVA)      | 0,16                      | 1,73          | 7,07             |      | 0,26               |
| P                   | 0,9583                    | 0,1498        | 0,0001           |      | 0,9047             |

## 1.2 Studio della persistenza nella pianta dei principi attivi usati per la concia

### *Materiali e metodi*

Per quanto riguarda lo studio della persistenza dei principi attivi usati per la concia a vari stadi di sviluppo della pianta di mais, presso l'Azienda Sperimentale CRA-MAC, sono state allestite parcelle di lunghezza di 50 m, nelle quali è stato seminato il materiale inviato dall'Associazione Italiana Sementi-Assosementi, l'ibrido commerciale di mais (PR31N27- FAO 700) secondo le seguenti 5 tesi:

| Tesi          | Fungicida | Principio attivo insetticida |
|---------------|-----------|------------------------------|
| 1 – Testimone | *Celest   | nessuno                      |
| 2 – Cruiser   | *Celest   | thiamethoxam                 |
| 3 – Gaucho    | *Celest   | imidacloprid                 |
| 4 – Poncho    | *Celest   | clothianidin                 |
| 5 – Regent    | *Celest   | fipronil                     |

\*Il fungicida Celest contiene fludioxonil e metalaxyl.

Nell'ambito di tali parcelle sono stati effettuati prelievi, per ciascuna delle cinque tesi sotto studio, di parti vegetative della pianta di mais a diversi stadi fenologici.

La valutazione della persistenza del principio attivo conciante a vari stadi di sviluppo della pianta di mais, è stata effettuata adattando il metodo HPLC/MS/MS, secondo Buone Pratiche di Laboratorio (B.P.L. Prot. CH-012-2010-Test Laboratory of ChemService Prot. CH - 013/2010), adattando il protocollo riportato da Bonmatin et al 2003, Anal.Chem. , 75, 2027- 2033.

### *Risultati*

In Tabella 10 sono indicati i fattori di diluizione rispetto al contenuto iniziale, riportato ad 1 (unità di diluizione) pari al 100% del principio attivo contenuto nel singolo seme, per ciascun principio attivo conciante a vari stadi di sviluppo della pianta di mais. I risultati, indicano una drastica

riduzione dei quattro principi attivi insetticidi sotto studio nelle foglie a partire dallo stadio di 2<sup>a</sup> -3<sup>a</sup>, alla 7<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> foglia, sino a raggiungere livelli non rilevabili (n.d. : not detected, lower than L.O.D. < 0.5 µg/kg) allo stadio di 13<sup>a</sup> -14<sup>a</sup> foglia. In particolare, Fipronil subisce una drastica riduzione fin dai primi stadi di sviluppo della pianta (2<sup>a</sup> -3<sup>a</sup> foglia), mentre gli altri tre principi attivi persistono, a questo stadio, ad una concentrazione più elevata.

Lo studio della persistenza dei principi attivi usati per la concia a livello del polline è stata completata con la collaborazione dei colleghi del Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (CRA-PAV) e ha indicato che in tutte le tesi sotto studio i quattro principi attivi insetticidi non raggiungono livello rilevabili (n.d., not detected, lower than L.O.D. < 0,2 µg/kg).

**Tabella 10** – Persistenza del principio attivo conciante a vari stadi di sviluppo della pianta di mais.

| <b>Principio attivo<br/>Insetticida</b> | <b>Seme conciato</b> | <b>2<sup>A</sup> -3<sup>a</sup> foglia</b> | <b>7<sup>a</sup> - 8<sup>a</sup> foglia</b> | <b>13<sup>a</sup> -14<sup>a</sup> foglia</b> |
|---|----------------------|--|---|--|
|   | Contenuto iniziale*  | Fattore di diluizione                      | Fattore di diluizione                       | Fattore di diluizione                        |
| Thiamethoxam                            | 1*                   | 16.500                                     | 79.260                                      | > 428.000                                    |
| Imidacloprid                            | 1*                   | 7.150                                      | 155.200                                     | > 714.000                                    |
| Clothianidin                            | 1*                   | 5.500                                      | 71.900                                      | > 892.000                                    |
| Fipronil                                | 1*                   | 94.200                                     | 162.700                                     | > 358.000                                    |

\*Contenuto iniziale riportato ad 1 (unità di diluizione) pari al 100% del principio attivo contenuto nel singolo seme.

## **2. Effetti dell'impolveramento delle api durante il sorvolo di un campo seminato con mais conciato**

### **2.1 Premessa**

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'effetto dell'esposizione diretta di api in volo alla polvere emessa dalla seminatrice durante la semina di mais conciato. In particolare si è voluto verificare l'ipotesi che le api, nei ripetuti voli verso le piante in fiore, che prevedano un sorvolo degli appezzamenti seminati con mais conciato, possano intossicarsi in modo letale a causa della polvere assunta in volo durante il tragitto.

Ciò è stato fatto mediante l'utilizzo di due diversi protocolli: api in volo libero e api all'interno di gabbie mobili.

Prove preliminari con api chiuse all'interno di gabbie di tulle e direttamente esposte alle polveri emesse dalla seminatrice, avevano infatti dimostrato un effetto tossico di questo tipo di esposizione (Marzaro *et al.*, 2011. Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *Bulletin of Insectology* 64 (1): 119-126, 2011); tuttavia in queste condizioni le api non potevano fuggire dalla gabbietta ed evitare quindi il contatto con le polveri. Per simulare condizioni più simili a quelle di campo, in cui si verifica un rapido contatto col particolato emesso dalla seminatrice, è stata allestita anche una sperimentazione in cui le api venivano addestrate a visitare un alimentatore contenente soluzione di acqua e zucchero volando su un campo seminato a mais. Le sperimentazioni sono state condotte nel 2009 e nel 2010 e in parte completate nel 2011.

### **2.2 Api in volo libero**

#### ***2.2.1 Materiali e metodi***

Le prove sono state condotte presso l'Azienda Agraria Sperimentale della Facoltà di Agraria, sita in Legnaro (PD), dove erano presenti 4 alveari forniti dall'associazione apicoltori di Padova. Le api dei 4 alveari sono state addestrate a visitare un alimentatore del diametro di 25 cm, contenente soluzione di saccarosio. L'alimentatore, che era di colore marrone per confondersi con il terreno e non attirare api di altri apiari, è stato progressivamente distanziato dagli alveari fino ad una distanza di circa 100 m. Le api, partendo dall'apiario (45°20'39.45"N; 11°57'16.05"E) per raggiungere l'alimentatore, dovevano alzarsi per almeno 2-3 m, per sorvolare una screen-house, un piccolo vigneto, attraversare una strada e 70 m di terreno arato. Osservando il volo delle api, è stato possibile vederle volare intorno ai 2 m di altezza e sono state contate un centinaio di api al minuto in andata e in ritorno dalla fonte di cibo.

Per la semina è stato utilizzato un appezzamento di terreno 50m x 70m e le semine sono state effettuate nella prima parte dell'appezzamento, tra 35 e 65 m dagli alveari e ad almeno 35 m dall'alimentatore. È stata utilizzata una seminatrice MONOSEM NG-Plus (Monosem, Largeasse-Francia) a 4 file, essendo la più utilizzata per la semina del mais presso l'azienda della Facoltà.

Sono stati distribuiti dai 73.000 ai 74.000 semi/ha. La velocità di avanzamento della macchina era di 6-7 km/h, velocità per cui, con una larghezza effettiva di semina di 3 m, essa impiegherebbe teoricamente 30 minuti per seminare 1 ha, anche se, in realtà, ne impiega circa 45 minuti. L'uscita dell'aria (150 l/sec) posta sulla parte destra della seminatrice, scaricava ad 1,8 m di altezza, con un angolo di 45° rispetto all'orizzonte.

Il seme utilizzato è stato fornito dall'A.I.S. (Associazione Italiana Sementi) e l'ibrido impiegato è stato il X1180D 964890 prodotto da Pioneer Hi-bred Italia negli anni 2009 e 2010 e conciato con Celest® XL, Poncho®, Cruiser®, Gaucho® 350FS e Regent® FS.

Quando le api, solite a sorvolare l'appezzamento per raggiungere l'alimentatore, incontravano la sagoma della seminatrice, la evitavano o sorvolandola, o scansandola di lato a distanza di pochi metri dalla stessa. Era possibile osservare questo comportamento, guardando la seminatrice in azione con il sole alle spalle.

All'inizio della semina e successivamente ad intervalli di 15 minuti, le api venivano catturate presso l'alimentatore con una provetta, poste singolarmente in gabbiette di tulle 5 x 5 cm e alimentate con una goccia di miele posta sulla rete della gabbietta e periodicamente rinnovata. Sono stati catturati campioni di 24 api per ogni intervallo di tempo, il primo al momento dell'avviamento del trattore e i successivi ad intervalli di 15 minuti dall'inizio della semina. I campioni di 24 api nelle gabbiette sono stati quindi portati in laboratorio a temperatura condizionata di  $22 \pm 1,5^\circ\text{C}$  e di questi, per ogni intervallo orario, metà (12 gabbiette) scelte a caso sono state tenute nelle condizioni di umidità del laboratorio, mentre l'altra metà (12 gabbiette) sono state poste in box ad umidità vicino alla saturazione (>95%).

L'elevata umidità relativa veniva ottenuta ponendo le gabbiette entro box di plastica trasparente, chiusi non ermeticamente con lastre di plexiglass e ponendo sulla base un foglio di carta umida. Le pareti e il coperchio venivano spruzzate con acqua e le gabbiette erano rialzate con una striscia di polistirolo rispetto al fondo per evitare che le api si bagnassero con l'acqua che poteva restare sul fondo del box. In totale sono state saggiate 120 api per ciascun principio attivo (24 api per 5 intervalli orari) tranne che per il thiamethoxam in cui le api erano 72 (24 api per 3 intervalli orari).

Ciascuna prova è durata in tutto 60 minuti. In tutte le prove, ad un'ora dalla fine della semina e il giorno successivo, sono state contate le api morte davanti agli alveari; in alcune prove sono inoltre stati prelevati campioni di api sia davanti all'alveare, sia attorno all'alimentatore, e sottoposti ad analisi chimica.

### 2.2.2 Risultati

La mortalità delle api catturate ai diversi intervalli di tempo dalla semina a mantenute in condizioni di umidità diverse in laboratorio sono riportate nelle Tabelle 11, 12 e 13.

Le api catturate all'inizio della semina non hanno manifestato alcun sintomo di intossicazione e non si è avuta mortalità in nessuna delle due condizioni di umidità; le api catturate successivamente all'inizio della semina, viceversa, hanno mostrato, in condizioni di alta umidità, una mortalità del 100% entro le 24 ore, ma alcune già dopo un'ora dalla fine della semina. Alle condizioni di umidità di laboratorio, invece, la mortalità è stata inferiore. Già nel breve periodo è visibile la sinergia tra esposizione alle polveri ed elevata umidità.

**Tabella 11** - Mortalità delle api bottinatrici catturate in campo presso l'alimentatore dopo aver sorvolato la macchina seminatrice durante la semina di mais conciato con fipronil.

| Minuti dall'inizio della semina con fipronil | Numero di api morte/Numero totale di api nella gabbietta |                      |                       |                      |                      |                       |
|--|--|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|  | UMIDO  |                      |                       | SECCO                |                      |                       |
|  | 1 ora dopo la semina                                     | 2 ore dopo la semina | 24 ore dopo la semina | 1 ora dopo la semina | 2 ore dopo la semina | 24 ore dopo la semina |
| 0  | 0/12   | 0/12                 | 0/12                  | 0/12                 | 0/12                 | 0/12                  |
| 15   | 12/12  | 12/12                | 12/12                 | 4/12                 | 9/12                 | 11/12                 |
| 30   | 12/12  | 12/12                | 12/12                 | 1/12                 | 6/12                 | 10/12                 |
| 45   | 10/12  | 12/12                | 12/12                 | 8/12                 | 9/12                 | 11/12                 |
| 60   | 9/12   | 12/12                | 12/12                 | 0/12                 | 3/12                 | 8/12                  |

**Tabella 12** - Mortalità delle api bottinatrici catturate in campo presso l'alimentatore dopo aver sorvolato la macchina seminatrice durante la semina di mais conciato con thiamethoxam.

| Minuti dall'inizio della semina con thiamethoxam | Numero di api morte/Numero totale di api nella gabbietta |                       |                      |                       |
|--|--|-----------------------|----------------------|-----------------------|
|  | UMIDO  |                       | SECCO                |                       |
|  | 2 ore dopo la semina                                     | 24 ore dopo la semina | 2 ore dopo la semina | 24 ore dopo la semina |
| 0  | 0/12   | 0/12                  | 0/12                 | 0/12                  |
| 15   | 12/12  | 12/12                 | 6/12                 | 12/12                 |
| 30   | 12/12  | 12/12                 | 6/12                 | 10/12                 |

**Tabella 13** - Mortalità delle api bottinatrici catturate in campo presso l'alimentatore dopo aver sorvolato la macchina seminatrice, nelle diverse prove, in base al tipo di concia al momento di cattura e alle condizioni di umidità.

| Data di semina | Conciante e anno               | Umidità | Tempo di cattura dall'inizio di semina (min) |       |       |       |       |
|----------------|--------------------------------|---------|--|-------|-------|-------|-------|
|                |                                |         | 0  | 15    | 30    | 45    | 60    |
| 14/07/2009     | Clothianidin 2009              | 70%     | 0/12   | 0/12  | 0/12  | 0/12  | 0/12  |
|                |                                | >95%    | 0/12   | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 |
| 23/07/2009     | Imidacloprid 2009 (1)          | 70%     | 0/12   | 2/12  | 0/12  | 1/12  | 3/12  |
|                |                                | >95%    | 0/12   | 12/12 | 11/12 | 12/12 | 12/12 |
| 15/10/2009     | Imidacloprid 2009 (2)          | 70%     | 0/12   | 0/12  | 0/12  | 1/12  | 4/12  |
|                |                                | >95%    | 0/12   | 10/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 |
| 02/09/2010     | Fludioxonil + Metalaxil-M 2010 | 70%     | 0/12   | 0/12  | 0/12  | 1/12  | 0/12  |
|                |                                | >95%    | 0/12   | 0/12  | 1/12  | 0/12  | 1/12  |
| 02/09/2010     | Clothianidin 2010              | 70%     | 0/12   | 1/12  | 1/12  | 3/12  | 5/12  |
|                |                                | >95%    | 0/12   | 7/12  | 12/12 | 11/12 | 12/12 |

I primi risultati delle analisi chimiche delle api morte nelle gabbiette in laboratorio, indicano livelli di contaminazione in media superiori ai 500 ng/ape di p.a..

Nelle prove con fipronil e thiamethoxam, davanti agli alveari sono state osservate alcune centinaia di api morte o moribonde espulse nelle ore immediatamente successive alla prova e nel giorno seguente, con un massimo di 1000 api morte davanti ad alcune arnie. Nei campioni di api raccolte il giorno successivo davanti agli alveari, sono risultati presenti, in media, più di 100 ng/ape. Non sono comunque stati valutati gli effetti sulle colonie, che apparentemente non hanno mostrato evidenti riduzioni nel volo delle bottinatrici.

Nella prova con clothianidin 2009, le api morte di fronte ai 4 alveari erano 400 dopo 3 ore dalla prova e 1490 il giorno successivo.

Nella prova imidacloprid 2009 (1) la mortalità è stata contenuta (inferiore a 50 api per i 4 alveari) mentre nella (2) le api morte di fronte all'alveare erano 300 il giorno stesso e 500 quello successivo.

Nella prova con clothianidin 2010 le api morte di fronte ai 4 alveari hanno raggiunto il centinaio il giorno successivo. I risultati delle analisi chimiche delle api morte raccolte nel corso delle sperimentazioni con imidacloprid 2009 e clothianidin 2009, sia all'alveare che all'alimentatore, sono indicati in Tabella 14.

**Tabella 14** - Residui di neonicotinoidi nei campioni di api morte raccolte davanti agli alveari e presso l'alimentatore al termine di due prove di sorvolo.

| Data di semina | Conciante e anno      | Luogo di raccolta | Tempo di raccolta dopo la semina | N. di api analizzate | Quantità di p.a. (ng/ape) |
|----------------|-----------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------|---------------------------|
| 14/07/2009     | Clothianidin 2009     | alimentatore      | 30 min                           | 7                    | 674                       |
|                |                       | alveare           | 3 ore                            | 7                    | 161                       |
|                |                       | alveare           | 24 ore                           | 7                    | 118                       |
| 15/10/2009     | Imidacloprid 2009 (2) | alimentatore      | 30 min                           | 4                    | 3.661                     |
|                |                       | alimentatore      | 45 min                           | 8                    | 442                       |
|                |                       | alveare           | 3 ore                            | 8                    | 500                       |
|                |                       | alveare           | 4 ore                            | 8                    | 53                        |

## 2.3 Api in gabbie mobili

### 2.3.1 Materiali e metodi

Per questa sperimentazione sono stati utilizzati per le semine semi concitati nel 2010 con le seguenti formulazioni: Poncho®, Gaucho® e Cruiser® 350FS.

È stata valutata l'influenza di un veloce impolveramento, per simulare un singolo volo d'ape sopra la seminatrice, attraverso l'utilizzo di una barra in alluminio lunga 4 metri a cui venivano appese ogni 40 cm delle gabbiette contenenti una singola ape (10 api in totale). La barra era supportata da 2 pali verticali lunghi 2,5 metri; l'esposizione era garantita da due operatori che muovendola passavano a 5-7 km orari in modo da intercettare la nuvola di polvere prodotta dalla seminatrice a distanze predeterminate (0-4 metri e 4-8 metri). L'esposizione avveniva sul lato destro della seminatrice e parallelamente alla direzione del trattore in modo tale che vi fosse un'estremità della barra che si trovava a all'altezza del trattore mentre l'altra estremità a 4 metri da questo.

Viceversa per i passaggi a 4-8 metri dal trattore c'era un'estremità della barra che si trovava a 4 metri mentre l'altra a 8 metri dal trattore. Per ogni distanza sono state fatte due ripetizioni, ognuna delle quali consisteva in un andata ed un ritorno di pari passo con la seminatrice. Una volta esposte alle emissioni le gabbiette con le singole api venivano poste in laboratorio tutte in condizioni di alta umidità come sopra descritto. La mortalità veniva registrata entro le 24 h.

In una successiva prova fatta con il principio attivo imidacloprid sono state testate delle api ponendole nelle gabbiette di tulle appese sull'asta mobile per ottenere diverse distanze dalla seminatrice durante la semina, successivamente son state fatte passare una sola volta avanti e indietro, un gruppo a destra e un gruppo a sinistra della seminatrice. Delle venti api esposte per parte si è deciso di analizzarne cinque per il rilevamento del contenuto di insetticida in esse presente.

### 2.3.2 Risultati

I risultati della prova di sorvolo in gabbie mobili sono riportati nella Tabella 15. Nelle prove fatte con imidacloprid e clothianidin le api poste alla distanza di 0-4 metri hanno manifestato una mortalità superiore a quella delle api esposte a 4-8 metri, mentre nella prova con thiamethoxam la mortalità è stata la stessa per le due distanze. Per tutti e tre i principi attivi la mortalità è stata significativamente alta rispetto al testimone contenente solo fungicida.

**Tabella 15** - Mortalità di api esposte alle emissioni della seminatrice con il metodo della gabbia mobile.

| Principio attivo      | Distanza di esposizione dalla seminatrice | Morte | Sopravvissute | Totale api testate |
|-----------------------|---|-------|---------------|--------------------|
| Imidacloprid          | 0-4                                       | 16    | 4             | 20                 |
|                       | 4-8                                       | 11    | 9             | 20                 |
| Clothianidin          | 0-4                                       | 20    | 0             | 20                 |
|                       | 4-8                                       | 17    | 3             | 20                 |
| Thiamethoxam          | 0-4                                       | 13    | 7             | 20                 |
|                       | 4-8                                       | 13    | 7             | 20                 |
| Metalaxil-fludioxinil | 0-4                                       | 1     | 19            | 20                 |
|                       | 4-8                                       | 0     | 20            | 20                 |

I risultati delle analisi delle api per le prove di sorvolo a destra e a sinistra della seminatrice sono riportati in Tabella 16. Premettendo che lo scarico della seminatrice è rivolto verso destra, si nota come nelle api in tale posizione si riscontrino concentrazioni di p.a. nettamente superiori rispetto a quelle esposte nel lato sinistro.

**Tabella 16** - Contenuto di imidacloprid in api esposte alle emissioni di polvere a destra e a sinistra della seminatrice con gabbia mobile.

| Distanza dalla seminatrice | ng/ape api esposte alla destra della seminatrice | ng/ape api esposte alla sinistra della seminatrice |
|----------------------------|--|--|
| 1 m                        | 4786,3 ± 0,6                                     | -  |
| 2,25 m                     | 457,3 ± 0,6                                      | 410 ± 2  |
| 4,5 m                      | 142,3 ± 0,6                                      | 110 ± 1  |
| 6,75 m                     | 523 ± 3  | 98 ± 2   |
| 9 m                        | 198,7 ± 0,6                                      | 33 ± 1   |

## 2.4 Conclusioni

I risultati della sperimentazione indicano che quando un'ape, nel suo tragitto verso la fonte di cibo, sorvola una seminatrice che semina mais conciato con insetticidi, può assumere una dose letale di principio attivo, probabilmente anche con un singolo volo.

Quest'ultima tesi è supportata dai test con gabbia mobile che consentono di conoscere i tempi di esposizione degli insetti alle emissioni, mentre nel volo libero non è possibile quantificare il numero di voli con cui l'ape si è contaminata. Inoltre è dimostrato che le polveri della seminatrice sono sufficienti a uccidere le api, senza che l'intossicazione sia mediata dall'assunzione di cibo contaminato. Quest'ultima ipotesi, formulata per spiegare la moria delle api conseguente alla semina di mais conciato, prevede che in seguito alla ricaduta delle polveri contaminate sulla vegetazione limitrofa ai seminativi, i principi attivi presenti nella concia, idrosolubili e con attività sistemica, possano penetrare nella vegetazione ed entrare in circolo, raggiungendo nettare e polline e avvelenando così le api che se ne nutrono. Tale ipotesi, seppur credibile e non priva di fondamento, non spiegherebbe comunque la morte delle api poche ore dopo il passaggio della seminatrice.

Un altro aspetto interessante della sperimentazione del volo libero è l'effetto dell'umidità sull'incremento della mortalità; le api poste alle condizioni di umidità del laboratorio sono morte in misura molto minore, nonostante avessero subito lo stesso impolveramento di quelle poste in condizioni di elevata umidità, dato che i due gruppi sono stati separati a caso. Emerge quindi che quantità anche di 500 ng/ape, non sono necessariamente letali in condizioni di bassa U.R.

La dimostrazione che le api si contaminano con dosi ampiamente superiori alla DL50 è data dalle analisi chimiche che hanno rilevato quantità di principio attivo che vanno dai 200 ai 4700 ng/ape di p.a. in api esposte sul lato destro della seminatrice con gabbia mobile; in api esposte in volo libero alle polveri e ritrovate morte presso alveari e abbeveratoio sono state rilevate elevate quantità di principio attivo che in media si è attestato su 800 ng/ape.

Lo scenario è quindi il seguente: quando le api incontrano la seminatrice si impolverano di una dose potenzialmente letale di neonicotinoide; se le condizioni di U.R. sono elevate, le api muoiono nel volgere di alcune ore; se invece l'aria è asciutta, esse di norma sopravvivono e l'associazione tra seminatrice pneumatica, mais conciato con neonicotinoidi e moria delle api, non sembra evidente. Una volta impolverate, le api possono morire presso la fonte di cibo (come osservato nei pressi dell'alimentatore), lungo il tragitto di volo oppure successivamente al rientro nell'alveare, in tal caso vengono espulse dalle compagne, che possono a loro volta essere contaminate dalle polveri.

A queste problematiche si aggiunge il fatto che le aree dove si semina il mais costituiscono, ad esempio per la provincia di Padova, il 30% della superficie totale (> 65.000 ha su 215.000 ha) e circa il 50% della SAU (Superficie Agraria Utile), 136.000 ha (dati Regione Veneto-Direzione Sistema Statistico Regionale, 2006). Il mais è inoltre seminato in piccoli appezzamenti frammisti ad altre colture e aree verdi, come è facile osservare consultando il territorio via web con riferimento



alle coordinate sopra citate, dove è più probabile che si verifichi il fenomeno sopra descritto e simulato con questa sperimentazione. Non si può escludere che per questo stesso motivo, anche in altri paesi (ad es. la Germania) le morie sono state riscontrate in aree frammiste (Nikolakis *et al.* 2009), mentre in presenza di monocoltura, come in Francia, è meno probabile che le api attraversino i seminativi, vista l'assenza di fioriture. Pertanto il problema della mortalità primaverile delle api sarebbe legato alla frammentazione delle colture e agli abituali voli di bottinamento delle api, che con alta probabilità le portano a sorvolare appezzamenti seminati a mais.

### **3. PER(*proboscis extension reflex*)-test per saggiare gli effetti di clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam e fipronil somministrato attraverso le polveri contaminate**

#### **3.1 Materiali e metodi**

**Alveari, numero api, ripetizioni:** E' stato utilizzato un solo alveare, e sono state condotte 3-4 ripetizioni (di 9-11 api ciascuna).

**Cattura:** Le api sono state catturate e poste in apposite gabbiette cilindriche di Plexiglass aventi come fondo una piastra Petri del diametro di 8 cm (10 api per gabbietta). Ogni gabbietta aveva inserita sul coperchio una siringa, adattata ad alimentatore, già al momento della cattura.

**Principi attivi saggiati:** clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam e fipronil.

**Ottenimento delle polveri contaminate:** la polvere per le sperimentazioni è stata estratta da partite di semi concianti forniti da Assosementi presso il CRA-ING di Roma, utilizzando il cilindro Heubach.

**Concentrazioni saggiate:** la quantità di principio attivo per superficie (concentrazione) utilizzato nelle nostre ricerche è stata pari a quella ricaduta a 5 m dal campo di semina nelle sperimentazioni di campo APENET 2009 che utilizzavano la seminatrice con modifica, e concentrazioni 10, 100 e 1000 volte superiori ad essa.

Poiché sono state utilizzate gabbiette sperimentali con una superficie totale di 56,72 cm<sup>2</sup>, aventi come fondo una capsula Petri di 8 cm di diametro, la quantità di polvere utilizzata per ogni gabbietta è stata calcolata in proporzione alla superficie a disposizione (Tabella 17).

La preparazione e miscelazione con talco per ottenere dalla polvere concentrata del principio attivo estratta dall'Heubach alle concentrazioni subletali da utilizzare è stata effettuata presso il DiSTA. In ogni contenitore sono stati posti 0,01 g di talco contenente la quantità di p.a. calcolata.

In ciascuna gabbietta sono state poste 10 api.

**Tabella 17** - Quantità di p.a. per superficie saggiate.

|  | <b>Chlotianidin</b> | <b>Imidacloprid</b> | <b>Thiamethoxam</b> | <b>Fipronil</b> |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| % p.a. nelle polveri   | 33                  | 31,1                | 33,5                | 32              |
| P.a. a 5 metri (µg/m <sup>2</sup> )                                  | 2,25                | 3,63                | 2,53                | 0,91            |
| Polvere totale a 5 m (µg/m <sup>2</sup> )                            | 6,82                | 11,67               | 7,55                | 2,84            |
| Polvere in una Petri da 8,5 cm di diametro (=56,72 cm <sup>2</sup> ) | 0,039               | 0,066               | 0,043               | 0,016           |
| <b>Quantità di p.a. x 1</b>  | <b>0,012762</b>     | <b>0,020589</b>     | <b>0,014350</b>     | <b>0,005162</b> |
| Quantità di p.a. x 10  | 0,12762             | 0,205894            | 0,143502            | 0,051615        |
| Quantità di p.a. x 100   | 1,2762              | 2,058936            | 1,435016            | 0,516152        |
| Quantità di p.a. x 1000  | 12,762              | 20,58936            | 14,35016            | 5,16152         |
| DL50 contatto (µg/ape)   | 0,0218              | 0,0179              | 0,0299              | 0,006           |

**Modalità di contaminazione con il principio attivo:** Le api in uscita dall'alveare sono state catturate e poste nelle gabbiette cilindriche. Immediatamente dopo la cattura, il fondo di ogni gabbietta è stato sostituito con una capsula Petri sulla quale era stata distribuita la quantità di p.a. stabilita. Ogni unità sperimentale è stata mantenuta per 3 ore (dalla somministrazione del prodotto) in un incubatore a 26° C al buio. Le api avevano disponibilità di soluzione zuccherina fin dalla cattura. L'alimentatore è stato rimosso dopo due ore per affamare le api in preparazione al PER test.

**Preparazione delle api per il PER:** Ogni ape è stata inserita, singolarmente, all'interno di contenitori ottenuti da puntali per pipette Gilson.

**Training:** Il training ha avuto inizio con l'abituarle l'ape ad un flusso d'aria per 15 secondi, cui sono seguite:

1 esposizione al citronello per 5 secondi (goccia uscente da una siringa da insulina tenuta ad 1 cm dal capo dell'ape), seguita dal tocco delle antenne con la siringa con il citronello e dall'offerta del premio (soluzione zuccherina) per 1 secondo.

2 dopo 6' esposizione all'odore di menta piperita (stesse modalità di cui sopra) seguita dal tocco delle antenne e dalla somministrazione di una soluzione salina

3 dopo 6' esposizione nuova all'odore premiato (citronello) per 5 secondi con le stesse modalità, seguita dall'offerta di premio.

**Test.** A distanza di 60', 180', e 24 h dall'ultima prova del training si è testata la capacità di riconoscere l'odore presentando all'ape l'odore corretto e quello sbagliato e verificando la percentuale delle 4 categorie di risposte di seguito descritte:

- risposta corretta C+M-: estensione della ligula alla presentazione dell'odore premiato nell'addestramento (citronello), ma non di quello associato alla soluzione salina (menta piperita);
- parzialmente corretta C+M+: risposta ad entrambi gli odori;
- risposta parzialmente sbagliata C-M-: non risponde ad alcun odore;
- risposta sbagliata C-M+: (estende la ligula in presenza dell'odore errato e non di quello ricompensato nell'addestramento)

Ogni test è consistito in 10 prove con presentazione alternata dell'odore premiato e di quello associato alla punizione (cioè 10 presentazioni dell'odore premiato e 10 dell'odore punito) cominciando dall'odore punito.

Durante le presentazioni all'ape non è stata offerta né la ricompensa né la punizione.

Le api sono state nutrite al termine del test a 180' con una goccia da 30 µl per ape.

**Vitalità al termine del test :** Dopo il test delle 24h le api sono state liberate in una gabbia di volo per rilevare i dati di vitalità legati alle funzionalità motorie. Sono stati registrati i seguenti comportamenti: vola (V); cammina (C); rantola (R) .

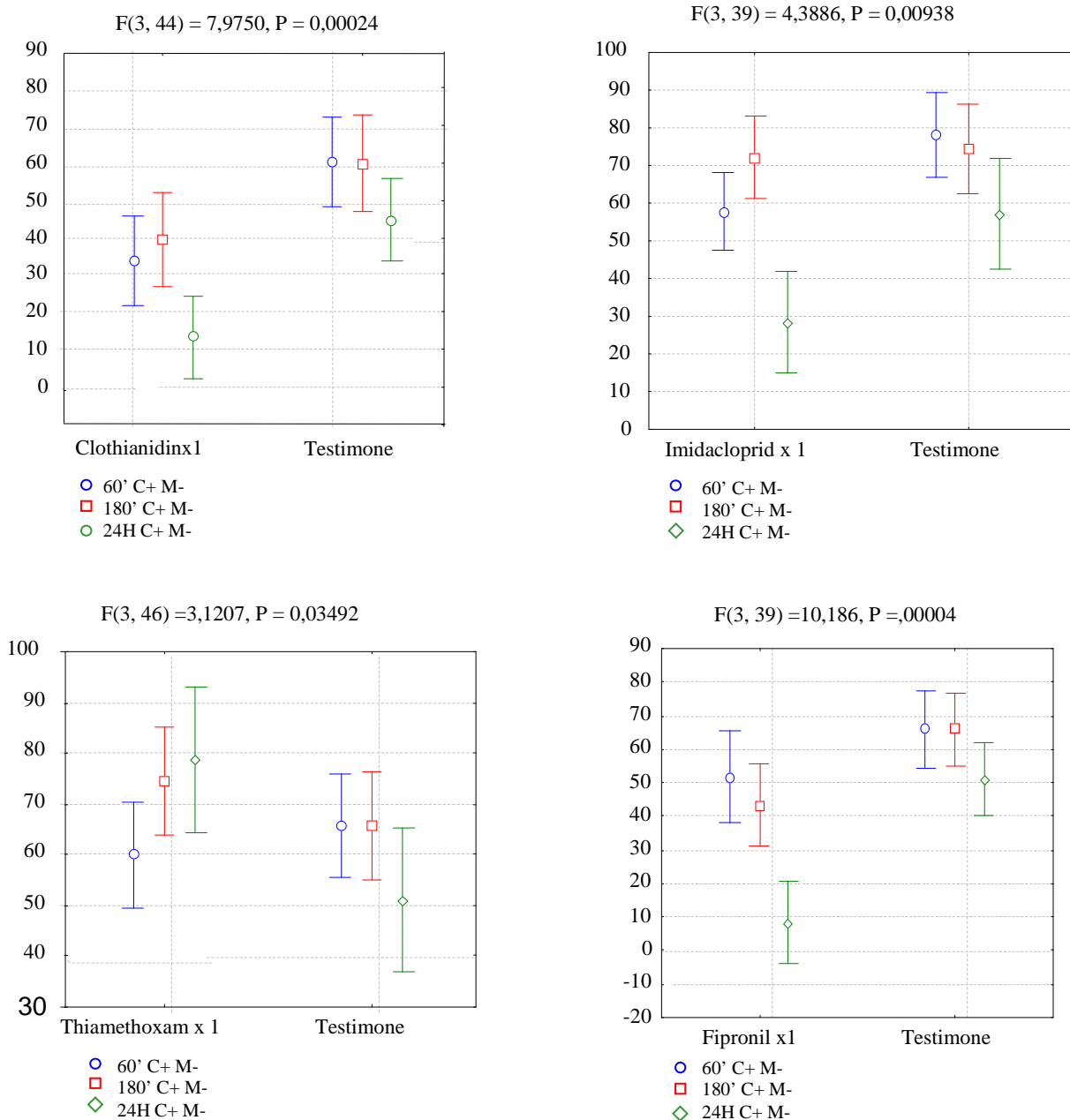
**Analisi dei dati:** Dopo aver verificato la sussistenza dei presupposti (omogeneità delle varianze) è stata condotta un' ANOVA a una via per ogni principio attivo e per ogni intervallo di tempo, considerando come fattori principali il trattamento (p.a., testimone non trattato).

### 3.2 Risultati

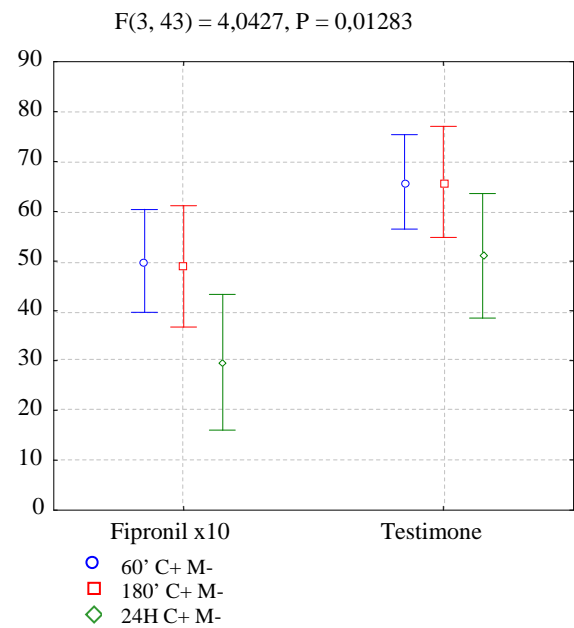
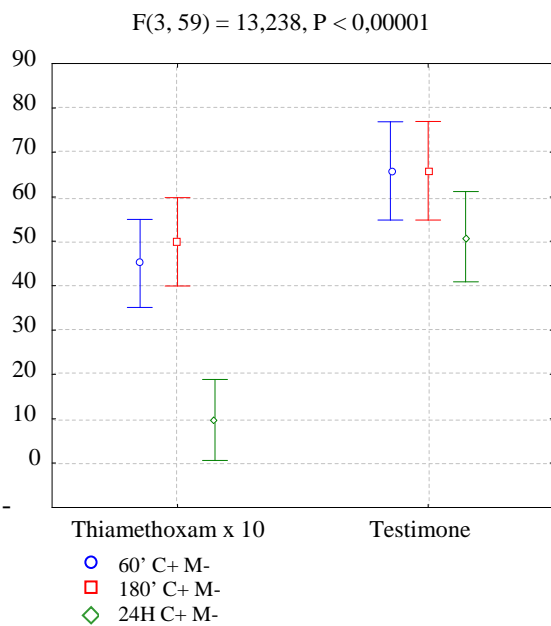
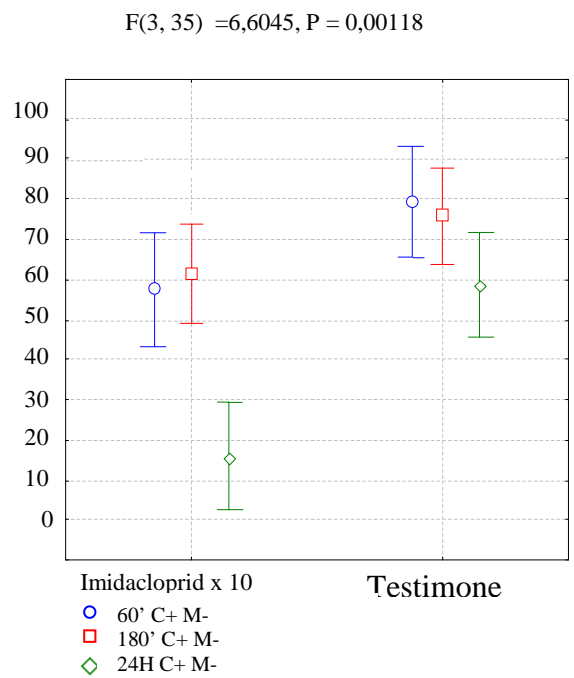
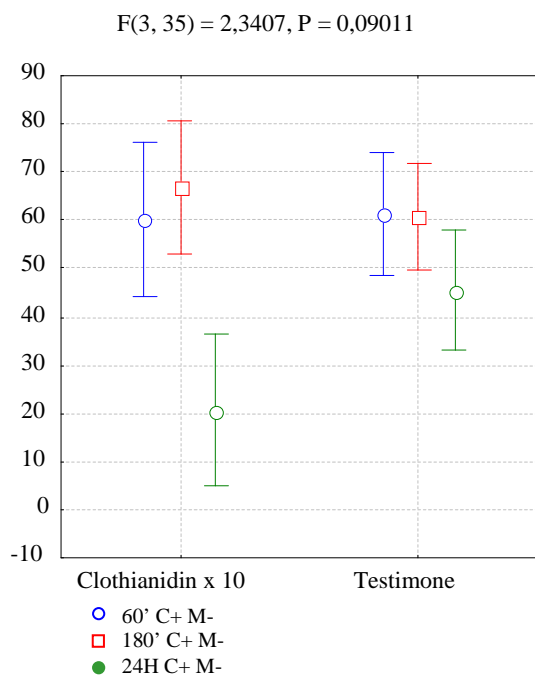
I grafici seguenti mostrano le percentuali di risposte corrette ai diversi intervalli di tempo (60', 180', 24h) per tutti i principi attivi a concentrazioni crescenti, da quella corrispondente alla quantità di p.a. depositato dalla seminatrice a 5 metri (indicati come x1) a concentrazioni x10, x100, x1000. Precisiamo che le sperimentazioni qui descritte hanno riguardato le api sopravvissute all'esposizione, poiché, tali concentrazioni hanno avuto effetti notevoli di mortalità, come del resto rilevata da altre ricerche condotte nell'ambito del progetto APENET. L'esposizione di gruppi di api è stata quindi ripetuta più volte fino ad avere numeri sufficienti di api sopravvissute da sottoporre ai test comportamentali.

I risultati mostrano un effetto significativo del trattamento con tutti i p.a. saggiati sulla capacità di riconoscere gli odori. La percentuale di risposte pienamente corrette (estensione della proboscide in presenza del citronello e non della menta, C+M-) è infatti significativamente inferiore nelle api trattate rispetto ai testimoni non trattati come dimostrano i dati riportati nelle Figure 2-5.

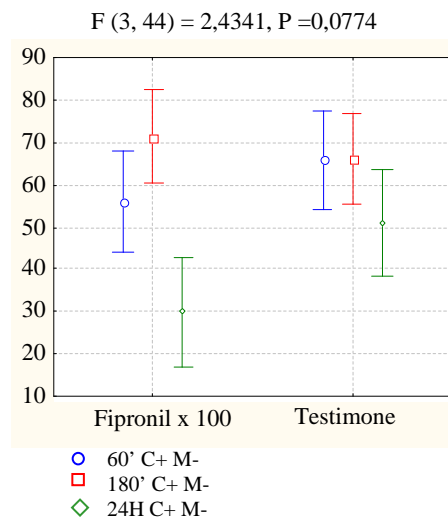
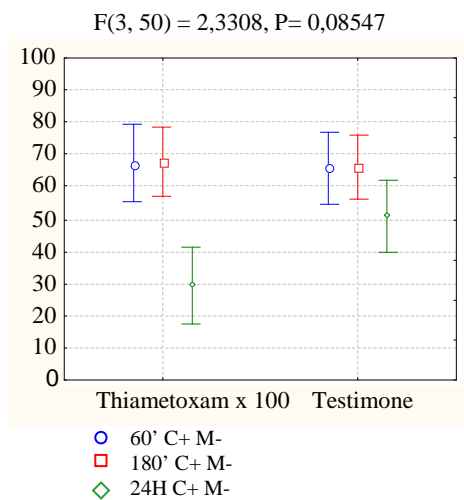
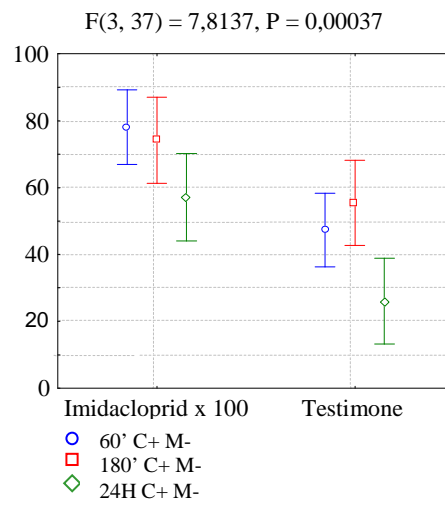
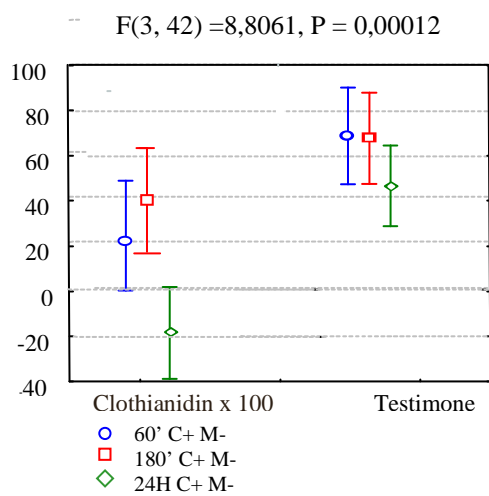
Le differenze, come atteso, riguardano soprattutto la capacità di riconoscere gli odori dopo 24 ore dall'esposizione, anche se una riduzione significativa si evidenzia anche dopo 180' per clothianidin. Questi dati dimostrano un chiaro effetto negativo di dosi sub letali dei p.a. testati sulla capacità di formare e/o recuperare la memoria olfattiva, sia che l'ape sia stata esposta a dosi pari a quelle calcolate/misurate in campo, sia se sopravvive all'esposizione a dosi molto maggiori, come potrebbe verificarsi in caso di deriva causata dal vento, o durante l'attraversamento in volo della nuvola in cui si trovano sospese le particelle fuoriuscite durante la semina. Alla liberazione, al termine del test delle 24 ore, le api erano tutte in grado di camminare e/o volare, e si può quindi escludere che la mancata risposta fosse da imputare ad una compromissione motoria.



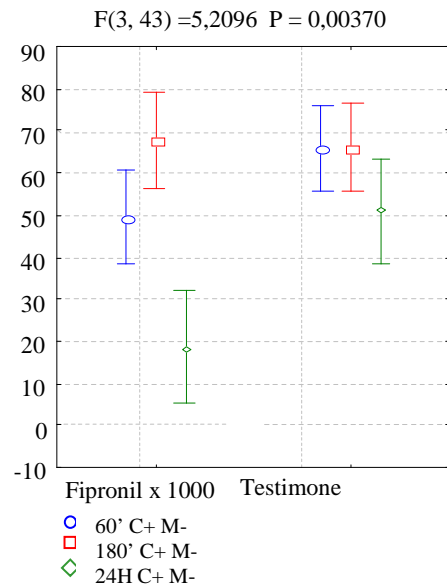
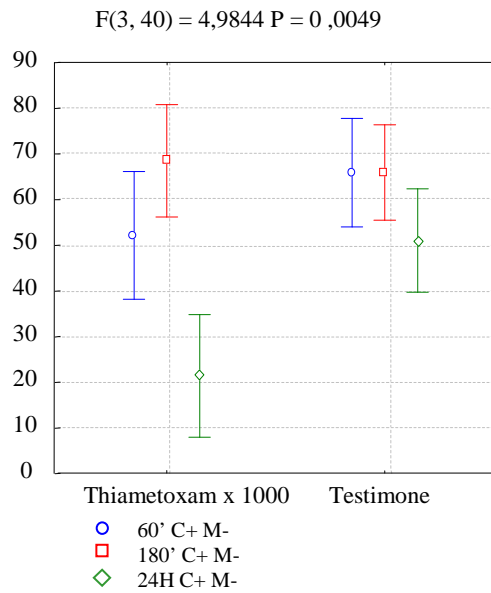
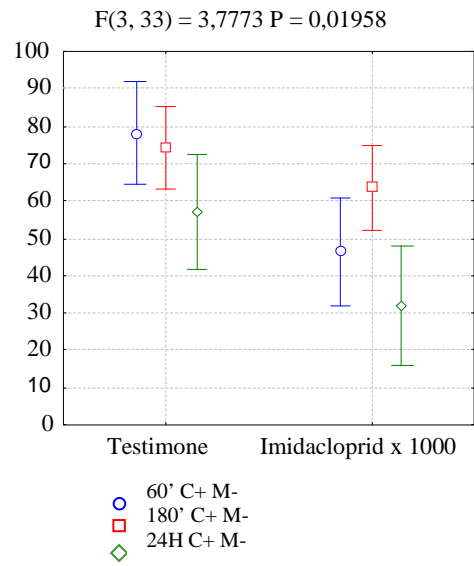
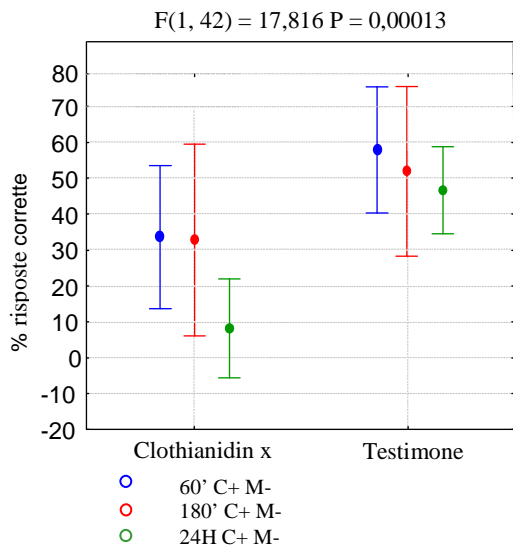
**Figura 2** - Effetti dei 4 p.a. sulla memoria olfattiva: api esposte ad una dose/ape pari a quella ricaduta in campo a 5 m dalla seminatrice senza deflettori.



**Figura 3** - Effetti dei 4 p.a. sulla memoria olfattiva: api esposte ad una dose/ape pari a 10 volte quella ricaduta in campo a 5 m dalla seminatrice senza modifiche.



**Figura 4** - Effetti dei 4 p.a. sulla memoria olfattiva: api esposte ad una dose/ape pari a 100 volte quella ricaduta in campo a 5 m dalla seminatrice senza modifiche.



**Figura 5** - Effetti dei 4 p.a. sulla memoria olfattiva: api esposte ad una dose/ape pari a 1000 volte quella ricaduta in campo a 5 m dalla seminatrice senza modifiche.

# DATI 2011



## 4. La rete di monitoraggio

Nell'ambito del Progetto APENET è stata messa a punto una rete di monitoraggio nazionale, costituita da moduli di rilevamento, almeno uno per ciascuna Regione e Provincia Autonoma, a loro volta formati da 5 apiari di 10 alveari ciascuno, disposti nelle diverse realtà territoriali di ogni Regione. Ad oggi, la consistenza della rete è di 20 moduli, 94 apiari e 940 alveari.

La funzione della rete di monitoraggio è raccogliere informazioni sullo stato di salute delle famiglie di api che compongono i moduli, attraverso periodici rilevamenti e successive analisi di laboratorio sulle diverse matrici raccolte (api morte, api vive, covata, cera, polline). Oltre alle analisi di routine, in caso di eventi anomali di mortalità è previsto che vengano effettuate visite supplementari (controlli fuori periodo) con relativa raccolta di campioni (analisi straordinarie).

Sulla base della rete di monitoraggio APENET, la mortalità invernale 2010/11 si è attestata al 22,48% (78 alveari morti/347). Attraverso la somministrazione dei questionari della rete europea Coloss si è rilevata una mortalità invernale del 13,44% (1.850 alveari/13.770).

Le analisi dirette alla ricerca di agenti di malattia si sono concentrate su *Nosema apis* e *Nosema ceranae* e sui virus.

I risultati ottenuti nel 2009 indicavano una diffusione endemica in tutte le regioni italiane del fungo (Microsporidia) *Nosema ceranae*, che ha quasi completamente sostituito la specie presente in Italia *Nosema apis*, con l'eccezione di un apiario della provincia di Bolzano, dove sono state rinvenute entrambe le specie. L'indagine realizzata e tutt'ora in corso ha consentito di confermare le prime segnalazioni, risalenti al 2007, in merito alla presenza di *N. ceranae* anche in Italia e di definirne la reale diffusione sul territorio nazionale.

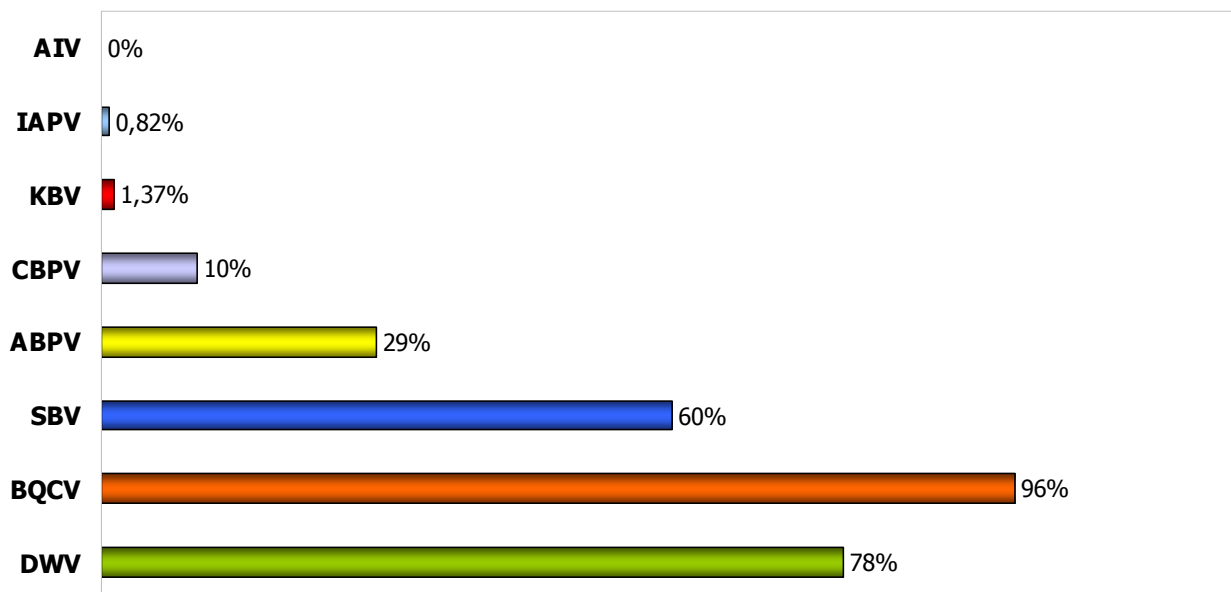
Anche nel corso del 2010 i campionamenti effettuati attraverso la rete APENET hanno confermato la presenza del solo *Nosema ceranae*. In nessun caso è stato identificato *Nosema apis*.

Per quanto riguarda i **virus**, nel 2009 era stata rilevata la presenza, singolarmente o in differenti combinazioni tra loro, del virus delle ali deformi (DWV), del virus della cella reale nera (BQCV), del virus della covata a sacco (SBV), del virus della paralisi cronica (CPV), del virus della paralisi acuta (APBV). In nessuno degli alveari sottoposti ad analisi era stata riscontrata la presenza del virus iridescente delle api (AIV), del virus Kashmir (KBV) e del virus israeliano della paralisi acuta (IAPV). Questo riscontro evidenziava come i principali virus delle api siano presenti anche in Italia, come peraltro nel resto dell'Europa. In particolare, nel nostro paese è rilevante soprattutto la presenza di DWV e di BQCV.

Nel corso del 2010, è stata rilevata la presenza dei medesimi virus delle api già rilevati nel 2009, con l'aggiunta di KBV e di IAPV, quest'ultimo stato riscontrato in tre apiari rispettivamente della Sardegna, del Lazio e della Toscana. Dei 378 campioni analizzati nel 2010, 12 sono risultati negativi, mentre la prevalenza di ciascun virus nei restanti 366 campioni inviati è del 96% per BQCV, 78% per DWV, 60% per SBV, 29% per APBV. Per i rimanenti virus, ad eccezione di AIV di cui non è mai stata rilevata la presenza, la prevalenza era al di sotto del 10%.

E' la prima volta che in Italia si realizza un'indagine su tutto il territorio nazionale diretta allo studio della presenza dei virus delle api con tecniche biomolecolari. Infatti, gli studi precedenti, che risalgono ormai a parecchi anni fa, erano stati non solo limitati ad alcune regioni, ma si basavano su metodiche di microscopia elettronica e sierologia, le uniche disponibili, in passato, per la determinazione della presenza di questi agenti di malattia.

Le conoscenze acquisite sulla distribuzione dei virus delle api appaiono decisamente interessanti e costituiscono un'ottima base di partenza per ulteriori studi.



**Figura 6** – Prevalenza dei virus trovati nei campioni della rete APENET raccolti nel 2010.

Le **analisi chimiche** eseguite su campioni di api e cera dirette al rilievo di residui di pesticidi organofosforati, organoclorurati, carbammati e neonicotinoidi hanno dato i risultati riassunti nelle Tabelle 18 e 19. Come si può notare, in entrambe le matrici sono stati rilevati con una certa frequenza residui di pesticidi. Mentre nella cera, che ricordiamo essere un buon “accumulatore”, l’incidenza è attorno al 43%, nelle api il ritrovamento di pesticidi è stato meno frequente, attestandosi attorno al 12%. E questa minor cadenza può in parte giustificare il buono stato di salute degli alveari osservati. È molto significativo che i principi attivi più ricorrenti siano legati ad acaricidi, autorizzati e non, utilizzati in apicoltura nel contenimento della varroasi. È difficile fare una valutazione sulle quantità riscontrate sia su api sia su cera relativamente alle molecole normalmente non utilizzate in apicoltura, soprattutto se osservate nell’ottica dell’incidenza di mortalità nel biennio considerato.

Per quanto concerne il polline è interessante notare (Tabella 20) come anche in questo caso vi sia una discreta presenza di campioni contenenti residui di pesticidi (circa il 27%). Rispetto ad api e cera, la presenza di principi attivi estranei all’alveare è maggiore. In particolare si può notare in alcuni campioni il riscontro di alcuni neonicotinoidi.

**Tabella 18** - Risultati delle analisi su api raccolte negli anni 2009-2010.

| Modulo     | Anno | Campioni analizzati | Campioni positivi | Principi attivi ritrovati   | Concentrazione (ng/g) |
|------------|------|---------------------|-------------------|---|-----------------------|
| Abruzzo    | 2009 | 10                  | 2                 | cumafos - fluvalinate   | 16 - 103              |
|            | 2010 | 4                   | 1                 | fluvalinate   | 183                   |
| Bolzano    | 2009 | 11                  | 3                 | bitertanolo - clotianidin   | 24 - 90               |
|            | 2010 | 3                   | 0                 |   |                       |
| Basilicata | 2009 | 16                  | 1                 | flumetrina  | 103                   |
|            | 2010 | 15                  | 0                 |   |                       |
| Calabria   | 2009 | 15                  | 0                 |   |                       |
|            | 2010 | 66                  | 7                 | clorfenvinfos – flumethrina - cumafos - fluvalinate - acrinatrina | 15 - 135              |
| Campania   | 2009 | 20                  | 7                 | cumafos - fluvalinate - rotenone - teflubenzurone                 | 10 - 55               |

|                |      |    |   |  |          |
|----------------|------|----|---|--|----------|
|                | 2010 | 20 | 1 | teflubenzuron                                    | 12       |
| Emilia Romagna | 2009 | 35 | 6 | metomil - rotenone – flumetrina                  | 10 - 452 |
|                | 2010 | 47 | 5 | dithianon – fenbuconazolo - propamocarb          | 6 - 125  |
| Liguria        | 2009 | 20 | 7 | bitertanolo - cumafos - imidacloprid             | 10 - 48  |
|                | 2010 | 23 | 0 |  |          |
| Lazio          | 2009 | 20 | 3 | rotenone -fluvalinate                            | 10 - 119 |
|                | 2010 | 17 | 2 | cumafos - procimidone - fluquinconazolo - folpet | 75 - 255 |
| Molise         | 2009 | 20 | 3 | rotenone   | 11 - 45  |
|                | 2010 | 20 | 0 |  |          |
| Marche         | 2009 | 18 | 5 | bitertanolo - rotenone                           | 18 - 119 |
|                | 2010 | 17 | 1 | cumafos  | 472      |
| Puglia         | 2009 | 20 | 5 | clorpirifos etile - rotenone                     | 10 - 121 |
|                | 2010 | 10 | 0 |  |          |
| Sicilia        | 2009 | 20 | 4 | clotianidin - fluvalinate - cumafos              | 53 - 103 |
|                | 2010 | 8  | 0 |  |          |
| Sardegna       | 2009 | 18 | 2 | imidacloprid - clotianidin - cumafos             | 16 - 65  |
|                | 2010 | 18 | 2 | fluvalinate - flumetrin                          | 15 - 22  |
| Trento         | 2009 | 16 | 1 | imidacloprid                                     | 16       |
|                | 2010 | 12 | 2 | fludioxonil                                      | 68 - 71  |
| Toscana        | 2009 | 19 | 2 | acrinatrina - imidacloprid                       | 23 - 30  |
|                | 2010 | 20 | 2 | fluvalinate                                      | 35 - 40  |
| Umbria         | 2009 | 16 | 2 | clorfenvinfos - dimetomorf                       | 82 - 150 |
|                | 2010 | 19 | 0 |  |          |
| Veneto         | 2009 | 20 | 0 |  |          |
|                | 2010 | 26 | 4 | fludioxonil – clotianidin - tebuconazolo         | 7 - 55   |

**Tabella 19** - Risultati delle analisi su cera raccolta negli anni 2009-2010.

| <b>Modulo</b>  | <b>Anno</b> | <b>Campioni analizzati</b> | <b>Campioni positivi</b> | <b>Principi attivi ritrovati</b>   | <b>Concentrazione (ng/g)</b> |
|----------------|-------------|----------------------------|--------------------------|--|------------------------------|
| Abruzzo        | 2009        | 12                         | 11                       | cumafos - fluvalinate - clorfenvinfos - bitertanolo - metamitron - acrinatrina | 11 - 568                     |
|                | 2010        | 4                          | 2                        | cumafos - fluvalinate  | 20 - 121                     |
| Bolzano        | 2009        | 10                         | 4                        | fluvalinate  | 11 - 54                      |
|                | 2010        | 3                          | 1                        | fluvalinate  | 26                           |
| Basilicata     | 2009        | 16                         | 7                        | coumafos - imidacloprid - fluvalinate - clorfenvinfos                          | 10 - 175                     |
|                | 2010        | 15                         | 4                        | fluvalinate - cumafos  | 12 - 677                     |
| Calabria       | 2009        | 15                         | 14                       | clorfenvinfos – cumafos - fluvalinate – flumetrina                             | 6 - 365                      |
|                | 2010        | 66                         | 42                       | clorfenvinfos - fluvalinate - acrinatrina - flumetrina – cyprodinil - cumafos  | 10 - 2600                    |
| Campania       | 2009        | 20                         | 8                        | clorfenvinfos - cumafos - rotenone   | 10 - 213                     |
|                | 2010        | 20                         | 6                        | flumetrina - fluvalinate - cumafos   | 10 - 84                      |
| Emilia Romagna | 2009        | 40                         | 13                       | clorfenvinfos - acrinatrina - cumafos – rotenone -fluvalinate - fludioxonil    | 12 - 709                     |
|                | 2010        | 57                         | 14                       | acrinatrina - fluvalinate – flumetrina – metalaxyl - cumafos                   | 10 - 839                     |
| Liguria        | 2009        | 20                         | 3                        | cumafos - fluvalinate  | 19 - 520                     |
|                | 2010        | 23                         | 7                        | cumafos - fluvalinate  | 14 - 124                     |
| Lazio          | 2009        | 20                         | 6                        | acrinatrina - fluvalinate  | 11 - 504                     |
|                | 2010        | 20                         | 11                       | fluvalinate - flumetrina   | 12 - 1043                    |

|          |      |    |    |  |            |
|----------|------|----|----|--|------------|
| Molise   | 2009 | 15 | 4  | cumafos - fluvalinate  | 20 - 870   |
|          | 2010 | 20 | 5  | clorfenvinfos - acrinatrina - cumafos - metalaxil                                      | 10 - 109   |
| Marche   | 2009 | 18 | 6  | clorfenvinfos - cumafos - fluvalinate  | 11 - 1428  |
|          | 2010 | 17 | 8  | cumafos - fluvalinate - propamocarb  | 12 - 12779 |
| Puglia   | 2009 | 20 | 3  | clorfenvinfos - acrinatrina - cumafos - fluvalinate                                    | 15 - 100   |
|          | 2010 | 10 | 5  | clorfenvinfos - cumafos  | 35 - 76    |
| Sicilia  | 2009 | 16 | 4  | clorfenvinfos - cumafos - fluvalinate - acrinatrina                                    | 20 - 102   |
|          | 2010 | 4  | 2  | cumafos - fluvalinate  | 8 - 3000   |
| Sardegna | 2009 | 17 | 9  | clorfenvinfos - cumafos - fluvalinate  | 10 - 559   |
|          | 2010 | 3  | 1  | flumetrina - fluvalinate - cumafos   | 10 - 183   |
| Trento   | 2009 | 16 | 6  | cumafos - fluvalinate - pirimicarb - ciprodinil  | 10 - 68    |
|          | 2010 | 15 | 4  | cumafos - fluvalinate - pirimicarb - ciprodinil - pirimetanil                          | 10 - 217   |
| Toscana  | 2009 | 19 | 7  | cumafos - fluvalinate - metalaxyl - acrinatrin   | 11 - 200   |
|          | 2010 | 20 | 6  | fluvalinate acrinathrin  | 25 - 863   |
| Umbria   | 2009 | 22 | 17 | clorfenvinfos - cumafos - imidacloprid - fluvalinate - tiametoxan - cyprodinil         | 10 - 1157  |
|          | 2010 | 27 | 10 | clorfenvinfos - cumafos - fluvalinate  | 13 - 450   |
| Veneto   | 2009 | 20 | 17 | ciprodinil - piperonil butossido - clorfenvinfos - cumafos - fluvalinate - acrinatrina | 7 - 760    |
|          | 2010 | 26 | 21 | clorfenvinfos - cumafos - fipronil - fluvalinate - acrinatrina                         | 10 - 459   |

**Tabella 20** - Risultati delle analisi su polline raccolto negli anni 2009-2010.

| Modulo         | Anno | Campioni analizzati | Campioni positivi | Principi attivi ritrovati  | Concentrazione (ng/g) |
|----------------|------|---------------------|-------------------|--|-----------------------|
| Abruzzo        | 2009 | 12                  | 6                 | clorfenvinfos - cumafos - kresoxim metil - acrinatrina - cumafos - fludioxonil - fluvalinate   | 17 - 431              |
|                | 2010 | 4                   | 4                 | fluvalinate - cumafos  | 20 - 288              |
| Bolzano        | 2009 | 6                   | 1                 | ciprodinil   | 8                     |
|                | 2010 | 3                   | 2                 | fluvalinate - cumafos - imidacloprid   | 99 - 363              |
| Basilicata     | 2009 | 6                   | 0                 |  |                       |
|                | 2010 | 9                   | 3                 | fluvalinate - cumafos - tiametoxam   | 16 - 1619             |
| Calabria       | 2009 | 15                  | 6                 | fluvalinate - cumafos - flumetrina   | 23 - 476              |
|                | 2010 | 55                  | 18                | rotenone - flumetrina - dimetoato - fluvalinate - cumafos - fludioxonil - clotianidin - acrinatrina - clorfenvinfos - flumetrina - dimetoato - fenpiroximate | 12 - 1560             |
| Campania       | 2009 | 5                   | 2                 | cyprodinil - fludioxonil - dimetoato   | 7 - 25                |
|                | 2010 | 20                  | 4                 | dimetoato - cumafos - metalaxil  | 9 - 50                |
| Emilia Romagna | 2009 | 2                   | 0                 |  |                       |
|                | 2010 | 25                  | 5                 | cumafos - fludioxonil - fluvalinate  | 44 - 295              |
| Liguria        | 2009 | 18                  | 9                 | fluvalinate - cumafos  | 45 - 1508             |
|                | 2010 | 23                  | 3                 | fluvalinate  | 47 - 367              |
| Lazio          | 2009 | 20                  | 7                 | fluvalinate - rotenone - propamocarb - pirimetanil   | 18 - 393              |
|                | 2010 | 16                  | 7                 | propamocarb - fluvalinate  | 58 - 2328             |
| Molise         | 2009 | 12                  | 2                 | propamocarb - cumafos  | 68 - 193              |
|                | 2010 | 20                  | 5                 | oxamil - propamocarb - fluvalinate   | 38 - 153              |
| Marche         | 2009 | 17                  | 8                 | propamocarb - pirimicarb - cumafos   | 10 - 5616             |

|          |      |    |   |  |           |
|----------|------|----|---|--|-----------|
|          | 2010 | 15 | 5 | cumafos - propamocarb  | 22 - 1712 |
| Puglia   | 2009 | 14 | 0 |  |           |
|          | 2010 | 10 | 0 |  |           |
| Sicilia  | 2009 | 7  | 1 | acrinatrina  | 325       |
|          | 2010 | 5  | 1 | fluvalinate  | 67        |
| Sardegna | 2009 | 17 | 2 | imidacloprid - metamidron  | 9 - 14    |
|          | 2010 | 18 | 2 | imidacloprid - fluvalinate   | 20 - 55   |
| Trento   | 2009 | 6  | 0 |  |           |
|          | 2010 | 11 | 6 | pirimetanil - tiametoxam - dimetomorf -<br>pirimicarb - flumetrina | 14 - 584  |
| Toscana  | 2009 | 18 | 4 | clorfenvinfos - fluvalinate - acrinatrina                          | 73 - 215  |
|          | 2010 | 20 | 7 | fluvalinate - acrinatrina - tiofanate metil                        | 76 - 302  |
| Umbria   | 2009 | 22 | 3 | benalaxil - fludioxonil - metalaxil                                | 10 - 44   |
|          | 2010 | 27 | 5 | clorfenvinfos - dimetoato - propamocarb -<br>fenamidone            | 8 - 1335  |
| Veneto   | 2009 | 0  | 0 |  |           |
|          | 2010 | 8  | 3 | kresoxim metil - tebuconazolo - cumafos -<br>fluvalinate           | 84 - 167  |

#### 4.1 Il sistema delle segnalazioni

Un importante strumento a supporto del monitoraggio è quello costituito dalle segnalazioni, che permettono di rilevare eventi anomali in alveari che non fanno parte della rete. Il sistema delle segnalazioni prevede che l'apicoltore riporti al Servizio Veterinario dell'ASL competente per territorio l'episodio di mortalità e che lo stesso proceda al necessario sopralluogo, alla raccolta di campioni, alla loro adeguata conservazione (-20°C) e all'invio al laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per le analisi del caso, in collaborazione anche con la rete APENET.

Nella primavera 2008, tutte le 185 segnalazioni sono avvenute in concomitanza con la semina del mais e dei 132 campioni raccolti e analizzati, il 57,5% è risultato positivo ai neonicotinoidi usati per la concia delle sementi di mais.

Nel 2009 sono state registrate tre segnalazioni, di cui due ufficiali pervenute al Servizio Veterinario durante il periodo della semina del mais, ed una terza non ufficiale giunta direttamente al CRA-API: tutte e tre sono risultate connesse all'utilizzo non autorizzato di sementi di mais conciato.

Relativamente alla primavera 2010, le segnalazioni non hanno riguardato aree maidicole (Tabella 21). Si sottolinea, inoltre, che in 16 dei 21 casi segnalati è stato coinvolto il Servizio Veterinario dell'ASL di competenza.

Analogamente, nella primavera 2011 nessuna segnalazione ha riguardato aree maidicole e delle 16 segnalazioni pervenute entro il giugno 2011, 14 erano ufficiali.

Da maggio fino a settembre 2011 sono pervenute alle tre strutture facenti parte del progetto APENET (CRA-API, IZS-Ve e DiSTA-UNIBO) ulteriori comunicazioni di morie di api da varie parti della Penisola; i dettagli di ciascuna segnalazione sono riportati in Tabella 22.

**Si precisa che il progetto APENET ed il relativo sistema delle segnalazioni è terminato alla fine di marzo 2011 e le segnalazioni riportate derivano da una attività svolta su base volontaria.**

**Tabella 21** - Numero di segnalazioni pervenute ai servizi veterinari nelle primavere 2008, 2009, 2010 e 2011 in aree maidicole e non (Fonte IZS delle Venezie).

| Regione               | N. di segnalazioni in aree maidicole |                | Altre segnalazioni durante la primavera 2009 | Primavera 2010 |                    | Primavera 2011 |                    |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------|--|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
|                       | Primavera 2008                       | Primavera 2009 |  | Aree maidicole | Altre segnalazioni | Aree maidicole | Altre segnalazioni |
| Lombardia             | 40                                   | 1              |  | -              | nd                 | -              | -                  |
| Piemonte              | 8                                    |                | 2  | -              | nd                 | -              | 1*                 |
| Emilia-Romagna        | 7                                    | 1 + 1*         |  | -              | 2** + 3*           | -              | 2+1*               |
| Veneto e Trentino     | 20                                   |                | 3  | -              | 8***               | -              | 9                  |
| Bolzano               |                                      |                |  | -              | 2                  | -              | 1                  |
| Friuli Venezia Giulia | 110                                  |                | 1  | -              | 1                  | -              | 1                  |
| Abruzzo               |                                      |                |  |                |                    | -              | 1                  |
| Calabria              | 0                                    |                | 1  | -              | 1 + 2*             | -              | -                  |
| Basilicata            |                                      |                |  | -              | 1                  | -              | -                  |
| Sardegna              |                                      |                |  |                | 1                  | -              | -                  |
| <b>TOTALE</b>         | <b>185</b>                           | <b>2 + 1*</b>  | <b>7</b>                                     | <b>0</b>       | <b>16 + 5*</b>     | <b>0</b>       | <b>16</b>          |

\* segnalazioni non ufficiali

\*\* Una delle segnalazioni riguarda una postazione della rete APENET

\*\*\* In due casi si è rilevata la presenza di:

1. Api: thiametoxan, penconazolo
2. Foglie: acetamiprid, iprodione, tebuconazolo; api: acetamiprid

Le analisi degli altri campioni sono in corso.

nd = a seguito di contatti diretti (2/7/10) con l'IZSPLV (Asti) e IZSLER (Brescia) non risultano comunicazioni ufficiali di morie.

**Tabella 22** – Ulteriori segnalazioni pervenute al progetto APENET dopo il mese di marzo 2011.

| <b>Data<br/>(o periodo)</b>       | <b>Zona<br/>(Provincia)</b> | <b>N° alveari colpiti/<br/>totale alveari<br/>apiario</b>            | <b>Probabile causa indicata dall'apicoltore</b>  | <b>Intervento del Servizio Veterinario ASL, analisi,<br/>ecc.</b>  |
|-----------------------------------|-----------------------------|--|--|--|
| Primi di maggio                   | Lecce                       | 100/100<br>(in 2 apiari)   | Trattamenti aficidi su agrumi e angurie  | Si (ASL Lecce), analisi in corso   |
| 15 giugno                         | Bologna                     | 19/19  | Avvelenamento da agrofarmaci   | Si (IZS-LER), esito negativo   |
| 30 giugno                         | Bologna                     | 18/18  | Avvelenamento da agrofarmaci   | No, analisi in corso presso CRA-API  |
| 5 luglio                          | Cremona                     | 20/20  | Trattamenti contro gli adulti di Diabrotica effettuati in fioritura del mais   | Si (ASL Cremona), analisi in corso   |
| 14 luglio                         | Cremona                     | 22/22  | Trattamenti contro gli adulti di Diabrotica effettuati in fioritura del mais   | Si (ASL Cremona), analisi in corso   |
| 20 luglio                         | Bologna                     | 24/24  | Avvelenamento da agrofarmaci   | No, nessun campionamento   |
| 15 agosto                         | Cremona                     | 20   | Nessuna  | Si (ASL Cremona), analisi in corso   |
| 8 agosto                          | Grosseto                    | 48/48  | Mortalità dovuta ai trattamenti contro la mosca dell'olivo   | Si, analisi in corso presso IZS-LT   |
| Fine agosto –<br>inizio settembre | Lecce                       | 145/175<br>(in 2 apiari)   | Mortalità dovuta ai trattamenti contro la tignola dell'uva   | No, analisi in corso presso CRA-API  |
| Seconda metà<br>di settembre      | Catania                     | 180/200<br>Nella zona il 90% di<br>alveari colpiti su<br>circa 3500) | Trattamento con fosfororganici (clorpirifos, fosmet, piriproxifen) contro <i>Protopulvinaria piryformis</i> in presenza di melata (eseguito in accordo con i disciplinari) | No intervento Servizio Veterinario nonostante numerosi solleciti; analisi in corso presso il CRA-API; intervento di Servizio fitosanitario e Università di Catania |

## **5. Determinazione del minimo livello di concentrazione di polveri emesse dalle seminatrici modificate durante la semina di mais conciato tecnicamente ottenibile con interventi sulle seminatrici ed effetti sulle api.**

### **PARTE A: Prove statiche per la messa a punto di una metodologia di valutazione dell'efficienza di dispositivi di abbattimento delle polveri da abrasione e verifiche sperimentali di un prototipo di dispositivo di abbattimento realizzato dal CRA-ING**

#### **5.1 Introduzione**

La proroga della sospensione di neonicotinoidi e fipronil utilizzati per la concia delle sementi di mais, decretata con DM 16 settembre 2010, è stata disposta, per citare le parole del Ministro Galan, “allo scopo di salvaguardare il patrimonio apistico nazionale e la sicurezza per gli operatori”.

Nel Decreto di proroga si riporta inoltre che “lo studio (effettuato nell’ambito del progetto APENET) degli effetti sub-letali delle sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil sulle api, in particolare per quanto concerne l'apprendimento, la memoria olfattiva e l'orientamento spaziale delle api ha evidenziato gli effetti negativi sulle api già a basse concentrazioni di principi attivi contenute nelle polveri rilasciate dalle macchine durante la semina”.

Il Decreto di proroga riporta la richiesta del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, al Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (CRA), “di potenziare l'attività volta alla messa a punto di nuovi e più efficaci prototipi di deflettore da utilizzare nelle macchine seminatrici”

Nel progetto INTRAC, di cui il MiPAAF ha recentemente decretato il finanziamento, l’U.O. CRA-ING di Monterotondo si propone fra l’altro, lo studio e sviluppo di dispositivi per la riduzione della dispersione delle polveri da abrasione da seme conciato, mediante interventi sulle seminatrici di precisione per la semina del mais. Sebbene tale studio sia finalizzato a ridurre il rischio derivante dall’esposizione dell’operatore ad agenti chimici, le concentrazioni di principio attivo emesse dalle macchine seminatrici in seguito agli interventi previsti dal progetto INTRAC trovano utilizzo come base di partenza per la valutazione del rischio sulle api in sede APENET.

Gli obiettivi e la tempistica proposta per i due progetti, relativamente alla linea di ricerca sul mais conciato, e le azioni necessarie al loro ottenimento prevedevano:

1. Determinazione del minimo livello di concentrazione di polveri emesse dalle seminatrici modificate durante la semina di mais conciato tecnicamente ottenibile con interventi sulle seminatrici.
2. Valutazione degli effetti sub-letali sulle api delle concentrazioni di cui al punto 1 in prove condotte da CRA-API di Bologna e Università di Bologna.

#### **5.2 Attività effettuata**

- Ottimizzazione del sistema per la prova a punto fisso già allestito nel 2010 (vento artificiale, semina simulata) per la quantificazione della polvere dispersa con e senza le citate modifiche.
- Messa a punto di due prototipi di modifiche applicabili alle seminatrici per il contenimento della quantità di polveri dispersa in ambiente.
- Esecuzione delle analisi ed elaborazione dati per la valutazione dell’efficacia delle modifiche e per la stima delle deposizioni teoricamente ottenibili in una semina reale nelle stesse condizioni di vento.
- Comunicazione dei livelli di concentrazione ai colleghi incaricati delle prove sulle api.



## 5.3 Materiali

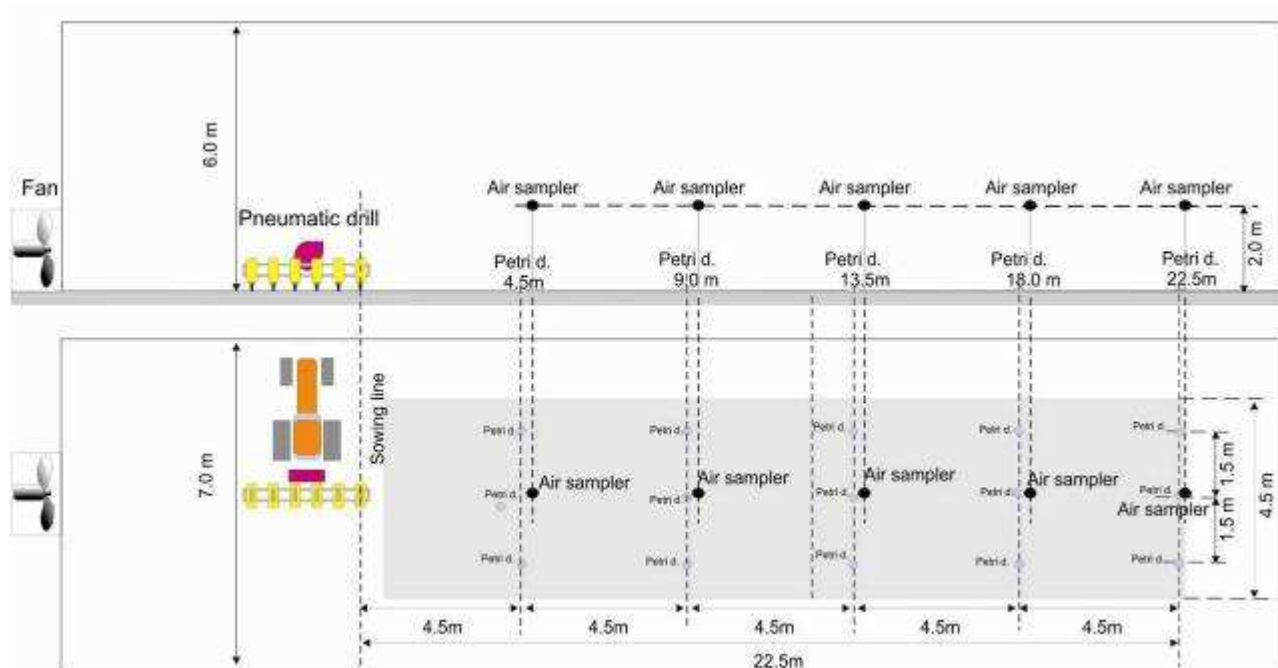
### 5.3.1 Sistema di prova a punto fisso

Le prime esperienze su seminatrici a punto fisso sono state condotte al CRA-ING dall'inizio del 2008, nella convinzione che da esse si possano trarre migliori informazioni relativamente al comportamento delle stesse in relazione al problema oggetto di studio. Lo sviluppo di un sistema per la prova a punto fisso e la valutazione di macchine e dispositivi finalizzati all'abbattimento della quantità di polveri da abrasione disperse costituisce parte dell'attività prevista nella scheda di ricerca del progetto APENET di cui CRA-ING è responsabile.

Obiettivo principale era la realizzazione di un sistema in grado di determinare condizioni di prova controllabili e ripetibili per l'osservazione del comportamento delle seminatrici pneumatiche equipaggiate o meno con modifiche atte all'abbattimento delle quantità di polveri da abrasione disperse in ambiente. Tale sistema di prova ha le seguenti finalità:

- determinazione delle concentrazioni dei diversi principi attivi a terra e nell'aria a varie distanze dalla seminatrice provata sia in condizioni standard che con eventuali modifiche;
- confronto obiettivo fra diverse macchine, diverse modifiche ecc., premessa per un ipotetico sistema di certificazione delle stesse.

La zona nella quale la prova è stata effettuata doveva essere necessariamente protetta. Essa è schematizzata nella Figura 7 ed è stata ricavata in un ampio e lungo portico della struttura del CRA-ING avendo cura di chiudere il lato esterno con dei teli.



**Figura 7** – Schema dell'organizzazione delle prove a punto fisso. Le piastre Petri e i campionatori d'aria sono stati posti, rispetto al lato destro della seminatrice, su 5 distanze multiple della larghezza di semina (4,5 m, 9 m, 13,5 m, 18 m, 22,5 m) su tre file distanti fra loro 1,5 m. Il vento artificiale era creato tramite un ventilatore industriale azionato da un motore elettrico. Il regime di rotazione regolato da un inverter su 1358 rpm è stato adottato per tutte le prove allo scopo di avere condizioni di vento costante.

Lo schema di campionamento a terra ricalca quello proposto nelle prove condotte in campo sia in ambito APENET (attività 2009), sia da Syngenta e Bayer (quest'ultima fa riferimento al documento: *BBA Drift Guideline, Part VII, 2-1.1, 1992, "Measuring direct drift when applying liquid plant protection products outdoors"*). Al suddetto schema sono stati apportati alcuni

adattamenti riferiti alle condizioni controllate. Esso prevede il posizionamento di una serie di tre piastre Petri, con una soluzione di acetonitrile e acqua, per ogni distanza (rilievo della concentrazione di p.a. a terra nella zona sottovento alla seminatrice). Vicino alle piastre Petri, lungo la striscia centrale è stata anche utilizzata una serie di tre campionatori d'aria per rilevare le concentrazioni di p.a. nell'aria (ppb) a varie distanze. I dettagli sono riportati in Figura 7.

Le distanze di campionamento adottate per le piastre Petri sono multipli della larghezza di lavoro della seminatrice. Questa scelta ha lo scopo di semplificare l'elaborazione dei dati secondo uno schema di calcolo che fornisce una stima dell'andamento della concentrazione di p.a. che si otterrebbe in campo in condizioni (velocità di lavoro, velocità e direzione del vento) corrispondenti a quelle della simulazione a punto fisso.

*Utilizzo dei campionatori d'aria* - Essi devono dare indicazioni sulla diffusione nell'aria delle polveri soggette a deriva. Non esiste una metodologia di riferimento specifica per applicazioni in campo agricolo poiché questo genere di rilievi è finalizzato alla valutazione della qualità dell'aria in ambienti di lavoro generalmente di tipo industriale. L'altezza da terra di 1,7 m, adottata nelle prove di campo del 2009 per il posizionamento delle capsule con i filtri, derivava dalle indicazioni della norma *UNI CEN TR 15547:2007* e corrisponde a quella media di un operatore che respira in tale ambiente; essa è stata mantenuta nel caso delle prove di campo. Per una maggiore corrispondenza con le condizioni di volo delle api l'altezza di campionamento è stata portata a 2 m. Per il filtraggio dell'aria sono stati utilizzati dischetti filtro in PTFE Millipore da a 0,2  $\mu\text{m}$ , con diametro di 47 mm. Il campionamento è stato effettuato impostando i cinque strumenti su una portata d'aria di 15 L/min.

L'azionamento della seminatrice è stato svincolato dal trattore e realizzato integralmente tramite motori elettrici (Figura 8) che consentono la regolazione fine della velocità di rotazione della ruota motrice (= velocità di avanzamento virtuale) e del valore di depressione all'interno del sistema pneumatico della seminatrice.



**Figura 8** – Sinistra: motore elettrico e inverter per azionare la ruota motrice; Destra: motore elettrico ed inverter per azionare il depressore.

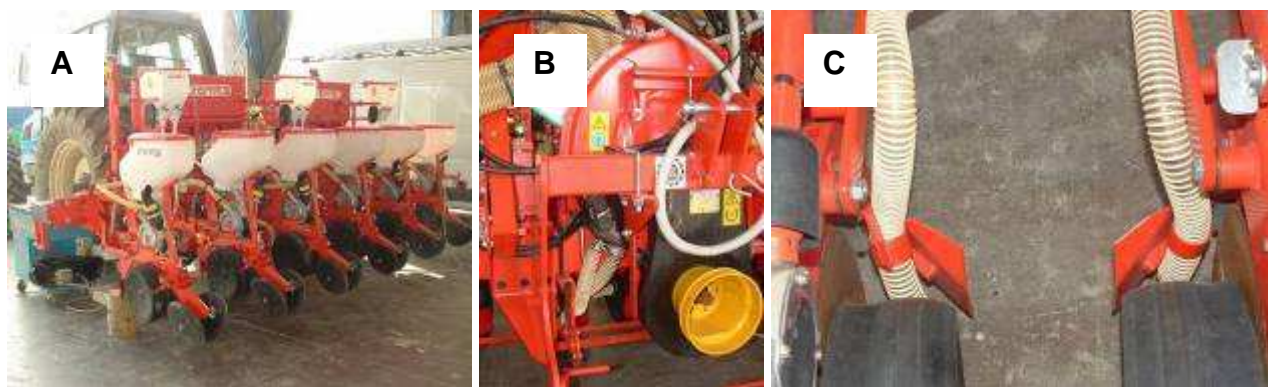
### ***5.3.2 Seminatrice utilizzata nelle prove***

E' stata utilizzata la stessa seminatrice di precisione pneumatica a sei file (sesto di semina: 0,75 m x 0,18 m, 75000 semi/ha) Gaspardo Magica (Figura 9-A) già provata nelle prove 2010. Il costruttore aveva fornito la macchina equipaggiata con un sistema di 4 tubi deflettori che, a due a due, convogliano l'aria espulsa dal ventilatore posteriormente ai due assolcatori centrali (Figura 9-B e C). Qui la polvere, schermata dai due versoi degli assolcatori, viene indirizzata nel solco e parzialmente ricoperta dal terreno dopo il passaggio.

Prima della consegna al CRA-ING (marzo 2010), la macchina, in tale configurazione, era stata sottoposta a prove presso lo Julius Kuhn Institut di Braunschweig (Germania) (metodo JKI) in seguito alle quali era stato certificato che la seminatrice con i deflettori determinava un abbattimento dell'emissione di una polvere tracciante (brilliant-sulfoflavina) di almeno il 90% rispetto alla quantità dispersa da una seminatrice MONOSEM, che nel suddetto metodo JKI costituisce la macchina di riferimento rispetto alla quale si calcola la dispersione di tutte le altre seminatrici.

A questo proposito si ricorda brevemente che nelle prove APENET effettuate a punto fisso e in campo nel 2010, l'abbattimento dovuto ai deflettori rispetto alla stessa seminatrice senza deflettori era risultato mediamente del 50%, variando dal 30% al 70% a seconda del principio attivo considerato. Inoltre, i valori delle concentrazioni dei p.a. rilevate a terra con la "seminatrice con deflettori" nelle prove di semina in campo sono stati utilizzati dalle U.O. di Bologna in una serie di prove condotte sulle api, a carico delle quali si sono evidenziati effetti sub-letali.

Da ciò si può concludere che il livello di abbattimento del 90% certificato con il suddetto metodo JKI non è in grado di garantire livelli di emissioni di polveri senza effetti sulle api.



**Figura 9** – A) seminatrice utilizzata nelle prove; B) particolare del ventilatore con bocchetta rivolta verso il basso sulla quale è applicata la modifica della quale sono visibili due dei quattro tubi deflettori; C) due dei quattro tubi deflettori che terminano dietro gli assolcatori.

In seguito ai risultati del 2010, è stata avviata un'attività finalizzata ad incrementare l'efficienza di abbattimento della quantità di polveri disperse dalle seminatrici. Allo scopo sono stati realizzati due prototipi che sono stati applicati alla seminatrice Gaspardo Magica e sottoposti a prove nel sistema a punto fisso di cui al punto 5.3.1. La descrizione dei prototipi e i risultati delle prove sono riportati più avanti.

### **5.3.3 Seme**

Per le prove è stato utilizzato seme di mais ibrido "Lolita" fornito da Pioneer Hi-Breed (peso di 1000 semi: 340g). Il seme è stato consegnato al CRA-ING nel periodo 03-30 marzo 2011, determinando un sensibile ritardo nell'esecuzione dell'attività di prova. Una parte di questa è stata effettuata nel periodo precedente utilizzando seme conciato con imidacloprid in confezioni integre e perfettamente conservate, residue delle prove del 2010.

Tale scelta è derivata dal fatto che, all'inizio delle prove del 2010, sono state effettuate delle verifiche della polverosità del seme del 2009 (sempre in confezioni integre e perfettamente conservate): il test di Heubach non aveva mostrato incrementi della polverosità sullo stesso seme a un anno di distanza. Tale prova è citata nella relazione del 2010. In base a ciò, per guadagnare tempo in attesa del seme nuovo, si è deciso di utilizzare limitatamente all'imidacloprid, il seme dell'anno precedente (2010).

Nel 2011 il seme non è stato sottoposto al test di Heubach come nei due anni precedenti; dal momento che l'ibrido utilizzato e il trattamento conciante erano gli stessi del 2010, sono stati ritenuti validi i valori di polverosità rilevati in quell'anno e riportati in Tabella 23.

**Tabella 23** - Polverosità del seme conciato con i 4 p.a., misurata con il cilindro di Heubach.

| Conciante                       | Dati produttori                     |                     | Dati rilevati CRA-ING               |                          |                      |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------|
|                                 | Polvere fine (filtro Heubach) (g/q) | Dose p.a. (mg/seme) | Polvere fine (filtro Heubach) (g/q) | Polvere grossolana (g/q) | Polvere totale (g/q) |
| Gaicho (imidacloprid) + celest  | <b>1,100</b>                        | 1,000               | <b>0,875</b>                        | 10,83                    | 11,71                |
| Poncho (clothianidin) + celest  | <b>2,430</b>                        | 1,250               | <b>1,833</b>                        | 19,16                    | 20,99                |
| Cruiser (thiamethoxam) + celest | <b>1,200</b>                        | 0,600               | <b>0,950</b>                        | 5,00                     | 5,95                 |
| Regent (fipronil) + celest      | <b>1,780</b>                        | 0,500               | <b>0,723</b>                        | 9,08                     | 9,81                 |

#### **5.3.4 Prototipi di modifica messi a punto dal CRA-ING**

Il CRA-ING ha sviluppato due soluzioni aventi lo scopo di aumentare la capacità di abbattimento legata ai deflettori del tipo descritto nelle prove 2009 e 2010. Una soluzione è volta ad un impiego su seminatrici usate attraverso interventi limitati. La seconda è invece idonea ad essere applicata su seminatrici nuove da parte dei costruttori. Sono descritte rispettivamente nelle Figure 10 e 11.

Il principio è basato sul tentativo di mantenere quanto più possibile all'interno della seminatrice le polveri con i principi attivi attraverso un sistema di ricircolo dell'aria. Onde evitare però che il ricircolo di aria, attraverso modifiche della depressione creata dal ventilatore centrifugo, possa influenzare la precisione di semina della macchina, il sistema è stato dotato di aperture che, mediante opportuni filtri, consentono la fuoriuscita dell'aria in eccesso, trattenendo la polvere e i principi attivi in essa contenuti.

Il **prototipo 1** del CRA-ING (Figura 10) utilizza i comuni deflettori per ricircolare l'aria direttamente nelle tramogge del seme. I coperchi delle tramogge interessate sono a chiusura ermetica e dotati superiormente di un'apertura che consente la fuoriuscita dell'aria in eccesso (foto a destra). Tale apertura è dotata di un filtro che ha lo scopo di trattenere le polveri. Il filtro impiegato in questa versione è un filtro per l'aria di tipo automobilistico. Un prototipo analogo è stato applicato alla seminatrice Gaspardo Magica, adattandolo al tipo di deflettori montato su di essa. Su tale versione è stato applicato un filtro antipolline a carboni attivi per abitacoli di autovetture.

Il **prototipo 2** (Figura 11) è stato concepito per ottimizzare l'applicazione del primo, in prospettiva di un impiego su seminatrici nuove da parte dei costruttori in seguito ad uno studio di ingegnerizzazione. L'aria che esce dai deflettori viene convogliata dentro un tubo collettore e da questo viene rimandata in tutte le tramogge attraverso coperchi a chiusura ermetica. In questo caso l'eccesso d'aria fuoriesce dalla faccia inferiore della scatola grigia posizionata fra due elementi di semina, dopo aver attraversato un filtro interno che trattiene le polveri. Il sistema funge da "impattore", rallentando la velocità dell'aria e favorendo la deposizione della polvere all'interno del circuito. L'aria subisce un leggero riscaldamento (4-5°C), mentre il valore di depressione viene raggiunto con una velocità di rotazione del motore inferiore di circa 20 giri/min rispetto alla condizione standard, contribuendo ad un leggero risparmio energetico. Il filtro in questo caso è un filtro antipolline a carboni attivi per abitacoli di autovetture.

Il singolo grande collettore dell'aria svolge anche la funzione di uniformare la pressione dell'aria ricircolata, onde evitare effetti negativi sulla uniformità di semina. La configurazione visibile nelle

foto è solo provvisoria e finalizzata alle prove a punto fisso; per l'impiego in campo i diversi elementi saranno ricollocati, mantenendo la stessa funzionalità.



**Figura 10** – Prototipo 1 del CRA-ING applicato alla seminatrice Maternacc impiegata nelle prove APENET 2009. Un prototipo analogo è stato applicato alla seminatrice Gaspardo Magica, adattandolo al tipo di deflettori montato su di essa. Il prototipo in figura è stato concepito come possibile soluzione applicabile a seminatrici usate con interventi contenuti.



**Figura 11** – Prototipo 2 del CRA-ING applicato alla seminatrice Gaspardo Magica descritta al punto 5.3.4. Il filtro qui impiegato è un filtro per uso automobilistico (filtro antipolline a carboni attivi per abitacolo). Questa soluzione è idonea ad essere applicata su seminatrici nuove da parte del costruttore

## 5.4 Metodi

### *5.4.1 Valutazione dell'efficacia del materiale filtrante e caratterizzazione fisica delle polveri da abrasione*

Tale parte dell'attività si è svolta nei mesi di marzo e aprile 2011 ed ha riguardato unicamente imidacloprid poiché si disponeva solo di seme conciato con questo p.a. L'attività è stata svolta in collaborazione con l'Istituto per l'Inquinamento Ambientale (IIA) del CNR di Montelibretti (RM), che è in possesso di specifiche competenze circa le modalità di campionamento delle polveri.

Al punto 5.3.4 sono indicate le due tipologie di filtro adottate nelle modifiche messe a punto al CRA-ING. Il filtro antipolline a carboni attivi utilizzato nei test più recenti in quanto supposto più efficiente, è stato sottoposto a specifiche prove per valutarne la capacità a trattenere le polveri da abrasione e i principi attivi contenuti. Tale valutazione è stata effettuata tramite campionamenti dell'aria in uscita dal sistema pneumatico della seminatrice con e senza il dispositivo filtrante, nel

corso, anche in questo caso, di semine simulate a punto fisso. I campionamenti hanno riguardato le seguenti condizioni (Figura 12):

1. macchina senza modifica – tutta l’aria espulsa da due dei quattro deflettori presenti sulla macchina, senza alcun filtraggio, era convogliata in un unico tubo in PVC con diametro di 118 mm nel quale avveniva il campionamento (Figura 12.A);
2. tutta l’aria espulsa da due dei quattro deflettori presenti sulla macchina era convogliata nella scatola grigia porta filtro del prototipo per essere filtrata, quindi in un tubo analogo al precedente per il campionamento (Figura 12.B). Il confronto dei risultati di questa condizione con la precedente ha consentito di valutare l’efficienza del filtro.
3. Il prototipo era montato normalmente sulla seminatrice e tutta l’aria uscente dalla scatola porta filtro era convogliata in un tubo come sopra descritto per il campionamento. (Figura 12.C) Il confronto dei risultati di questa condizione con quella di cui al punto 1 ha consentito di valutare l’efficienza complessiva della modifica stessa (filtro e sistema di tubi).



**Figura 12** – A) Campionamento aria in uscita senza filtraggio; B) campionamento dell’aria che passa direttamente dentro il filtro; C) campionamento dell’aria che esce con la modifica normalmente applicata.

Tali modalità sono state necessarie per fare in modo che la velocità dell’aria all’interno dei tubi finali, la portata di campionamento e il volume di aria trattato fossero sempre quanto più possibile costanti per garantire l’isocinetismo (Tabella 24). Il campionamento nelle tre condizioni descritte è stato effettuato tramite un campionatore d’aria isocinetico che aspirava aria attraverso un particolare porta-filtro inserito nel tubo finale. In tale porta-filtro erano inseriti dei dischetti filtro PTFE Millipore da a 0,2  $\mu\text{m}$ .

**Tabella 24** – Condizioni di prova dell’efficienza filtrante.

| Cond. | Condizione di campionamento                                       | Velocità aria (m/s) | Portata aria (l/s) | Portata aria ( $\text{m}^3/\text{min}$ ) | Volume totale ( $\text{m}^3$ ) |
|-------|---|---------------------|--------------------|--|--------------------------------|
| 1     | aria diretta da due deflettori, senza filtro antipolline (F.A.P.) | 3,09                | 33,79              | 2,03                                     | 22,30                          |
| 2     | aria diretta da due deflettori, con F.A.P.                        | 3,60                | 39,37              | 2,36                                     | 25,98                          |
| 3     | aria con modifica completa, quattro deflettori, con F.A.P.        | 3,10                | 33,90              | 2,03                                     | 22,37                          |

I filtri con i campioni di polvere trattenuta sono stati sottoposti ad analisi gravimetrica per determinarne la massa nelle diverse condizioni. Successivamente sono stati inviati all’analisi chimica per determinare le quantità di imidacloprid presente.

Prove analoghe sono state avviate per ottenere la caratterizzazione dimensionale della polvere da abrasione tramite l’impiego di due strumenti dell’IIA – CNR:

- un rilevatore laser di particelle in grado di effettuare la conta delle particelle secondo classi dimensionali impostabili (fino ad un massimo di 13 classi);
- un impattometro, dispositivo basato sullo stesso principio del campionatore d’aria ma in grado di effettuare un campionamento su 12 stadi corrispondenti ad altrettante classi dimensionali.

Lo scopo di tali determinazioni era quello di studiare il destino delle diverse frazioni di polvere d'abrasione, con particolare riferimento a quelle più sottili, in relazione alla deriva cui sono soggette in condizioni di campo.

#### ***5.4.2 Osservazioni sulla deriva delle polveri***

La valutazione dell'abbattimento della quantità di polvere soggetta a deriva dovuta ai prototipi descritti al punto 5.3.4 è stata effettuata per confronto con la stessa seminatrice convenzionale (senza alcun dispositivo). Le prove sono state effettuate in ambiente controllato secondo lo schema descritto al punto 5.3.1 osservando le deposizioni a terra e le concentrazioni nell'aria.

Riguardo al posizionamento della seminatrice, essa è stata sollevata da terra per consentire la rotazione della ruota motrice alla velocità di 6 km/h. Per ogni condizione di prova sono state effettuate tre ripetizioni. La quantità di seme distribuita è stata di due dosi (50.000 semi) per ogni ripetizione, corrispondenti a 6666,67 m<sup>2</sup>. Il campionamento aveva inizio all'avvio della semina e proseguiva, dopo la fine della semina, per altri 10 minuti per consentire la dispersione/deposizione della polvere presente nell'aria (nelle prove di campo tale intervallo di tempo aggiuntivo era di 15 minuti). Dopo ciascuna ripetizione la zona di prova veniva accuratamente ripulita dai residui di polvere e principi attivi mediante aspirazione.

#### ***5.4.3 Trattamento e analisi dei campioni***

Con riferimento alle piastre Petri, i campioni sono stati trattati secondo le indicazioni fornite dall'industria all'inizio del progetto APENET. Le soluzioni di acetonitrile contenenti le polveri depositate dopo la prova di semina, sono state conservate in congelatore e al riparo dalla luce. Le analisi dei campioni sono state effettuate presso il CRA-PAV di Roma secondo il metodo HPLC MS/MS, applicando le metodologie messe a punto dalle società produttrici per imidacloprid e gli altri principi attivi e presentate al momento della registrazione del prodotto. Metodo analogo è stato adottato per l'analisi dei filtri dei campionatori d'aria.

#### ***5.4.4. Elaborazione dei risultati delle analisi***

Prima di ogni altra considerazione si deve dire che i risultati delle analisi forniscono dati relativi ad una superficie teorica seminata di due terzi di ettaro, concentrati su una zona di campionamento larga 4,5 m e lunga 22,5 m. Le quantità attese di principio attivo sono quindi molto elevate e questo costituisce uno dei motivi per i quali in queste prove non sono state previste osservazioni sulle api, in quanto non riferibili a condizioni reali di esposizione. Con riferimento alle piastre Petri, i risultati delle analisi hanno fornito la quantità di p.a. contenuta in ciascuna piastra (µg/piastra). In primo luogo, tale quantità è stata riferita all'unità di superficie (µg/m<sup>2</sup>). Sulle base delle medie ottenute per ogni distanza di campionamento sono state tracciate le curve che mostrano l'andamento della concentrazione all'aumentare della distanza dalla linea di semina, nelle due condizioni di prova.

In base alla velocità di avanzamento (simulata), alla larghezza della zona di campionamento (pari a 4,5 m per l'area tratteggiata in Figura 7) e alla durata della prova, è possibile calcolare il numero teorico di passaggi effettuati dalla seminatrice davanti alla zona di campionamento. Dividendo la concentrazione per unità di superficie di cui sopra per il numero di passaggi, si ottiene la deposizione di p.a. per metro quadrato e per passaggio (µg/m<sup>2</sup> passaggio), alle varie distanze multiple della larghezza di semina (4,5 m). Considerando che ad ogni successivo passaggio, la seminatrice si allontana di 4,5 m dalla zona di campionamento, è possibile ricostruire la distribuzione teorica ottenibile in campo dopo un certo numero di passaggi. Per tale motivo sono state adottate distanze di campionamento multiple di 4,5 m. Ad esempio, dopo tre passaggi, la quantità totale di p.a. che si dovrebbe avere alla distanza di 4,5 m dalla iniziale linea di semina risulterà dalla somma dei tre valori relativi, rispettivamente, alla concentrazione calcolata a 4,5 m (primo passaggio), a 9 m (secondo passaggio) e a 13,5 m (terzo passaggio). Applicando tale ragionamento, nel caso presente, si è preso come riferimento il numero di passaggi (8) corrispondente ad una parcella avente una larghezza di 36 m (la *BBA Drift Guideline, Part VII, 2-*

1.1, 1992, “*Measuring direct drift when applying liquid plant protection products outdoors*” prescrive di effettuare le prove su parcelle di 3600 m<sup>2</sup> di 36 m di larghezza), adottata nelle prove di campo degli anni precedenti (APENET 2009 e altri). In base a questo metodo, disponendo di sole cinque distanze di campionamento (fino a 22,5 m) sarebbe possibile ricostruire la distribuzione limitatamente a cinque passaggi. Tuttavia, disponendo delle serie di cinque valori medi che descrivono la variazione lungo la zona di campionamento, utilizzando le funzioni di regressione di ciascuna serie, è possibile calcolare le concentrazioni probabili relative ai passaggi successivi al quinto, in modo da avere la distribuzione dei principi attivi su una larghezza di 50 m sottovento alla zona di semina derivante dall’esecuzione di 8 passaggi. Teoricamente, tale procedimento può essere applicato per qualsiasi numero di passaggi e qualsiasi distanza dalla linea di semina.

Per quanto riguarda i filtri dei campionatori d’aria, le analisi forniscono la quantità di p.a. intercettata dal filtro (µg/filtro). Tenendo conto della durata del campionamento, del valore di portata d’aria e della densità di quest’ultima è possibile calcolare la concentrazione di p.a. nell’aria in µg/kg (= ppb). In base ai tre punti di campionamento è possibile tracciare le curve che descrivono l’andamento della concentrazione nell’aria con e senza modifica. In questo caso l’applicazione di un metodo analogo a quello sopra descritto per la stima della concentrazione a terra in condizioni di campo non è stato ritenuto possibile.

## 5.5 Risultati

### 5.5.1. Sistema di prove a punto fisso

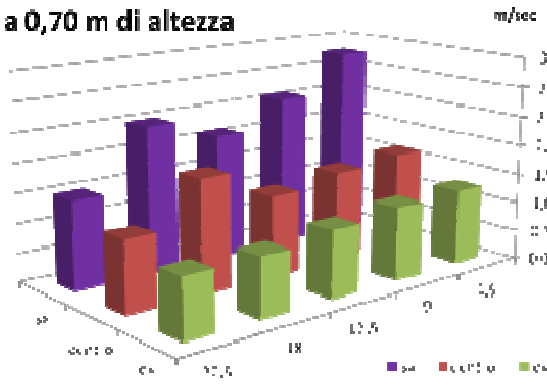
L’organizzazione del sistema di prova ha dato risultati soddisfacenti in relazione alle strutture e attrezzature utilizzate. La schermatura del lato esterno del portico con teli amovibili nei confronti del vento esterno è risultata funzionale. L’impiego del ventilatore industriale consente di creare condizioni costanti e ripetibili di velocità e direzione del vento. Unica precauzione da osservare è attendere alcuni minuti, prima di iniziare la prova di semina simulata, in modo che il flusso d’aria si stabilizzi lungo tutto il tunnel.

L’area di prova è stata preventivamente monitorata per individuare la più idonea distanza fra ventilatore e seminatrice in grado di consentire la maggiore uniformità della velocità dell’aria in tutta la zona di prova, per definire le più opportune distanze di campionamento dalla seminatrice e per verificare la ripetibilità delle condizioni di prova. La Figura 13 mostra i risultati di tali rilievi. La velocità del vento è risultata sempre nell’intervallo 1-5 m/s richiesto dalla metodologia “*BBA Drift Guideline, Part VII, 2-1.1, 1992, “Measuring direct drift when applying liquid plant protection products outdoors”*”.

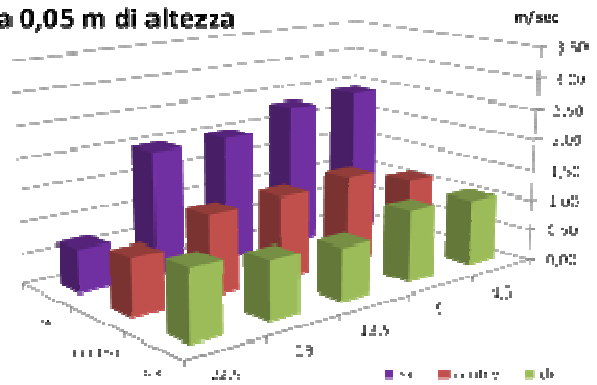
L’andamento dei valori risente della presenza della seminatrice che funge da schermo per una porzione dell’aria di campionamento, come si può notare in modo chiaro nella Figura 14 che riporta la mappa del vento alle diverse altezze monitorate. Tali condizioni sono risultate ripetibili in diverse prove. Nel corso dei test è stato osservato che una certa quantità di polvere fuoriesce con il seme nei gruppi di semina (la concentrazione media rilevata dopo ciascun test fra le due ruote premi-seme di ciascun gruppo di semina, tramite un campionatore d’aria con i filtri del tipo indicato al punto 5.4.1 è stata di 0,45 ppb). Poiché la seminatrice era sollevata da terra, si è provveduto ad avvolgere parzialmente le ruote premi-seme con dei sacchetti di plastica, fino all’altezza che raggiungerebbe il terreno in condizioni di campo, per simulare questa situazione ed evitare che quantità di polveri normalmente localizzate nel terreno, trascinate dal vento, andassero a falsare le prove.



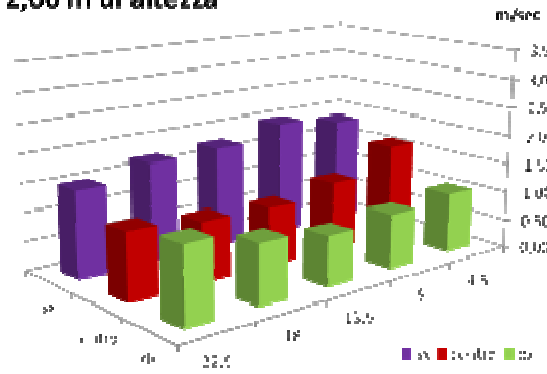
a 0,70 m di altezza



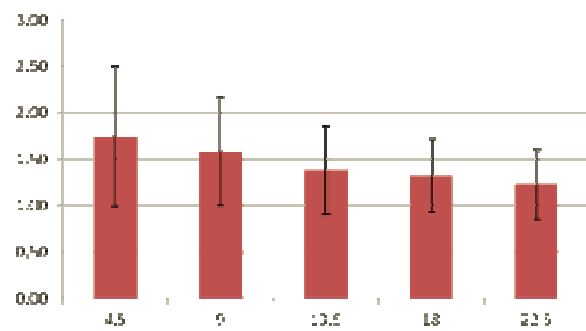
a 0,05 m di altezza



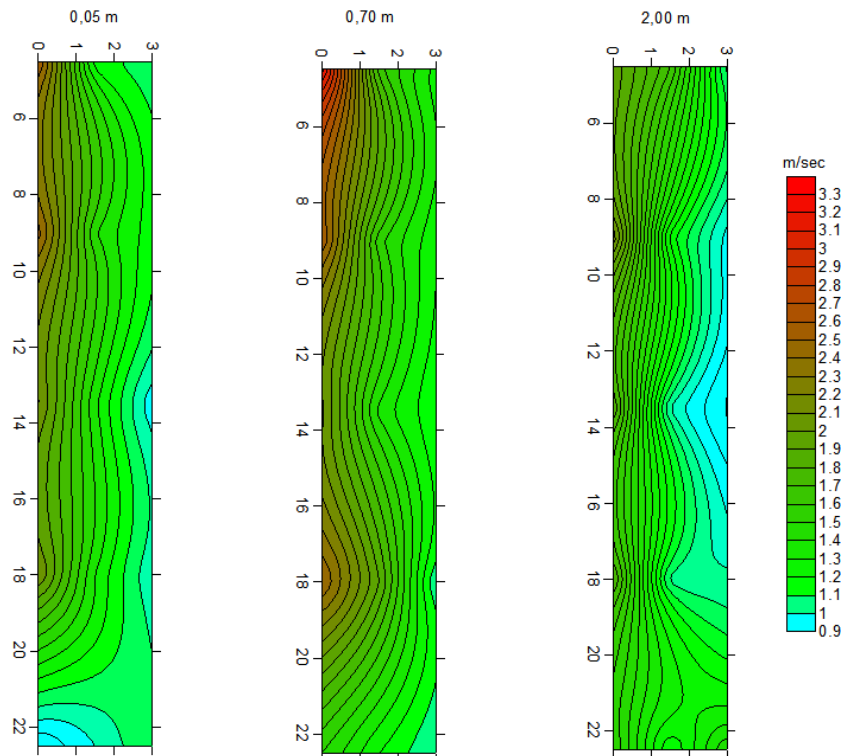
a 2,00 m di altezza



Velocità media del vento [m/sec ± dev. st.]  
(tre altezze, tre posizioni)



**Figura 13** – Andamento della velocità dell'aria nella zona di prova sottovento rispetto alla seminatrice a diverse altezze e media.



**Figura 14** – Mappa del vento nella zona di campionamento. Sul lato destro dei diagrammi è visibile l'effetto schermante creato dalla seminatrice stessa

### 5.5.2 Valutazione dell'efficacia del materiale filtrante utilizzato e caratterizzazione fisica delle polveri da abrasione

I risultati dei test di valutazione del filtro antipolline a carboni attivi (FAP) sono riportati in Tabella 25. I valori dell'analisi gravimetrica e chimica sono fra loro coerenti e indicano che rispetto all'aria espulsa non filtrata il solo FAP abbatte il 95,87% della polvere totale e il 95,20% del principio attivo in essa contenuto. Una volta inserito nel prototipo di modifica realizzato dal CRA-ING, l'abbattimento sale al 98,01% e al 97,57% rispettivamente per la polvere totale e per la quantità di imidacloprid, con riferimento al volume di aria espulso dalla seminatrice nel corso di ciascuna prova (colonna arancione sulla destra della tabella).

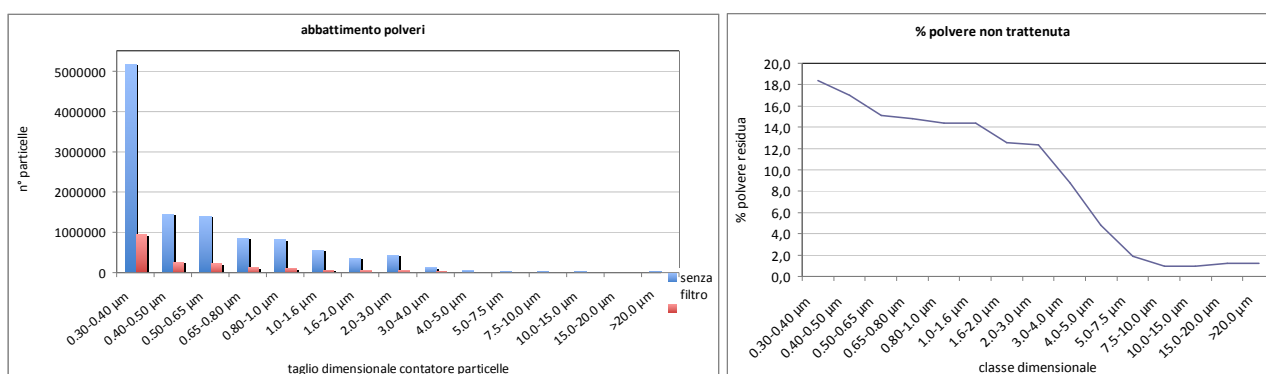
**Tabella 25** – Risultati delle prove di valutazione dell'efficienza del filtro antipolline.

| Analisi gravimetrica dei campioni (campionatori TECORA) |                             |                   |                              |                |           | Rif a volume totale di aria espulsa dalla seminatrice |           |                             |  |
|---|-----------------------------|-------------------|------------------------------|----------------|-----------|---|-----------|-----------------------------|--|
| condiz.   | volume aria, m <sup>3</sup> | massa polvere, µg | concentr., µg/m <sup>3</sup> | concentr., ppb | riduz., % | massa polvere, µg                                     | riduz., % | polvere/sup seminata, µg/ha | Note   |
| 1   | 0,24                        | 811,00            | 3337,45                      | 2724,45        | -         | 148867,84   | -         | 225557,33                   | In entrambi i casi, a parità di concentrazione, testandosi di 2 tubi su 4, la quantità di polvere espulsa va raddoppiata |
| 2   | 0,23                        | 31,58             | 137,90                       | 112,57         | 95,87     | 6151,24   | 95,87     | 9320,07                     |  |
| 3   | 0,23                        | 30,50             | 132,61                       | 108,25         | 96,03     | 2957,52   | 98,01     | 4481,10                     | Il campionamento è riferito a 4 tubi su 4  |

| Analisi chimica dei campioni (campionatori TECORA; p.a. imidacloprid) |                             |                       |                              |                |           | Rif a volume totale di aria espulsa dalla seminatrice |           |                          |   |
|---|-----------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|-----------|---|-----------|--------------------------|---|
| condiz.   | volume aria, m <sup>3</sup> | massa p.a., µg/filtro | concentr., µg/m <sup>3</sup> | concentr., ppb | riduz., % | massa p.a., µg  | riduz., % | p.a./sup seminata, µg/ha | Note  |
| 1   | 0,24                        | 80,70                 | 332,10                       | 271,10         | -         | 14813,36  | -         | 22444,48                 | In entrambi i casi, a parità di concentrazione, testandosi di 2 tubi su 4, la quantità di p.a. espulso va raddoppiata |
| 2   | 0,23                        | 3,65                  | 15,94                        | 13,01          | 95,20     | 710,96  | 95,20     | 1077,21                  |   |
| 3   | 0,23                        | 3,71                  | 16,13                        | 13,17          | 95,14     | 359,75  | 97,57     | 545,08                   | Il campionamento è riferito a 4 tubi su 4 (tutta l'aria espulsa dalla   |

Per quanto riguarda la caratterizzazione dimensionale della polvere da abrasione, i dati sono attualmente oggetto di elaborazione. Tuttavia, un primo dato disponibile è quello derivante dal test con il contatore laser di particelle, descritto dai diagrammi di Figura 15, che mostrano la capacità del filtro di trattenere particelle in funzione delle loro dimensioni. Le barre dell'istogramma a sinistra indicano il n. di particelle rilevate nell'aria non filtrata e dopo il passaggio attraverso il filtro. Le differenze fra le barre blu e rosse danno un'idea della quantità di particelle trattenute per ogni classe dimensionale.



**Figura 15** – Risultati dei test con il contatore laser di particelle. A sinistra: istogramma con il numero di particelle per classe dimensionale; a destra: percentuale di polvere non trattenuta dal filtro rispetto alla quantità rilasciata dalla seminatrice convenzionale.

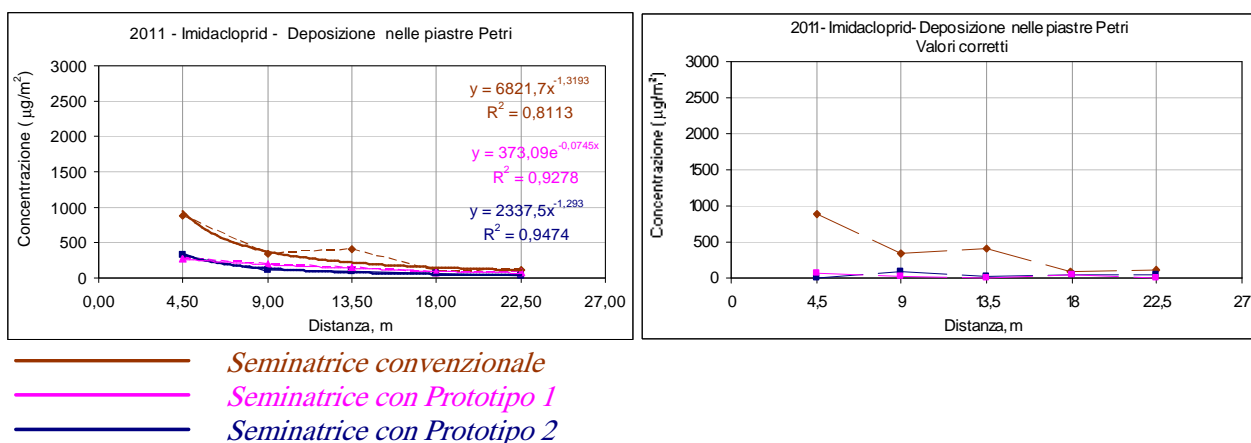
Il filtro è risultato efficace lungo tutto lo spettro dimensionale considerato. Al diminuire delle dimensioni delle particelle, la percentuale di polvere non trattenuta dal filtro aumenta (fino ad un massimo intorno al 18,5%, diagramma a destra). Va però sottolineato che le frazioni più sottili risultano quantitativamente (in termini di massa) meno rilevanti. D'altro canto, esse, per le loro caratteristiche, tendono probabilmente a persistere più a lungo sospese nell'aria e quindi risultano maggiormente soggette a deriva.

### 5.5.3 Osservazioni sulla deriva delle polveri

#### Deposizioni a terra e percentuale di abbattimento

Nonostante le difficoltà legate anche alla ritardata consegna del seme, le prove di semina simulata sono state completate per tutti i principi attivi e per tutte le configurazioni della seminatrice descritte al punto 5.3.4. Sempre in conseguenza del suddetto ritardo, i risultati delle analisi dei campioni sono al momento parziali, ma forniscono interessanti indicazioni sul livello di abbattimento ottenibile in seguito all'applicazione dei dispositivi di abbattimento sviluppati dal CRA-ING rispetto alla seminatrice senza alcun dispositivo (convenzionale).

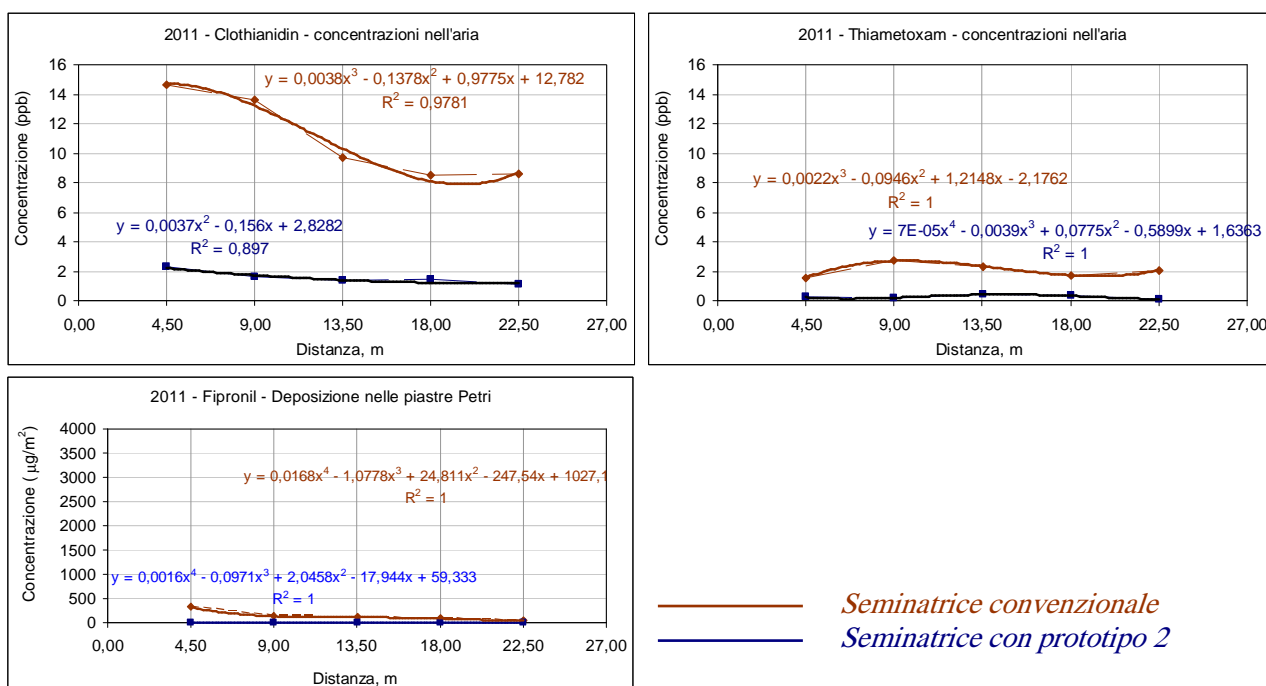
I risultati disponibili riguardano le prove con tutti e quattro i principi attivi, ma mentre per clothianidin, thiamethoxam e fipronil non sono ancora disponibili i dati relativi a tutte le ripetizioni effettuate, e solo con il prototipo 2, per imidacloprid, avendo potuto anticipare l'inizio delle prove per la disponibilità del seme, sono disponibili dati di tutte le ripetizioni con entrambi i prototipi. Queste prove sono servite per una messa a punto delle modifiche. I risultati hanno avuto un andamento variabile passando da valori di abbattimento inizialmente più bassi a valori più vicini alle attese. Essi sono riportati nei diagrammi di Figura 16. I valori rappresentano le medie delle concentrazioni per metro quadrato osservate a ciascuna distanza di campionamento. Trattandosi di prove a punto fisso i valori sono molto elevati e corrispondono in teoria alla quantità di polvere che il terreno avrebbe ricevuto nel corso della semina di 6666,67 m<sup>2</sup>.



**Figura 16** – Concentrazioni di imidacloprid rilevate nelle prove a punto fisso. A sinistra sono riportati i dati rilevati nelle piastre Petri riferiti al m<sup>2</sup>. A destra le curve corrette in base agli interventi di ottimizzazione dell'applicazione dei prototipi. Le curve di regressione non sono evidenziate per non pregiudicare la leggibilità del diagramma.

Il diagramma a sinistra mostra un andamento piuttosto irregolare e riporta anche le funzioni di regressione relative alle tre configurazioni della seminatrice. Integrando sulla distanza le funzioni è stato possibile calcolare la quantità di polvere complessivamente depositata nell'area di prova e calcolare l'abbattimento percentuale che è risultato pari al 64,4% per il prototipo 2 e al 54,4% per il prototipo 1. Il confronto fra tale risultato e i valori di abbattimento molto elevati riportati in Tabella 25 riferiti alla valutazione dell'efficienza dei FAP hanno indotto ad effettuare delle verifiche per individuare eventuali perdite di polvere da altre parti della seminatrice. Si è rilevato che quantità

significative di polvere fuoriescono dalla flangia di accoppiamento dei deflettori con la bocchetta del ventilatore centrifugo a causa del deterioramento del sigillante apposto dal costruttore (silicone). Inoltre una certa quantità fuoriesce dalle finestre di ispezione dei sei gruppi di semina. Questi punti sono stati sigillati e attraverso la ripetizione di test e relative analisi è stato possibile calcolare le quantità di polvere e di p.a. disperse in precedenza attraverso di essi. I valori ottenuti sono stati utilizzati per apportare delle correzioni ai dati alla base del diagramma a sinistra e ne è risultato il diagramma di destra in cui l'abbattimento, calcolato in modo analogo sulle curve di regressione è stato superiore al 95%. In Figura 17 sono riportati i diagrammi delle deposizioni a terra al momento disponibili per clothianidin, thiamethoxam e fipronil. I test con questi principi attivi sono stati effettuati nell'ordine, dopo quelli su imidacloprid, e l'osservazione e la messa a punto di particolari sull'impiego dei prototipi è proseguito per tutta la durata delle prove. In seguito all'elaborazione dei dati (analoga a quella descritta per imidacloprid, con l'integrazione sulla distanza delle curve di regressione) si sono rilevati i seguenti abbattimenti: clothianidin: 76,6%; thiamethoxam: 89,6%; fipronil: 94,8%.

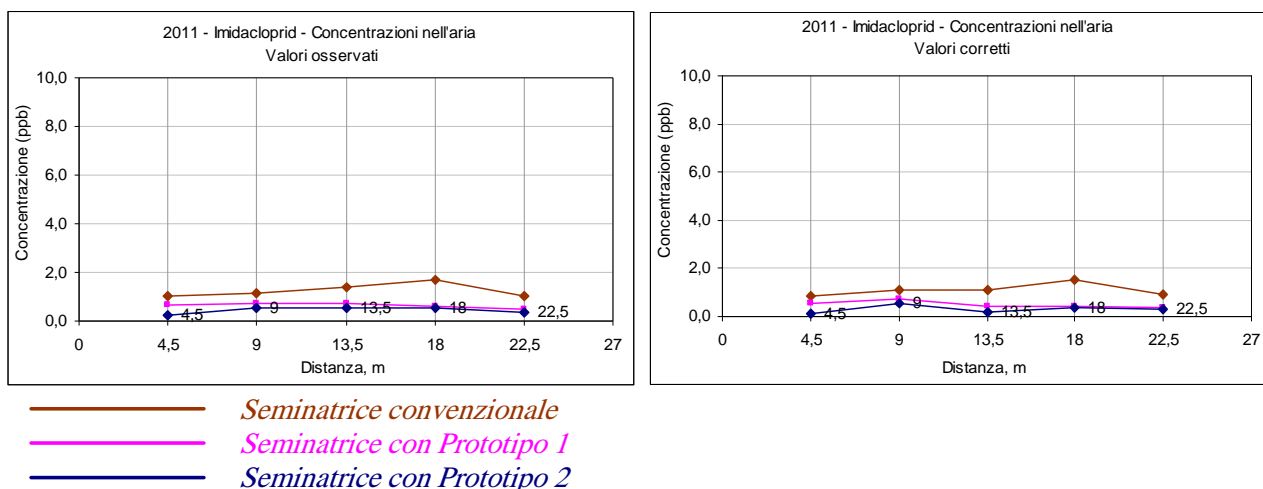


**Figura 17** – Concentrazioni di clothianidin, thiamethoxam e fipronil rilevate nelle prove a punto fisso. Le curve di regressione sono state utilizzate per calcolare, tramite integrale sulla distanza da 0 a 25 m, la quantità complessiva dispersa dalla seminatrice nelle due configurazioni provate.

Un elemento degno di nota è che, come rilevato anche in occasione delle prove del 2010, la quantità di clothianidin dispersa è stata molto maggiore rispetto agli altri principi attivi. Ciò risultava evidente anche dall'esame visivo della quantità di polvere rossa presente sulla superficie di prova, anche alle distanze maggiori. Questo fatto potrebbe essere collegato al minore abbattimento rilevato con clothianidin.

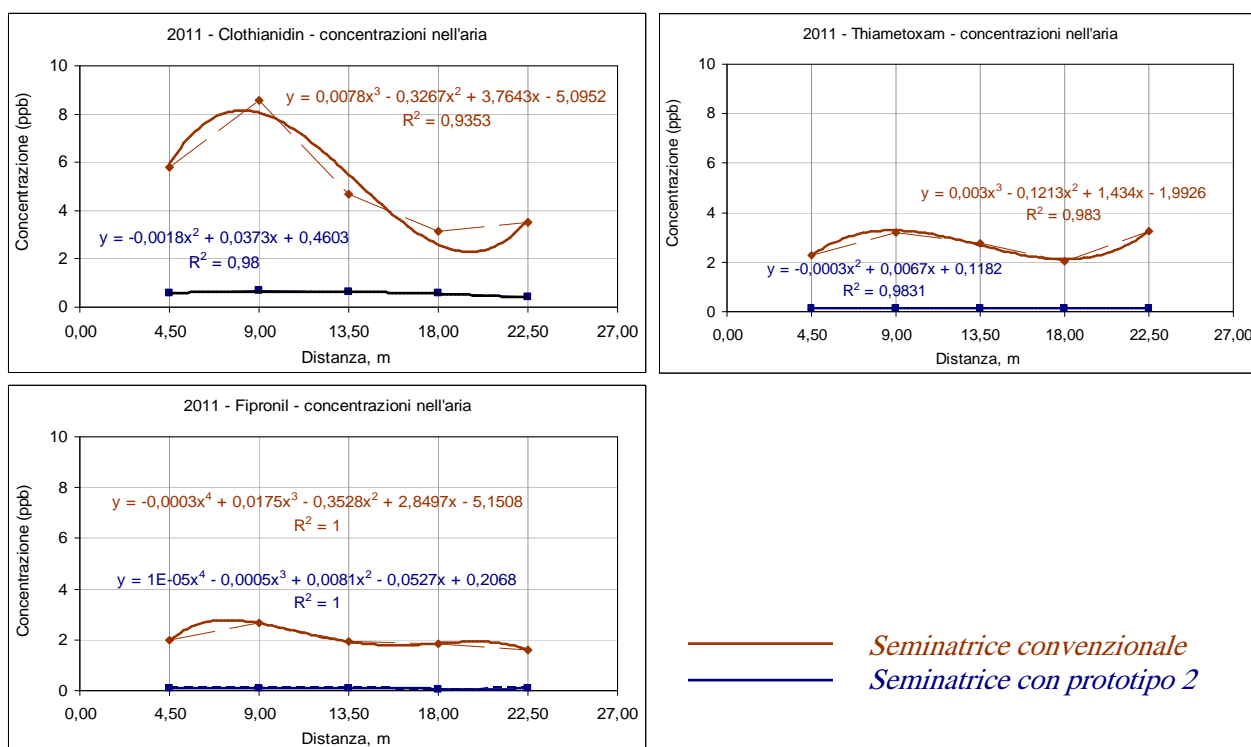
### Concentrazioni nell'aria

Le quantità di principio attivo rilevate sui dischetti filtro dei campionatori d'aria, riferite al volume d'aria campionato e alla sua densità hanno fornito le concentrazioni in ppb. Per imidacloprid vale quanto detto al punto 5.5.3 circa la necessità di mettere a punto i due prototipi e successivamente correggere i dati osservati in prima istanza. I risultati sono riportati nei diagrammi di Figura 18. La riduzione della concentrazione in seguito all'applicazione delle due modifiche risulta chiara.



**Figura 18** – Concentrazioni di imidacloprid nell’aria rilevate nelle prove a punto fisso. A sinistra sono riportati i dati osservati nella prima serie di prove. A destra sono riportate le curve corrette in base agli interventi di ottimizzazione dell’applicazione dei prototipi.

Con riferimento ai dati tabellari da cui è stato ottenuto il diagramma di sinistra, la riduzione è stata di 62,93 % e 46,04 % rispettivamente per il prototipo 2 e per il prototipo 1. I suddetti valori, in seguito all’apporto delle correzioni di cui si è detto, sono saliti 72,44% e 53,13%. Dai diagrammi si può infine notare che l’andamento dei valori non è decrescente con la distanza, il che sembra indicare una tendenza delle polveri a persistere sospese nell’aria e alla loro capacità di raggiungere distanze anche elevate. Ciò sembra in chiaro accordo con i risultati delle prove di caratterizzazione delle polveri che mostrano la presenza di una frazione molto sottile in grado di sfuggire anche ai filtri antipolline impiegati. In Figura 19 sono riportati i diagrammi delle concentrazioni rilevate per clothianidin, thiamethoxam e fipronil.



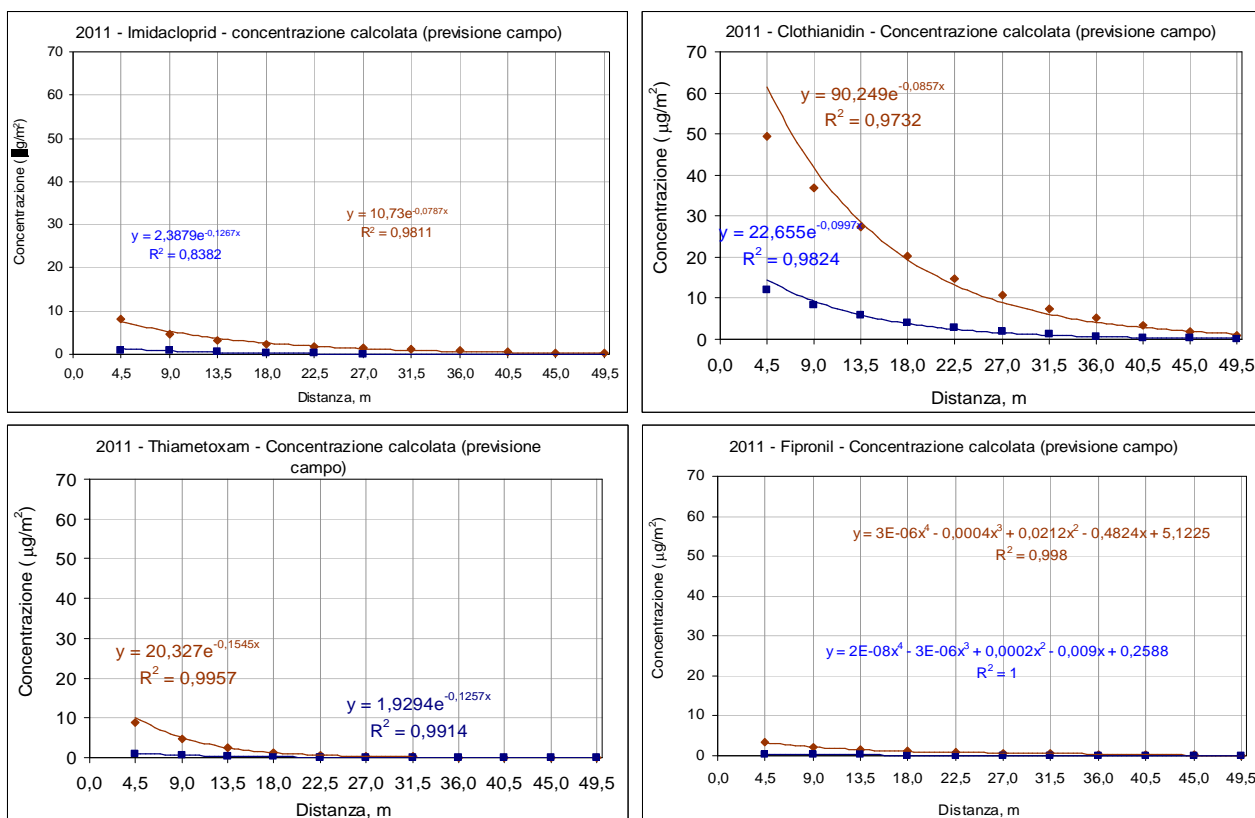
**Figura 19** – Concentrazioni nell’aria di clothianidin (in alto a sinistra), thiamethoxam (in alto a destra) e fipronil (in basso a sinistra) rilevate nelle prove a punto fisso.

Anche in questo caso clothianidin mostra dei valori decisamente più elevati degli altri due principi attivi. Tuttavia, l'andamento delle concentrazioni con seminatrice convenzionale al variare della distanza è simile per i tre principi attivi. La riduzione legata all'uso del prototipo 2 è netta e quantificabile, a partire dai dati tabellari, nei valori 86%, 90%, 96% rispettivamente per clothianidin, thiamethoxam e fipronil. Le concentrazioni non sembrano in nessun caso influenzate dalla distanza dalla zona di semina e confermano quanto detto per imidacloprid.

#### 5.5.4 Previsione delle concentrazioni in campo

Infine, si riportano due esempi di previsione delle concentrazioni a terra in campo per clothianidin, thiamethoxam e fipronil, calcolate a partire dai valori rilevati nelle prove a punto fisso (Figura 20). Il metodo di calcolo è descritto al punto 5.4.4. I valori delle concentrazioni sono compatibili con quelli rilevati nelle prove di campo del 2009 e del 2010. Integrando le curve di regressione riportate nei diagrammi rispetto alla distanza dalla zona di semina si può calcolare la quantità di p.a. che si deposita a terra su un ettaro di terreno contiguo alla zona di semina.

La riduzione percentuale delle concentrazioni legata all'utilizzo del prototipo 2, calcolata anche in questo caso integrando, è risultata simile a quella indicata nel punto 5.5.3: 85,9% per imidacloprid, 78,3% per clothianidin, 88,4% per thiamethoxam, 91,5% per fipronil.



**Figura 20** – Previsioni delle concentrazioni a terra ottenibili in campo a nelle condizioni di prova applicate a punto fisso per clothianidin, thiamethoxam e fipronil.

## 5.6 Conclusioni

1. I filtri utilizzati hanno mostrato una notevole efficienza nel trattenere le polveri e le sostanze in esse contenute (fino al 97% del p.a.). La capacità di trattenere la polvere diminuisce con le dimensioni di questa. Tutta la polvere con dimensioni superiori a 4-5  $\mu\text{m}$  viene trattenuta
2. Le modifiche messe a punto dal CRA-ING sono in grado di aumentare in modo significativo la capacità di abbattimento delle polveri mostrata dai semplici deflettori dell'aria. In attesa dei risultati completi delle prove, i dati attualmente a disposizione mostrano che, in particolare per il prototipo 2, si è passati da percentuali di abbattimento delle deposizioni a terra intorno al 50% osservate per i deflettori (prove 2009 e 2010) al 77% per clothianidin, al 90% per thiamethoxam, al 90% per imidacloprid e al 95% per fipronil. Ad eccezione di imidacloprid (per la cui prova valgono le particolari considerazioni di cui al punto 5.5.3), i suddetti valori sono stati ottenuti nell'ordine indicato, mostrando progressi legati a successive messe a punto di particolari sulla seminatrice. Di conseguenza è ipotizzabile che in seguito ad ulteriori prove, si evidenzino un livellamento verso l'alto delle percentuali di abbattimento (con particolare riferimento a clothianidin).
3. Le percentuali di abbattimento ottenute, applicate ai valori delle deposizioni a terra rilevate in campo nelle prove APENET 2010 con la stessa seminatrice senza deflettori, consentono di calcolare le ipotetiche concentrazioni che il prototipo 2 avrebbe determinato in quelle condizioni. Riguardo al fatto che con livelli di concentrazioni ottenibili con il prototipo 2 (e successivamente con il prototipo 1) si possano escludere effetti dannosi, si rimanda ai risultati delle esperienze svolte sulle api dalle Unità Operative competenti (CRA-API, Università di Bologna).
4. Le riduzioni delle concentrazioni nell'aria sono risultate analoghe a quelle delle deposizioni, con analoghi valori percentuali. Il fatto importante tuttavia è che una parte della frazione più sottile della polvere sfugge ai filtri impiegati. Coerentemente con quanto detto al primo punto, osservando l'andamento delle concentrazioni in funzione della distanza, sembra che essa tenda a persistere nell'aria e che sia in grado di giungere a distanze notevoli. La presenza di tale frazione di polvere nell'aria ha fatto sorgere l'esigenza di un'ulteriore verifica mirata a valutare la quantità di principio attivo intercettata e trattenuta da un'ape che vola per un certo periodo di tempo in una zona in cui è presente polvere da abrasione. Allo scopo, le varie UU.OO. del progetto hanno programmato una prova consistente nella semina di un appezzamento di circa 4 ha utilizzando la seminatrice equipaggiata con il prototipo 2. Durante la prova è prevista l'esposizione delle api alla nuvola prodotta dall'operazione di semina. Le api saranno successivamente analizzate per determinare la quantità di p.a. trattenuta, in relazione ai valori di riferimento (dose letale, sub-letale). Il test di semina in campo ha anche la funzione di verifica che la presenza del prototipo 2 non pregiudichi la funzionalità della macchina (regolarità di semina). I dettagli di tale prova sono riportati nella Parte B della presente relazione.
5. Le soluzioni proposte dal CRA-ING sono prototipi che non hanno diffusione nella realtà operativa attuale. Pertanto le basse concentrazioni ad esse riferibili costituiscono l'attuale limite tecnicamente ottenibile. Nel caso in cui le suddette concentrazioni risultino innocue per le api, assumendo il significato di valore soglia (da non superare), si porrà il problema di come introdurre tale valore soglia nella realtà produttiva, in riferimento alla necessità di dotare le seminatrici dei dispositivi descritti in precedenza o di altri ugualmente efficienti, e al tempo necessario a che tale adeguamento possa avvenire, soprattutto tenendo presente l'enorme numero di seminatrici usate presenti in Italia.
6. L'adozione delle modifiche qui descritte comporta la necessità di maneggiare i filtri esausti che vanno periodicamente sostituiti. Da questo punto di vista, il problema della dispersione

della polvere si sposta da un ambiente non controllabile come il campo ad uno controllabile come il centro aziendale. L'aspetto della durata operativa di un filtro sarà approfondito attraverso appositi test. Ovviamente la durata deve essere la maggiore possibile. Quanto alla manipolazione e allo smaltimento dei filtri esausti, le operazioni andranno svolte, come detto, in azienda prendendo tutte le precauzioni previste, con l'impiego degli opportuni D.P.I. (utilizzo di guanti, maschere con filtro, occhiali protettivi ecc.). Lo smaltimento dovrà seguire presumibilmente la prassi prevista per gli imballaggi dei fitofarmaci. Si ricorda che, in accordo con le norme comunitarie, gli stati membri dovranno stabilire, entro il 2013, le modalità da seguire per lo smaltimento degli imballaggi di prodotti per l'agricoltura.

7. In relazione al fatto che una parte della frazione più fine della polvere (inferiore a 4-5  $\mu\text{m}$ ) sfugge all'azione del filtro e, come mostrato nei diagrammi delle Figg. 18 e 19, sembra suscettibile di una elevata persistenza nell'aria e di raggiungere distanze ragguardevoli, il CRA-ING ha individuato alcune soluzioni per incrementare ulteriormente la capacità di abbattimento mostrata dai prototipi proposti. Tali soluzioni saranno oggetto di un nuovo progetto in materia di sicurezza ed ergonomia, in fase di avvio (Progetto INTRAC, finanziato dal MiPAF), coordinato dal Dr. Carlo Bisaglia del CRA-ING di Treviglio. La scheda di U.O. relativa al CRA-ING di Monterotondo prevede, fra l'altro, lo studio e la messa a punto di soluzioni in grado ridurre l'esposizione dell'operatore ai residui di fitofarmaci durante la loro applicazione.
8. L'ultima considerazione riguarda il sistema di prova a punto fisso. Nel caso in cui si intenda introdurre dei dispositivi, di qualsiasi genere, aventi la funzione di abbattere la quantità di polvere dispersa dalle seminatrici, risulterà necessario stabilire dei criteri per valutarne l'efficacia, sulla base di parametri di riferimento come quelli risultanti dalle prove del progetto APENET (concentrazioni a terra e nell'aria dei principi attivi compatibili con la biologia delle api). Si ritiene che, per tale valutazione, un sistema a punto fisso analogo a quello descritto nel presente documento offra maggiori garanzie di ripetibilità e confrontabilità dei risultati rispetto a prove di campo. Nel caso in cui si intenda percorrere la strada della certificazione dei suddetti dispositivi, sarà necessario apportare al sistema di prova delle modifiche che lo rendano più veloce, economico e adatto ad operazioni di routine, tenendo comunque fermi i seguenti punti ritenuti fondamentali: 1) il risultato prodotto deve essere esprimibile in forma di concentrazione di p.a. da confrontare con dei valori limite; 2) la prova deve essere effettuata con seme effettivamente conciato; 3) la sostanza utilizzata come conciante del seme deve essere innocua per il personale addetto e facilmente rilevabile (anche con metodi alternativi all'analisi chimica). Tutto ciò richiede un'attività di messa a punto del metodo. Allo scopo il CRA-ING ha elaborato una bozza di proposta di metodologia di prova che tiene conto sia delle esperienze maturate nell'ambito del progetto APENET, che di proposte parallele avanzate da altri centri di prova afferenti all'ENTAM (European Network for the Testing of Agricultural Machines), organo che si sta attivando per la definizione di uno standard di prova europeo. Sebbene alcuni punti di tale proposta (individuazione della sostanza tracciante da utilizzare come principio attivo e metodo di analisi più idoneo) siano attualmente oggetto di approfondimento, essa potrà rappresentare una concreta base per futuri sviluppi.



**Parte B - Prove di semina in campo: collaudo funzionale della seminatrice equipaggiata con il prototipo 2 CRA-ING per l'abbattimento della polvere da abrasione; valutazione della deposizione a terra e della concentrazione nell'aria del principio attivo residuo; prove di sorvolo del campo seminato con le api**

### 5.7 Obiettivi delle prove

Le prove avevano i seguenti obiettivi:

- Osservare il comportamento della modifica del CRA-ING denominata “prototipo 2” in condizioni di campo, con particolare riferimento ad eventuali effetti sulla qualità di semina;
- Trarre indicazioni circa le deposizioni a terra e le concentrazioni nell'aria conseguenti all'impiego del prototipo 2, in relazione ai livelli di abbattimento osservati nelle prove statiche.
- Verificare se, in seguito all'utilizzo sulla seminatrice del prototipo 2, sono rilevabili effetti letali su api che sorvolano la zona di semina.

### 5.8 Materiali e metodi

Le prove di semina si sono svolte il giorno 12 luglio 2011 al CRA-ING di Monterotondo, su un appezzamento approssimativamente quadrato di 4 ha di superficie. E' stata utilizzata la seminatrice Gaspardo Magica già descritta al punto 5.3.2, equipaggiata con il prototipo 2, per la semina di seme di mais conciato con clothianidin appartenente al lotto consegnato per le prove nel marzo 2011 (Figura 21). Il caricamento delle tramogge è stato effettuato a bordo campo, con 12 sacchetti di seme.



Figura 21 - Seme utilizzato nelle prove.

#### 5.8.1. Qualità di semina

Il controllo della regolarità di semina è stato effettuato immediatamente dopo il passaggio della seminatrice, aprendo il terreno in alcuni tratti delle linee di semina scelti casualmente, in modo da scoprire il seme deposto in fondo al solco verificando la regolarità delle distanze. Tali rilievi sono stati effettuati in conformità con il “Protocollo ENAMA Cat. 04 – Macchine per la semina” (luglio 2002). I parametri di valutazione delle prestazioni qualitative della seminatrice nel corso delle prove di semina in campo sono i seguenti:

- uniformità della distribuzione trasversale del seme per tutti gli elementi seminatori della macchina;
- efficienza di interrimento del seme, tramite il conteggio dei semi scoperti presenti sulla superficie del terreno;

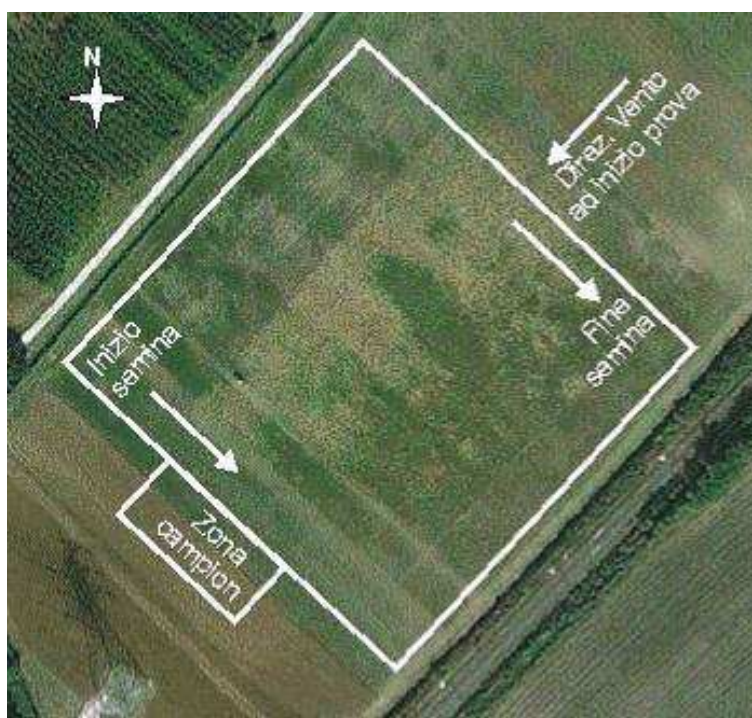
- distanza effettiva tra i semi depositi nel terreno, in relazione con quella teorica stabilita dal costruttore nella apposita tabella di taratura e rilevamento del numero di semine multiple (distanza tra i semi compresa tra 0 e 0,5 volte la distanza teorica), semine regolari (distanza compresa tra 0,5 e 1,5 volte la distanza teorica) e semine mancate (quando la distanza supera 1,5 volte la distanza teorica).

In base a tali rilievi sono stati calcolati degli indici di valutazione della qualità di semina, rapportando in percentuale il numero di eventi di deposizione ricadenti nelle precedenti classi al numero totale degli eventi esaminati nel corso delle prove.

Una verifica è stata effettuata anche dopo l'emergenza delle piantine, effettuando le stesse osservazioni appena citate sulle piantine di mais.

### ***5.8.2. Dispersione di polvere da abrasione contenente principio attivo***

Per monitorare la dispersione della polvere nella zona limitrofa al campo di semina, sono state posizionate 2 serie di 9 piastre Petri alle distanze di 1 e 5 m dalla prima linea di semina. Per tale rilevamento è stato scelto il lato che immediatamente prima dell'inizio della prova era situato sotto vento rispetto al campo da seminare. La distanza fra le piastre della stessa serie era di 10 m, per cui è stata interessata una fascia (zona di campionamento) di 40 m situata nella parte centrale del lato prescelto (Figura 22). Le piastre Petri contenevano una soluzione al 50% di acqua e acetonitrile per la captazione del principio attivo presente nella polvere.



**Figura 22** - Campo di prova del CRA-ING utilizzato per le prove di semina (da Google Earth).

Contemporaneamente, in corrispondenza della serie di piastre Petri poste alla distanza di 5 m sono stati posizionati quattro campionatori d'aria distanziati fra loro di 15 m. Per una maggiore corrispondenza con le condizioni di volo delle api l'altezza di campionamento è stata portata a 2 m. Per il filtraggio dell'aria sono stati utilizzati dischetti filtro in PTFE Millipore da 0,2  $\mu\text{m}$ , con diametro di 47 mm. Il campionamento è stato effettuato impostando i tre strumenti su una portata d'aria di 15 l/min.

La conservazione dei campioni e il metodo di analisi adottato sono gli stessi descritti al punto 5.4.

Velocità e direzione del vento sono state monitorate in continuo tramite un anemometro posizionato a 2 m di altezza, registrando in dati per l'elaborazione al computer. Nell'elaborazione, con riferimento ad intervalli di tempo di 1 min, sono state calcolate le medie degli angoli (rispetto al

Nord) da cui il vento soffiava e le velocità. E' stata successivamente calcolata la frequenza dei valori medi degli angoli per classi di frequenza di 10° (da 0 a 360°) riportandone il diagramma a "radar". Infine, per ogni classe di frequenza è stata calcolata la velocità media del vento, visualizzandone, anche in questo caso, l'andamento in funzione delle stesse classi, tramite diagramma a "radar".

### 5.8.3. Prove di sorvolo con api

Sono state utilizzate api provenienti dall'azienda del CRA-PAV di Roma, situata nelle vicinanze del CRA-ING. Sono state scelte api bottinatrici uniformi per età e dimensioni e collocate nelle gabbiette visibili in Figura 23 (un'ape per gabbietta), dotate di alimentatore.

In ciascuna prova (o ripetizione), 10 gabbiette venivano appese ad una barra orizzontale in alluminio, lunga 4 m. In base alla tesi di prova considerata, tale barra veniva dislocata nel campo di semina secondo le modalità riassunte nella Tabella 26.

L'esposizione avveniva durante l'esecuzione di due passaggi completi della seminatrice (andata e ritorno). Poiché la lunghezza del campo era di 200 m e la velocità di avanzamento di 1,67 m/s, il tempo di esposizione diretta delle api alla nube di polvere risultava, mediamente, pari a 270 s (comprensivo del tempo di voltata).



**Figura 23** – Gabbiette contenenti un'ape ciascuna, utilizzate nelle prove di sorvolo.

**Tabella 26** - Modalità di esecuzione delle prove di sorvolo con le gabbiette contenenti un'ape ciascuna.

| Tesi | Descrizione  | Ripetizione | Ora della prova |
|------|--|-------------|-----------------|
| A    | Le gabbiette sono posizionate immediatamente dietro la seminatrice a 2,5 m di altezza e procedono con essa (Figura 24)   | 1           | 11,30           |
|      |  | 2           | 11,40           |
| B    | Le gabbiette procedono a 4 m dal trattore e a 0,5 m di altezza per intercettare la polvere presente vicino alla superficie del terreno   | 1           | 12,00           |
| C    | Le gabbiette procedono a 4 m dal trattore e a 1,8 m di altezza, spostate lateralmente sotto vento rispetto al trattore stesso per intercettare la nube di polvere spostata dal vento (Figura 25) | 1           | 12,10           |
| D    | Le gabbiette seguono la seminatrice senza modifica CRA-ING (deflettori dietro assolcatori, come proposto dal costruttore)  | 1           | 15,00           |
|      |  | 2           | 15,10           |



**Figura 24** – Tesi A: la barra che sostiene le 10 gabbiette a 2,5 m di altezza è fissata alla parte posteriore della seminatrice. L'immagine di destra mostra il sistema durante la semina.



**Figura 25** – Tesi C: la barra che sostiene le 10 gabbiette è tenuta a circa 1,8 m di altezza da due operatori. Essi procedono a 4 m dalla seminatrice longitudinalmente e sono spostati trasversalmente rispetto ad essa in modo da intercettare la nube di polvere spostata dal vento.

Successivamente alle prove di semina, le gabbiette contenenti le api sono state collocate in camere umide, alla temperatura 25°C, dove, per un periodo di 24 h, sono state alimentate con miele e sottoposte ai controlli previsti consistenti nel rilevamento delle api morte in ciascuna tesi di prova. Al termine del periodo di controllo, le api morte sono state raccolte (separatamente per tesi di prova) e conservate in congelatore a -20°C, in attesa di essere sottoposte ad analisi chimica.

## 5.9 Risultati e discussione

### 5.9.1. Qualità di semina

Le Figure 26 e 27 mostrano alcuni esempi delle osservazioni descritte al punto 5.8.1 relativamente alla deposizione dei semi e alle piantine di mais nate.

Le osservazioni su semi e piantine hanno consentito di calcolare alcuni dei parametri indicativi della qualità del lavoro svolto dalla seminatrice equipaggiata con il prototipo 2. I risultati sono riassunti nella Tabella 27 in cui, ad essi, sono associati i corrispondenti giudizi sintetici secondo le indicazioni del Protocollo ENAMA citato al punto 5.8.1 e adottato dal CRA-ING per la certificazione delle prestazioni delle seminatrici.



**Figura 26** – Valutazione della regolarità di deposizione del seme nel terreno.



**Figura 27** – Controllo della regolarità di emergenza delle piantine di mais. Non essendo la prova finalizzata alla produzione di mais, il campo di prova non è stato sottoposto a cure colturali come controllo delle erbe infestanti e irrigazione, per cui le piantine, visibili fra le erbe infestanti, risultano nate in modo uniforme, pur presentando difformità di sviluppo per la carenza di acqua.

**Tabella 27** – Principali indici della qualità di semina derivati dalle osservazioni sulla distribuzione del seme nel terreno.

| Indici di uniformità ed efficienza                            | Valore | Giudizio* |
|---|--------|-----------|
| coefficiente irregolarità trasversale (%) (da prove statiche) | 3,7    | Ottimo    |
| efficienza di interrimento del seme (%)                       | 96,4   | Ottimo    |
| indice deposizioni multiple (%)                               | 0      | -         |
| indice deposizioni regolari (%)                               | 97,7   | Ottimo    |
| indice deposizioni mancate (%)                                | 2,3    | -         |

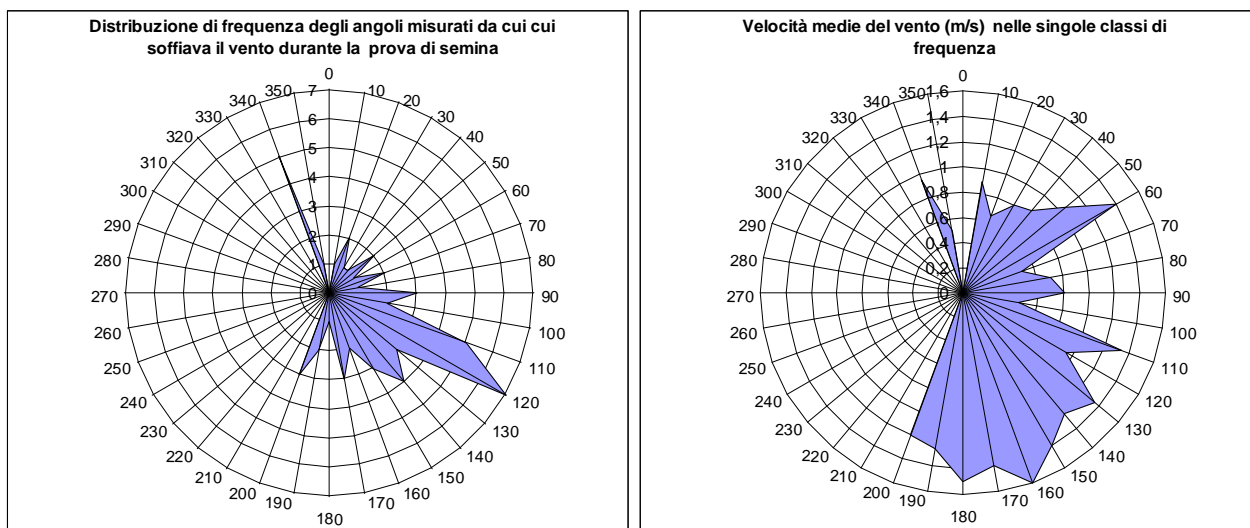
\* la scala dei giudizi ed i relativi intervalli sono descritti nel “Protocollo ENAMA” citato al punto precedente

In base ai dati esposti si può concludere che l’applicazione del prototipo 2 alla seminatrice oggetto delle prove non determina un deterioramento della qualità di semina.

### 5.9.2. Dispersione di polvere da abrasione contenente principio attivo

I rilievi relativi alle condizioni del vento sono riassunti nei diagrammi di Figura 28. Da essi si osserva come, nel corso della prova la direzione del vento non sia risultata costante rispetto a quella rilevata al momento del posizionamento di piastre Petri e campionatori d’aria (Figura 22). Questi, che nelle fasi iniziali della semina si trovavano sotto vento, in vari momenti della prova non sono risultati tali.

D’altra parte, i valori della velocità del vento sono risultati, in generale, piuttosto bassi (con una media complessiva di 0,63 m/s), per cui ritenendo che dispersione della polvere lontano dalla zona di campionamento sia stata contenuta, si è ritenuto comunque proseguire l’acquisizione dei campioni da sottoporre ad analisi



**Figura 28** – Andamento delle condizioni del vento. A sinistra: frequenza degli intervalli di un minuto, secondo classi angolari di 10°. A destra: valori medi della velocità (m/s) calcolati per le singole classi angolari.

I risultati delle analisi svolte presso il CRA-PAV di Roma sono riportati in Tabella 28. Sono riportate le deposizioni ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) osservate nelle 9 piastre Petri disposte sulle due distanze (1 m e 5 m) dalla linea di semina e le concentrazioni (ppb) nei filtri dei quattro campionatori d’aria disposti alla distanza di 5 m fra le piastre Petri.

Osservando la tabella si nota che alla distanza di 1 m le deposizioni sono state sempre inferiori al limite analitico indicato, mentre a 5 m, in quattro casi esse hanno assunto valori piuttosto elevati. Dei quattro filtri, i primi due, posti in corrispondenza delle piastre Petri n. 1, 2 e 3, per le quali si sono osservati i valori più alti, hanno anche essi fornito quantità di p.a. decisamente elevate, mentre gli altri due sono risultati al di sotto del LOQ.

La dislocazione dei campioni risultati apprezzabili all'analisi sembra essere di tipo puntuale. Infatti per la totale assenza di campioni positivi a 1 m dalla linea di semina, essi risultano isolati rispetto alla zona di semina. Questo fatto e i livelli di concentrazione raggiunti inducono a pensare ad un inquinamento con p.a. della zona specifica, non dipendente dall'operazione di semina, ma piuttosto all'esecuzione del caricamento del seme e di altre operazioni preliminari di cui si dirà più avanti.

**Tabella 28** – Risultati delle analisi del contenuto delle piastra Petri (LOQ <0,010 µg/piastra) e dei filtri dei campionatori d'aria (LOQ <0,010 µg/filtro) in seguito alle prove di semina in campo. La disposizione dei dati della tabella riproduce quella dei punti di campionamento in campo.

| Piastra Petri |                   |                   | Filtri |   |
|---------------|-------------------|-------------------|--------|---|
| n             | 1m                | 5m                |        | n |
|               | µg/m <sup>2</sup> | µg/m <sup>2</sup> | ppb    |   |
| 1             | <LOQ              | 50,93             | 283,94 | 1 |
| 2             | <LOQ              | 30,56             |        |   |
| 3             | <LOQ              | 30,56             | 84,38  | 2 |
| 4             | <LOQ              | <LOQ              |        |   |
| 5             | <LOQ              | <LOQ              | 0,00   | 3 |
| 6             | <LOQ              | <LOQ              |        |   |
| 7             | <LOQ              | <LOQ              | 0,00   | 4 |
| 8             | <LOQ              | 28,01             |        |   |
| 9             | <LOQ              | <LOQ              |        |   |

### 5.9.3. Prove di sorvolo

Il conteggio delle api morte è riportato per tutte le tesi di prova nella Tabella 29, dove è indicato anche l'orario di esecuzione del controllo.

Presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova, si sono effettuate le analisi UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) sui campioni di singole api morte entro 24 h dall'esposizione alle emissioni della seminatrice. Il limite analitico di tali determinazioni è LOD < 15 ng/ape. I risultati sono esposti nelle Tabelle 30 e 31 e indicano rispettivamente i nanogrammi/ape rinvenuti nei controlli, nelle tesi A, B, C (Tabella 30) e nella tesi D (Tabella 31).

I dati provenienti dalle analisi chimiche dei campioni di api morte indicano che l'applicazione del prototipo 2 alla seminatrice determina un consistente riduzione delle emissioni di polvere e di p.a. rispetto alla stessa macchina dotata dei soli deflettori che espellono l'aria dietro agli assolcatori. Dai dati riportati in Tabella 31, in tutti i campioni della tesi D sono state rilevate quantità di p.a. superiori sia al LOD che alla per contatto (pari a 21,8 ng/ape per clothianidin, Iwasa *et al.*, 2004). Nelle altre tesi (Tabella 30), in 16 campioni su 24 si osservano quantità inferiori al LOD; negli 8 campioni con quantità superiori a LOD, 5 hanno superato la DL50.

Concludendo, si osserva il persistere di un certo livello di mortalità anche in presenza del prototipo, a causa di fuoriuscite residue di polvere dalla seminatrice, al momento non controllabili.

**Tabella 29** – Conteggi delle api morte nel periodo di 24 h successivo ciascuna tesi di prova.

| Tesi A - Rip. 1 - Ora della prova: 11,30 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|--|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data                                     | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                               | 18,00         |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   |              | 2  |
| 13.07/2011                               | 8,30          | 1 |   | 1 |   | 1 |   |   | 1 | 1 |              | 5  |
| 13.07/2011                               | 10,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                               | 12,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                               | 14,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                               | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| <b>Totale morte</b>                      |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>7</b>     |    |

| Tesi A - Rip. 2 - Ora della prova: 11,40 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|--|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data                                     | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                               | 18,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                               | 8,30          |   | 1 |   |   |   |   | 1 |   |   |              | 2  |
| 13.07/2011                               | 10,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                               | 12,00         |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |              | 1  |
| 13.07/2011                               | 14,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                               | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| <b>Totale morte</b>                      |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>3</b>     |    |

| Tesi B - Ora della prova: 12,00 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|---------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data                            | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                      | 18,00         |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |              | 1  |
| 13.07/2011                      | 8,30          |   | 1 | 1 |   |   |   |   |   | 1 |              | 3  |
| 13.07/2011                      | 10,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                      | 12,00         |   |   |   |   | 1 |   |   |   |   |              | 1  |
| 13.07/2011                      | 14,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                      | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| <b>Totale morte</b>             |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>5</b>     |    |

| Tesi C - Ora della prova: 12,10 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|---------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data                            | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                      | 18,00         |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |              | 1  |
| 13.07/2011                      | 8,30          |   | 1 | 1 |   | 1 | 1 | 1 |   |   |              | 4  |
| 13.07/2011                      | 10,00         |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |              | 1  |
| 13.07/2011                      | 12,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                      | 14,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                      | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| <b>Totale morte</b>             |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>6</b>     |    |

| controllo 1 - ora della prova: 14,30 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|--------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data                                 | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                           | 18,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                           | 8,30          | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 1  |
| 13.07/2011                           | 10,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                           | 12,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                           | 14,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                           | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| <b>Totale morte</b>                  |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>1</b>     |    |

| controllo 2 - ora della prova: 14,40 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|--------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data                                 | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                           | 18,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1            | 1  |
| 13.07/2011                           | 8,30          |   |   |   |   | 1 |   |   |   |   |              | 1  |
| 13.07/2011                           | 10,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                           | 12,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                           | 14,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                           | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| <b>Totale morte</b>                  |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>2</b>     |    |

| Tesi D - Ripetizione 1 - Ora della prova: 15,00 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|---|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data  | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                                      | 18,00         |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   | 1            | 2  |
| 13.07/2011                                      | 8,30          | 1 |   |   |   |   | 1 |   |   | 1 |              | 3  |
| 13.07/2011                                      | 10,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                                      | 12,00         |   | 1 |   |   | 1 |   |   |   |   |              | 2  |
| 13.07/2011                                      | 14,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                                      | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |              | 1  |
| <b>Totale morte</b>                             |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>8</b>     |    |

| Tesi D - Ripetizione 2 - Ora della prova: 15,10 |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | totale morte |    |
|---|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------|----|
| data  | ora controllo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |              | 10 |
| 12.07/2011                                      | 18,00         |   |   |   |   |   | 1 |   | 1 | 1 | 1            | 4  |
| 13.07/2011                                      | 8,30          | 1 |   | 1 | 1 | 1 |   |   | 1 | 1 | 1            | 4  |
| 13.07/2011                                      | 10,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                                      | 12,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| 13.07/2011                                      | 14,00         |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |              | 1  |
| 13.07/2011                                      | 15,00         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |              | 0  |
| <b>Totale morte</b>                             |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <b>9</b>     |    |



**Tabella 30** - Concentrazione di clothianidin nelle api morte in seguito ad esposizione alla seminatrice modificata.

| Concentrazione di clothianidin (ng/ape) |            |             |                  |                  |                 |                            |
|---|------------|-------------|------------------|------------------|-----------------|----------------------------|
| Campioni                                | Controllo1 | Controllo 2 | Sopra trattore 1 | Sopra trattore 2 | Dietro trattore | Dietro trattore sottovento |
| 1                                       | < LOD      | < LOD       | < LOD            | < LOD            | < LOD           | < LOD                      |
| 2                                       |            | 18          | 30               | 147,5            | 11              | 39                         |
| 3                                       |            |             | 22,5             | < LOD            | 55,5            | 12                         |
| 4                                       |            |             | < LOD            |                  | < LOD           | < LOD                      |
| 5                                       |            |             | < LOD            |                  | < LOD           | < LOD                      |
| 6                                       |            |             | < LOD            |                  |                 | < LOD                      |
| 7                                       |            |             | < LOD            |                  |                 |                            |

La numerazione dei campioni non si riferisce alla posizione delle api nelle gabbiette.

**Tabella 31** - Concentrazione di clothianidin nelle api morte in seguito all'esposizione alla seminatrice non modificata.

| Concentrazione di clothianidin (ng/ape) |                             |                               |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
| Campioni                                | Dietro trattore Prima prova | Dietro trattore Seconda prova |
| 1                                       | 51                          | 23                            |
| 2                                       | 29,5                        | 32                            |
| 3                                       | 44                          | 122                           |
| 4                                       | 50,5                        | 30                            |
| 5                                       | 151                         | 51                            |
| 6                                       | 36,5                        | 26                            |
| 7                                       | 291,5                       | 22                            |
| 8                                       | 39                          | 94,5                          |
| 9                                       |                             | 24,5                          |

La numerazione dei campioni non si riferisce alla posizione delle api nelle gabbiette.

La Tabella 32 riassume i dati della Tabella 29, riportando le percentuali di api morte. Poiché la mortalità media rilevata nel controllo è risultata del 15%, i dati relativi alle altre tesi andrebbero quindi corretti sottraendo tale valore alla mortalità complessiva.

Per quanto riguarda la Tesi A, si osserva una grande differenza fra le due ripetizioni effettuate, con una mortalità del 70% nella prima e del 30% nella seconda. La spiegazione di tale differenza risiede nel fatto che, immediatamente prima dell'inizio della semina, sono state effettuate le seguenti operazioni:

1. In corrispondenza della prima linea di semina è stata effettuata una prova preliminare inserendo del talco nella tramoggia vuota allo scopo di evidenziare le zone di fuoriuscita dalla polvere. La macchina ha proceduto per qualche metro con i coperchi delle tramogge sollevati. Poiché il sistema di ricircolo del prototipo 2 prevede il ritorno dei tubi proprio sui coperchi, si è avuta la fuoriuscita da essi di una quantità notevole di materiale (talco e polvere da abrasione già presente all'interno della macchina, non ripulita per avere condizioni ordinarie di utilizzo). La zona è stata quindi probabilmente "inquinata" per i passaggi successivi. Se tale supposizione è

corretta, dalle analisi delle api morte nella prima ripetizione dovrebbero risultare anche residui dei principi attivi usati nelle prove precedenti (l'ultimo è stato fipronil, il penultimo thiamethoxam).

- carico del seme nelle tramogge in prossimità della prima linea di semina: ciò ha causato una rilevante deposizione di polvere sulla superficie della seminatrice. Tale polvere, nelle prime fasi della semina, prima di disperdersi, avrebbe investito le gabbiette sospese sulla barra montata sul trattore durante la prima ripetizione.

In base a tali considerazioni, si ritiene opportuno escludere i risultati della prima ripetizione della tesi A, assumendo invece come valido il dato di mortalità del 30% relativo alla seconda ripetizione, che in base alla mortalità del controllo può essere corretto al 15%, mentre il guadagno rispetto al risultato della tesi D (seminatrice con i normali deflettori che finiscono dietro gli assolcatori) risulta pari al 78,6% (Tabella 32).

La mortalità rilevata nelle tesi B e C è risultata superiore rispetto alla tesi A, e i relativi guadagni rispetto alla tesi D sono conseguentemente inferiori (rispettivamente 50% e 35,7%). Ciò trova spiegazione nella modalità di movimentazione delle gabbiette. Nella tesi B esse seguono la seminatrice all'altezza di 50 cm da terra, venendo a contatto con la polvere sollevata dagli organi di semina costituita da terra e dalla polvere da abrasione sfuggita all'azione del prototipo. Il contatto delle api con la polvere è altrettanto consistente nella tesi C, che prevede di intercettare la nube polvere posizionando le gabbiette sottovento rispetto alla traiettoria di semina.

**Tabella 32** - Riassunto dei dati di mortalità per ciascuna tesi nel periodo di 24 h successivo alla prova.

| Tesi  | rip. | mortalità dopo 24 h |           |                                     |                           | Note   |
|-------|------|---------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------------|--|
|       |      | Valore (%)          | Media (%) | Media corretta (rif. Controllo) (%) | Guadagno (rif tesi D) (%) |  |
| A     | 1    | 70                  | 30        | 15                                  | 78,6                      | Zona di semina inquinata da polvere durante carico seme e messa a punto - prova non valida |
|       | 2    | 30                  |           |                                     |                           |  |
| B     | 1    | 50                  | 50        | 35                                  | 50,0                      |  |
| C     | 1    | 60                  | 60        | 45                                  | 35,7                      |  |
| D     | 1    | 80                  | 85        | 70                                  | 0,0                       |  |
|       | 2    | 90                  |           |                                     |                           |  |
| Contr | 1    | 10                  | 15        | 0                                   | 100,0                     |  |
|       | 2    | 20                  |           |                                     |                           |  |

In merito ai risultati appena esposti, sotto l'aspetto tecnico si ricorda che, come descritto al paragrafo 5.5 della parte A della presente relazione, il prototipo 2 è in grado di bloccare il 97% del p.a. che investe il filtro (punto 5.5.2) e, dopo una serie di messe a punto, esso si è dimostrato in grado di bloccare fino al 95% del p.a. che verrebbe espulso da un seminatrice priva di sistemi di abbattimento (punto 5.5.3). La quantità residua non trattenuta può influire negativamente sulle api. Si ritiene che gli effetti negativi osservati (tesi A, B e C) siano principalmente imputabili alla quantità di p.a. che fuoriesce, insieme al seme, dai sei organi di distribuzione. A tal proposito, si

ricorda che in prove statiche (parte A, punto 5.5.2) condotte posizionando i campionatori d'aria fra le due ruote copri-seme posteriori, si è osservata una concentrazione nell'aria di imidacloprid (non è stato possibile ripetere la prova per gli altri principi attivi) pari a 0,45 ppb, sia con prototipo che senza. Ciò testimonia di una fuoriuscita costante di polvere dagli organi di distribuzione, al momento non controllabile. Sono state elaborate delle ipotesi di soluzioni volte al contenimento di queste perdite che sono in attesa di essere verificate.

Riguardo alla modalità di esecuzione delle prove di sorvolo si osserva quanto segue.

L'applicazione del prototipo alla seminatrice determina un rilevante progresso rispetto alla stessa macchina con i semplici deflettori, tuttavia persistono degli effetti negativi sulle api legati al p.a. che sfugge all'azione del prototipo (come descritto poche righe sopra). Il 100% di abbattimento costituisce probabilmente un obiettivo utopistico per cui, probabilmente, si continuerà ad osservare un certo tasso di mortalità delle api anche con bassissime percentuali di polvere dispersa. In relazione al punto precedente, in base alle modalità di esecuzione delle prove con le gabbiette (escludendo la prima prova), si può dire che:

- muore il 30% delle api che volando a 2,5 m di altezza, seguono per 400 m la seminatrice e si trovano esposte per 270 s alla polvere da questa emessa;
- muore il 50% delle api che volando a 50 cm di altezza, seguono per 400 m la seminatrice e si trovano esposte per 270 s alla polvere da questa emessa;
- muore il 60% delle api che volano a 1,8 m di altezza seguendo per 400 m la seminatrice a 4 m di distanza, spostate sottovento rispetto ad essa;
- muore il 15% del controllo.
- muore l'85% delle api che volano per 400 m dietro la seminatrice equipaggiata con i soli deflettori (senza il prototipo 2) e si trovano esposte per 270 s alla polvere da questa emessa.

Non sembra che tali dati possano essere generalizzati. Dimostrano che, all'interno nel campo seminato, le api, poste nelle peggiori condizioni di volo rispetto alla traiettoria seguita dalla seminatrice e alla direzione del vento, continuano a morire in una certa misura, che risulta, tuttavia sensibilmente inferiore rispetto alla condizione "senza prototipo 2".

## 6. Effetti sub letali di neonicotinoidi e fipronil sull'apprendimento e la memoria olfattiva e sulle capacità di orientamento

### 6.1 Introduzione

I neonicotinoidi (imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin) sono antagonisti dell'acetilcolina, poiché si legano ai recettori nicotinici di questo neurotrasmettitore, causandone l'attivazione persistente e inducendo ipereccitazione, seguita da morte (Jeschke and Nauen, 2008).

I fenilpirazoli, come il fipronil, si legano alle pompe ioniche attivate dall'acido gamma-aminobutirrico, impedendone il funzionamento e causando, come sopra, ipereccitazione e morte (Gunasekara et al., 2007).

La DL50 calcolata per i principi attivi in studio è per tutti molto bassa (nell'ordine di nanogrammi per ape) e in letteratura sono riportati diversi valori in diversi studi, in ragione della variabile capacità di detossificazione delle molecole a seconda della colonia (43,9 ng/ape per clothianidin per contatto, Facsheet EPA, 2003; 3,89 ng/ape per clothianidin per ingestione, EPA 2003; Iwasa et al. 2004: 18 ng/ape per imidacloprid, 30 ng per thiamethoxam, and 75 ng per dinotefuran; Schmuck et al. 2001: più di 200 ng/ape per imidacloprid)

Nel caso di imidacloprid, la DL50 per intossicazione acuta dei suoi metaboliti è la stessa (5-idrossi-*metabolita*) o talvolta maggiore (olefin-imidacloprid) (Suchail et al. 2001).

Neonicotinoidi e fenilpirazoli sono insetticidi sistemici penetrano nella pianta e possono ritrovarsi nel polline e nel nettare prodotti durante la fioritura (EPA 2003).

Alcuni studi non hanno mostrato effetti negativi sulle api perché hanno preso in considerazione solo la mortalità dovuta a intossicazione acuta (Nguyen et al., 2009) ma molti altri studi hanno esaminato metodi più appropriati per valutare il rischio al quale vengono esposte api che entrino in contatto con neonicotinoidi e fenilpirazoli (Desneux et al., 2007).

Tali studi includono test sulla tossicità nei confronti di larve allevate in vitro (Aupinel et al., 2005), test basati sul riflesso di estensione della proboscide (*PER*) per saggiare gli effetti sulle capacità di apprendimento e di formazione della memoria (Decourtye and Pham-Delegue, 2002), vari altri test comportamentali (Thompson, 2003), e studi sugli effetti dovuti all'esposizione cronica, rischio concreto legato alla sistemicità e persistenza degli insetticidi in oggetto (Suchail et al., 2001; Decourtye et al., 2005; Ailouane et al., 2009).

#### *Intossicazione cronica*

In uno studio di intossicazione cronica per 10 giorni, tutti i metaboliti dell'imidacloprid hanno mostrato uguale tossicità nei confronti delle api a dosaggi da 3.000 a 100.000 volte inferiori rispetto alla dose necessaria per produrre gli stessi effetti per intossicazione acuta. L'ingestione di nanodosi di imidacloprid o di uno dei suoi metaboliti per 8 giorni, per un totale di appena 0,1 ng/ape, ha provocato la morte del 50% delle api (Suchail et al., 2001). In altri studi della durata di 10 giorni, la DL50 per intossicazione orale cronica è stata osservata per l'ingestione cumulativa di 0,1-10 ng/ape (Suchail et al., 2000, 2002, 2004; Guez et al. 2001, 2003), in relazione al protocollo di esposizione (Bonmatin et al., 2005a, b)

La concentrazione media di imidacloprid in foglie fiori e polline di mais conciato è stata determinata in un approfondito studio (Bonmatin et al., 2003) rispettivamente in 4,1, 6,6, e 2,1 microgrammi/kg. Tenendo conto che il polline di mais rappresenta il 20-40% del fabbisogno proteico di un alveare, un consumo di 6 mg/giorno di polline espone le api ad un rischio mortalità per intossicazione cronica a 10 giorni molto elevato, poiché il rapporto PEC/PNEC (Probable Exposition Concentrations/Predicted No Effect Concentration) raggiunge un valore di 500-600 (per questo rapporto il valore 1 corrisponde alla soglia di rischio) (Bonmatin et al., 2003, 2004).

L'uso di neonicotinoidi come concianti per i semi di mais induce contaminazione del suolo (NTPN 1998, Bacey 2001) ed è stata dimostrata la possibilità di contaminazione delle colture successive e della flora spontanea in alcuni casi fino a due anni dopo la semina (Bonmatin et al. 2002, 2003)

Anche nel caso di fipronil, i suoi metaboliti (il derivato sulfonato ed il prodotto desulfilato, risultato della fotodegradazione) mantengono una elevatissima efficacia insetticida, simile a quella della molecola di partenza (test effettuati nei confronti della mosca domestica) e contribuiscono all'efficacia complessiva dell'insetticida nel garantire una lunga protezione alla coltura (Hainzl e Casida 1996). La dispersione di polveri durante la semina, e la loro deposizione consente il processo di fotodegradazione, con formazione di metaboliti ad azione insetticida.

### *Effetti sub letali sulle capacità cognitive (apprendimento e memoria degli odori, orientamento)*

Come discusso più sopra, la sistemicità e persistenza degli insetticidi in studio rendono possibili molte vie di contaminazione di suolo, acqua, flora spontanea, e di conseguenza del nettare e polline prodotti. Se le concentrazioni riscontrate negli studi riportati sopra determinano effetti di mortalità a bassissime dosi per via dell'esposizione cronica ripetuta, assunzioni dei p.a. in studio a dosaggi ancora inferiori (o per intervalli temporali più brevi) possono portare a effetti sulla fisiologia e sul comportamento, sui quali esiste ormai una vasta ed approfondita bibliografia (Erber et al., 1975a, b; Sandoz et al., 1995; Gerber et al 1998; Lambin et al, 2001; Pahn-Delegue et al., 2002; Decourtye et al, 2004; El Hassani et al. 2008; Maccagnani et al., 2008).

Lo studio del riflesso di estensione della ligula in presenza di odori associati alla somministrazione di liquidi zuccherini consente di verificare l'impatto degli insetticidi su alcuni processi cognitivi, come l'apprendimento e la memorizzazione di diversi tipi di stimoli ambientali (Decourtye e Pham-Delegue, 2002; Maccagnani et al., 2008).

Ne consegue che l'alterazione delle capacità di apprendimento associativo degli odori può essere assunto come indice di perturbazione delle capacità cognitive, in grado di alterare pesantemente la capacità delle api di svolgere le loro funzioni di bottinatrici e produrre un pericoloso disorientamento.

Per fipronil, un effetto è stato dimostrato utilizzando dosaggi da 0,075 a 0,15 ng/ape/giorno, che rappresentano rispettivamente 1/80 e 1/40 della DL50 secondo (Chauzat et al. 2006).

Nel corso delle sperimentazioni svolte nel 2009 nell'ambito del Progetto APENET, Scheda Api e Agrofarmaci, era già stato evidenziato come le quantità di insetticida contenuto nelle polveri disperse dalla seminatrice e ricadute a terra alla distanza di 5 m sono sufficienti a determinare un effetto su api che vi entrino ripetutamente in contatto. Tali effetti si manifestano con una ridotta capacità di riconoscere odori associati ad una ricompensa durante un apposito training, in difficoltà di orientamento, di riconoscimento dell'odore e nella riduzione delle funzioni connesse all'attività di bottinamento.

Poiché come è stato ampiamente riportato più sopra, la sistemicità e persistenza dei principi attivi e dei loro metaboliti rende possibile l'emissione degli stessi nel nettare e nel polline dei fiori, nel 2010 sono state condotte sperimentazioni sugli effetti determinati dall'ingestione di bassissime dosi dei suddetti p.a. su apprendimento e memoria degli odori e sull'orientamento in un labirinto semplice.

Tali sperimentazioni hanno dimostrato: 1. riduzione della capacità di riconoscere gli odori associati alla ricompensa per tutti i principi attivi, sia che si trattasse di odori tipici dei fiori (citronellolo) che l'odore della ghiandola di Nasonov oppure un componente del feromone della regina (si veda relazione 2010); 2. una significativa riduzione della capacità di riconoscere il colore (appreso durante l'addestramento) da utilizzare come riferimento per orientarsi nel labirinto e ad orientarsi in un labirinto semplice; 3. per clothianidin (l'unico p.a. per ora studiato) è stato dimostrato che una sola somministrazione del p.a. al dosaggio di 0,7 ng/ape compromette la capacità di tornare al nido, e a 0,47 ng/ape le api trattate possono tornare al nido ma non sono in grado per diverse ore di svolgere adeguatamente le funzioni di bottinamento.

Il programma di ricerche da svolgere nella primavera 2011 prevedeva di valutare:

1. l'effetto della contaminazione per contatto con le polveri disperse:

- a. effetto dell'esposizione a quantità di polveri ridotte del 90-95 % rispetto alla macchina non modificata su apprendimento e memoria degli odori (PER test) in ragione della messa a punto di un nuovo prototipo di deflettore sviluppato dal CRA-ING, che riduce significativamente la dispersione delle polveri. (Ricerca completata)
- b. valutare gli effetti della contaminazione con polveri sulle capacità di orientamento in labirinto semplice (Ricerca iniziata)

2. effetti di somministrazione per ingestione di nanodosi di clothianidin sulle capacità di orientamento (ritorno all'alveare), sul comportamento in alveare e sulla frequenza di bottinamento in api libere. Poiché non sono noti dati riguardo alle concentrazioni riscontrabili nel nettare o nel polline di piante spontanee contaminate durante la semina, si è deciso di utilizzare dosi sub letali crescenti secondo diversi protocolli, e di studiarne gli effetti sulla capacità di orientamento (Ricerca completata per 1 protocollo di somministrazione di clothianidin).

Le dosi per ape somministrate per ingestione sono state stabilite a partire da dati bibliografici relativi alla DL50 orale ed applicando successive diluizioni, fino a raggiungere il dosaggio al quale non venivano compromesse la vitalità e le capacità motorie delle api.

Le quantità di clothianidin somministrate alle api per ingestione (da 0,092 ng/ape a 0,552 a seconda del protocollo di trattamento) sono paragonabili alle quantità utilizzate negli studi sulla tossicità cronica e riteniamo siano paragonabili (o almeno dello stesso ordine di grandezza) a quelle assunte attraverso la cuticola nelle ricerche sugli effetti del contatto con le polveri sull'apprendimento degli odori (PER test) (3,31 ng di clothianidin in gabbietta con 10 api).

### *Bibliografia citata*

- Aupinel P., Fortini D., Dufour H., Tasei J-N., Michaud B., Odoux J-F., Pham-Delegue M-H., 2005 - Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae.- Bulletin of Insectology, 58 (2): 107-111.
- Bacey, J. 2001. Environmental Fate of Imidacloprid in Environmental Monitoring & Pest Management Branch, Dept. Pest. Reg., Sacramento, CA. pp 1-8 <http://www.cdpr.ca.gov/docs/empm/pubs/fatememo/imid.pdf>.
- Bonmatin, J. M.; Charvet, R.; Colin, M. E., 2003 - Presence of systemic pesticide imidacloprid in crops and risk to nontargeted insectspecies. In Proceeding of the 3rd Mediterranean Group of Pesticide Research; Cabras, P., Montury, M., Cooper, J., Eds.; Aix en Provence: France, 2003; p. 9.
- Bonmatin, J. M.; Marchand, P. A.; Charvet, R.; Colin, M. E., 2003 - Fate of systemic insecticides in fields (imidacloprid and fipronil) and risks for pollinators. In Proceeding of the First European Conference of Apidology (Eurbee); Bernardinelli, I., Milani, N., Eds.; A. G. F.: Udine, Italy, 2004; p 118 (<http://www.uniud.it/eurbee/Proceedings/FullPapers/Bonmatin-extended.pdf>).
- Bonmatin, J. M., Moineau, I., Charvet, R., Fléché, C., Colin, M. E., Bengsch, E. R. 2003 - A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants and in pollens. Anal. Chem., 75, 2027-2033
- Bonmatin, J. M., 2002 - Insecticide et pollinisateurs: une dérive de la chimie? Sciences, 2 : 42-46.
- Bonmatin J. M., Marchand P. A., Charvet R., Moineau I., Bengsch E. R., Colin M. E., 2005a - Quantification of imidacloprid uptake in maize crops.- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 5336-5341.
- Bonmatin J. M., Moineau I., Charvet R., Colin M. E., Fleche C., Bengsch E. R., 2005b - Behaviour of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees, pp. 483-494. In: Environmental chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems (Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D., Eds). Springer-verlag, Berlin, Germany.
- Chauzat M.P., Faucon J.P., Martel A.C., Lachaize J., Cougoule N., Aubert M., 2006. A Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France J. Econ. Entomol., 99(2): 253-262 .
- Decourtye A., Pham-Delègue M. H., 2002 – The proboscis extension response: assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee. In: Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals (Devillers J. and Pham Delègue M. H., Eds), Taylor and Francis, London and New York: 67-84.

- Decourtye A., Armengaud C., Renou M., Devillers J., Cluzeau S., Gauthier M., Pham-Délégué M.H., 2004 - Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.) *Pest Biochem Physiol.*, 78: 83–92.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J. M., 2007 - The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods.- *Annual Review of Entomology*, 52: 81-106.
- El Hassani A. K., Dacher M., Gary V., Lambin M., Gauthier M., Armengaud C., 2008 - Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*) *Arch Environ Contam Toxicol*. DOI 10.1007/s00244-007-9071-8
- EPA 2003. Review. Honey Bee - Acute Contact & Oral LC50 Test; 141-1. DP Barcode: D278110  
MRID No: 45422426. Valerie Hodge. Environmental Risk Branch.
- EPPO/OEPP, 1992. Guideline on test methods for evaluating the side-effects of Plant Protection Products on Honeybees. *EPPO Bulletin*, 22: 203-215.
- Erber J., 1975a - The dynamics of learning in the honeybee (*Apis mellifica carnica*). I. The time dependence of the choice reaction. *J. Comp. Physiol.*, A 99: 231–242.
- Erber J., 1975b - The dynamics of learning in the honeybee (*Apis mellifica carnica*). II. Principles of information processing. *J. Comp. Physiol.* A, 99: 243–255.
- Gerber B., Wustenberg D., Schutz A., Menzel R., 1998 - Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: nonmonotonous effects of the training trial interval. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 69: 71–78.
- Gunasekara A.S., Tresca T., Goh K.S., 2006 - Environmental fate and toxicology of fipronil. *J. Pest. Sci.*, 32: 189-199.
- Guez, D., Belzunces, L. P., Maleszka, R. 2003 - Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differently expressed during adult development. *J. Pharmacol. Biochem. Behav.*, 75: 217-222.
- Guez D., Suchail S., Maleska R. Gauthier, M., Belzunces L. P., 2001 - Contrasting effect of imidacloprid on habituation in 7-day and 8-day old honeybees. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 76, 183-191.
- Gupta S., Gajbhiye V. T., Kalpana-Agnihotri N. P., 2002 - Leaching behaviour of imidacloprid formulation in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68: 502-508.
- Hainzl D., J. E. Casida., 1996 - Fipronil insecticide: novel photochemical desulphylation with retention of neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12764-12767.
- Jeschke P., Nauen R., 2008 – Neonicotinoids - from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64: 1084–1098.
- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J. T., Roe R. M., 2004 - Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.*, 23 (5): 371–378.
- Lambin M., Armengaud C., Raymond S., Gauthier M., 2001 - Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 4: 129–134.
- Maccagnani B., Ferrari R., Zucchi L., Bariselli M., 2008 - Difendersi dalle cavellette, ma tutelare le api. *Informatore Agrario*, 25: 2-5.
- Nguyen B. K., Saegerman C., Pirard C., Mignon J., Wdart J., Thirionet B., Verheggen F. J., Berkevans D., De Pauw E., Haubruge E., 2009 - Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *Journal of Economic Entomology*, 102 (2): 616-623.
- NPTN (National Pesticide Telecommunications Network). 1998. Imidacloprid pp. 1-4 (<http://npic.orts.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>).
- Pham-Délégué M.H., Decourtye A., Kaiser L., Devillers J., 2002 - Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, 33: 425–432.
- Sandoz J.C., Roger B., Pham-Délégué M.H. 1995 - Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response, *C. R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie* 318: 749–755.
- Schmuck R., Schoening R., Stork A., Schramel O., 2001 - Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag. Sci.* 57: 225–238.
- Suchail S., Guez D., Belzunces L. P. 2000 - Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1901-1905.
- Suchail S. V., Guez D., Belzunces L. P., 2001 - Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 (11): 2482–2486.
- Suchail S., Debrauwer L., Belzunces L. P., 2003 - Metabolism of Imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manage. Sci.* 60: 291-296.

Suchail S., De Sousa G., Rahmani R., Belzunces L. P., 2004 - In vivo distribution and metabolisation of <sup>14</sup>C-Imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera*. Pest Manage. Sci., 60: 1056-1062.



## 6.2 Effetti della contaminazione per contatto con polveri a ridotto contenuto di neonicotinoidi e fipronil su apprendimento/memoria olfattiva - *PER* test

### 6.2.1 Materiali e metodi

**Alveari, numero api, ripetizioni:** E' stato utilizzato un solo alveare (lo stesso alveare B utilizzato nel 2010). Sono state effettuate ad oggi 5 ripetizioni di testimoni non trattati, 4 di imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin e di fipronil.

**Cattura:** le api sono state catturate in apposite gabbiette di plexiglass aventi come fondo una piastra Petri del diametro di 8 cm (10 api per gabbietta). Ogni gabbietta possedeva una siringa, adattata ad alimentatore, già al momento della cattura.

**Principi attivi utilizzati:** imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam e fipronil.

**Concentrazioni e quantità di p.a. utilizzati per la contaminazione:** le polveri per le sperimentazioni sono state estratte, con l'ausilio del cilindro Heubach, presso il CRA-ING di Roma, da partite di semi concianti forniti da Assosementi .

Per calcolare la quantità di polvere da testare ci si è riferiti al contenuto in principio attivo delle polveri disperse da una seminatrice a punto fisso portante il deflettore brevettato presso il CRA-ING di Monterotondo, che ha consentito la riduzione - in percentuale diversa a seconda del conciante - della quantità di p.a. disperso rispetto alla macchina non modificata.

Le quantità di principio attivo per superficie utilizzate nelle nostre ricerche, pari a quelle ricadute a 5 m dal campo di semina utilizzando la seminatrice con modifica messa a punto dal CRA-ING, sono riportate in Tabella 33, e sono state calcolate secondo il seguente procedimento:

1) Tenendo conto della concentrazione di p.a. rilevata a 5 metri nelle prove effettuate dal CRA-ING di Roma nel 2010 utilizzando la macchina non modificata e dei risultati di abbattimento delle polveri dell'80-90% ottenuti con il deflettore messo a punto nel 2011, è stato possibile calcolare la concentrazione di p.a. per m<sup>2</sup>, pari al 10-20% di quella dispersa dalla macchina non modificata.

2) Sapendo che la superficie totale della gabbietta misura 56,72 cm<sup>2</sup> è stata effettuata una proporzione per determinare la quantità di ciascun p.a. da introdurre nella gabbietta in modo da ottenere la stessa concentrazione per unità di superficie.

3) Sul fondo di ogni gabbietta (costituito da una capsula Petri) è stata distribuita una quantità di talco contaminato pari a 0,01 g.

**Tabella 33** - Calcolo dosi utilizzate per la prova di contaminazione per contatto in gabbietta.

| Principio attivo | p.a. ricaduto a 5 m macchina non modificata (µg/m <sup>2</sup> ) | P.a. da saggiare (µg/m <sup>2</sup> ) |          | Quantità di p.a. per gabbietta (µg) |
|------------------|--|---------------------------------------|----------|-------------------------------------|
|                  |  | % massima                             | quantità |                                     |
| Clothianidin     | 11,57  | 20%                                   | 2,314    | 0,00331                             |
| Thiamethoxam     | 6,88   | 10%                                   | 0,688    | 0,00197                             |
| Imidacloprid     | 16,01  | 10%                                   | 1,601    | 0,00458                             |
| Fipronil         | 1,157  | 10%                                   | 0,1157   | 0,000662                            |

La miscelazione delle polveri estratte dall'Heubach con talco per ottenere le quantità di p.a./superficie da utilizzare è stata effettuata presso il DiSTA.

In ciascuna gabbietta sono state poste 10 api.

**Modalità di contaminazione con il principio attivo:** gruppi di 10 api sono state catturate in uscita dall'alveare e collocate nelle gabbiette. Il fondo di ogni gabbietta è stato poi sostituito con una capsula Petri sulla quale era stata distribuita la quantità di p.a. stabilita. Ogni unità sperimentale è stata mantenuta per 3 ore (dalla somministrazione del prodotto) in un incubatore a 26 °C al buio.

**Preparazione delle api per il PER:** al termine del trattamento, ogni ape è stata indotta ad entrare in un piccolo contenitore ricavato da puntali per pipette Gilson e immobilizzata in modo che solo il capo fosse in grado di muoversi.

**Training:** il training ha avuto inizio con l'abituazione dell'ape ad un flusso d'aria per 25 secondi, cui sono seguite 12 prove (distanziate tra loro di 12 minuti) in cui sono stati presentati due odori, citronello e menta piperita, associati rispettivamente alla ricompensa (soluzione zuccherina al 40%, "Z") e alla punizione (soluzione salina satura, "S") con la sequenza *semirandom ZZSZSSZZSSZS*.

Gli odori (un frammento di carta assorbente imbevuto con 3 microlitri dell'odore) erano collocati in una siringa da 5 ml a cui era stato tolto lo stantuffo. La siringa modificata veniva quindi appoggiata all'ugello di emissione dell'aria del compressore in modo da raccogliere il flusso in uscita, che passava per l'interno della siringa ed usciva dall'apertura della siringa veicolando l'odore.

La presentazione dello stimolo premiato si è svolta come segue: si è presentato l'odore premiato nel flusso d'aria per 6 secondi; passati i primi 3 secondi si sono toccate le antenne dell'ape con una soluzione zuccherina al 40% e, all'estensione della ligula, insieme all'odore è stata offerta all'ape la ricompensa per 3 secondi. La presentazione dello stimolo punito è avvenuta nello stesso modo.

**Test:** Il test di riconoscimento degli odori tramite *PER* è stato eseguito dopo 60', 180' e a 24h, rispetto all'ultima prova del training. Ogni test è consistito in 1 prova in cui all'ape venivano presentati in successione l'odore premiato e quello associato alla punizione. Durante le presentazioni all'ape non veniva offerta né la ricompensa né la punizione.

Ogni risposta è stata classificata nelle seguenti categorie:

1. Corretta: risposta solo all'odore premiato e non a quello punito
2. Parzialmente corretta: risposta ad entrambi
3. Parzialmente sbagliata: nessuna risposta
4. Sbagliata: risposta solo all'odore punito e non a quello premiato

Le api sono state nutrite al termine del test a 180' con una goccia da 30 µl per ape.

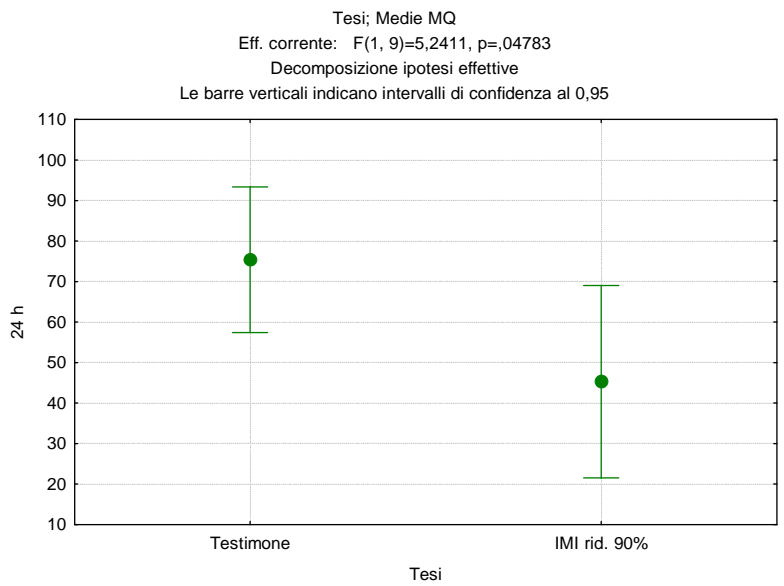
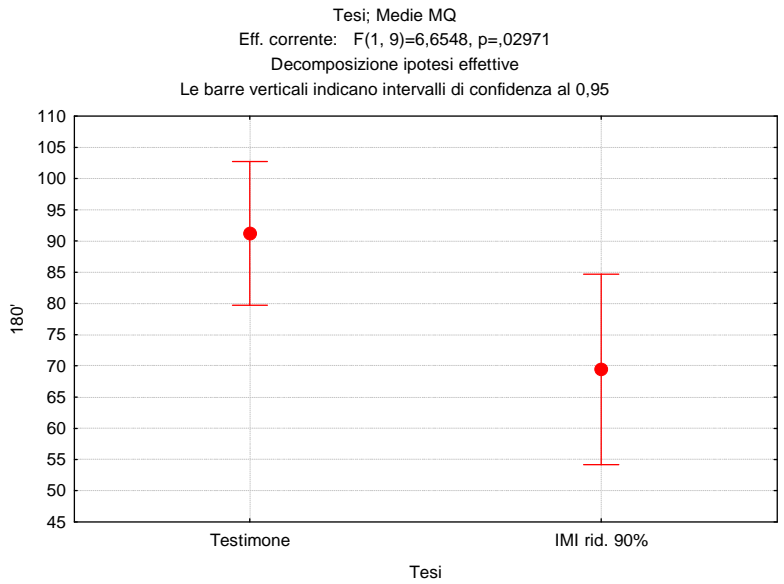
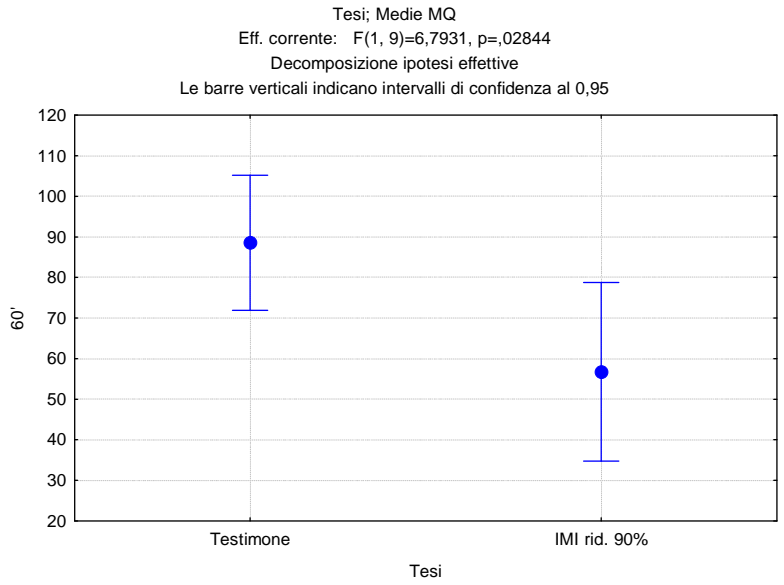
**Vitalità al termine del test:** dopo il test a 24 h le api sono state liberate in una gabbia di volo per rilevare i dati di vitalità legati alle funzionalità motorie. Sono stati registrati i seguenti comportamenti: vola (V); cammina (C); rantola (R) .

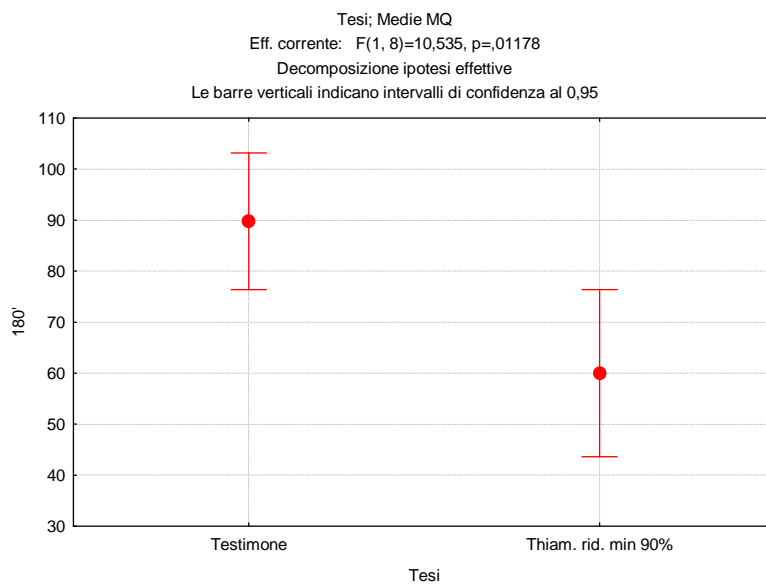
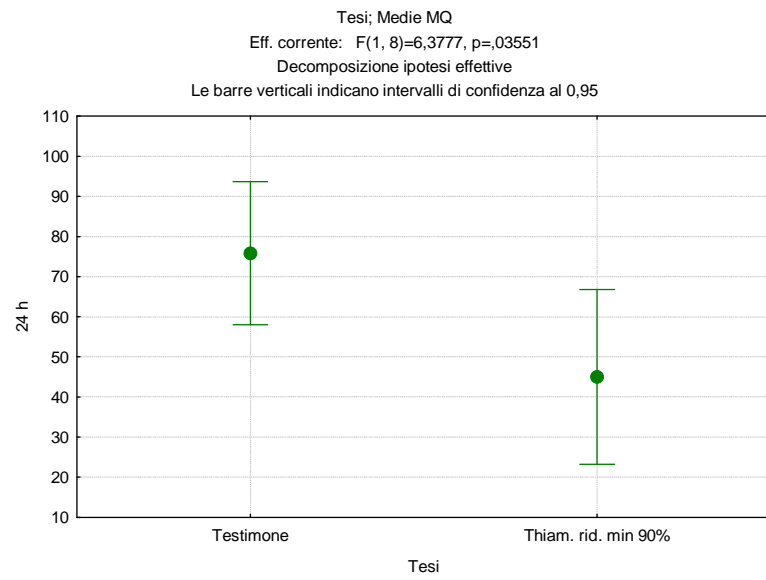
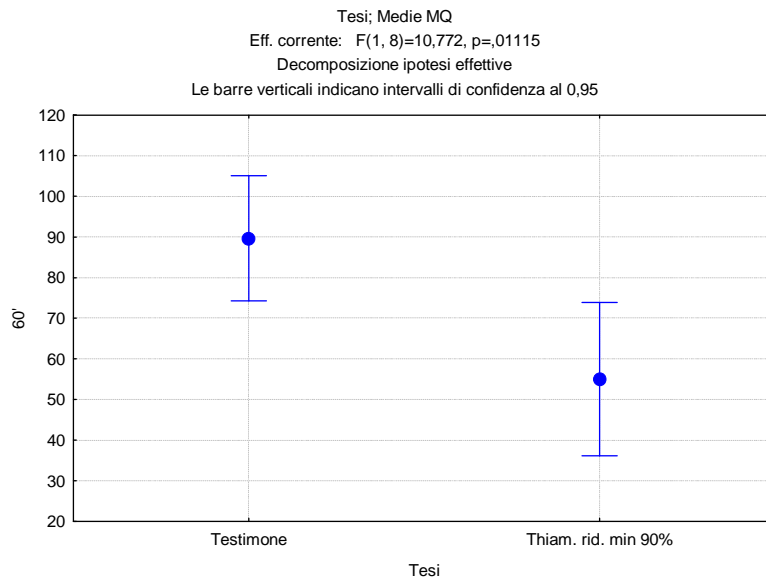
**Analisi dei dati:** ad oggi è stata condotta un'analisi per confrontare la percentuale di api che hanno risposto correttamente alla presentazione degli odori ai crescenti intervalli di tempo (60', 180', 24h) attraverso ANOVA ad 1 via considerando la tesi come fattore di variabilità.

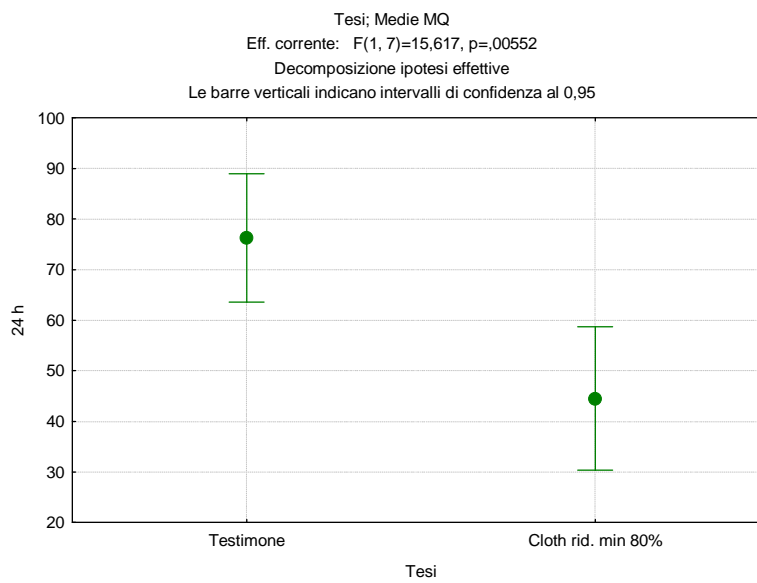
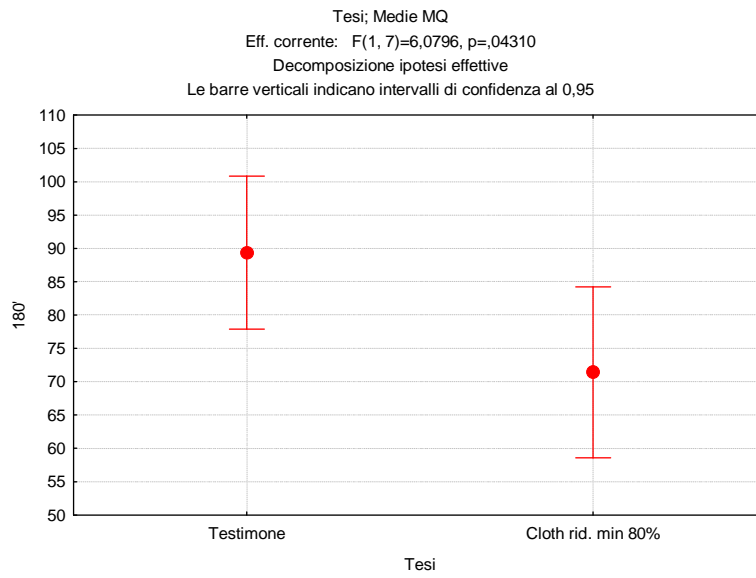
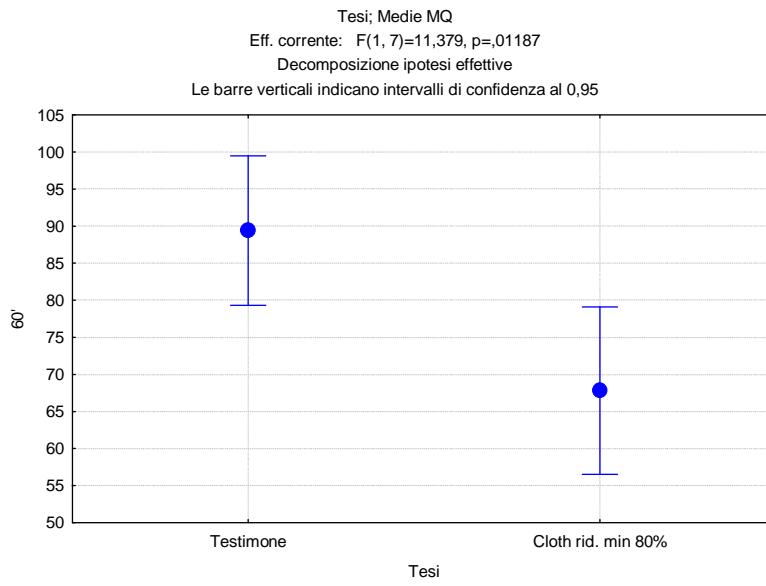
### **6.2.2 Risultati**

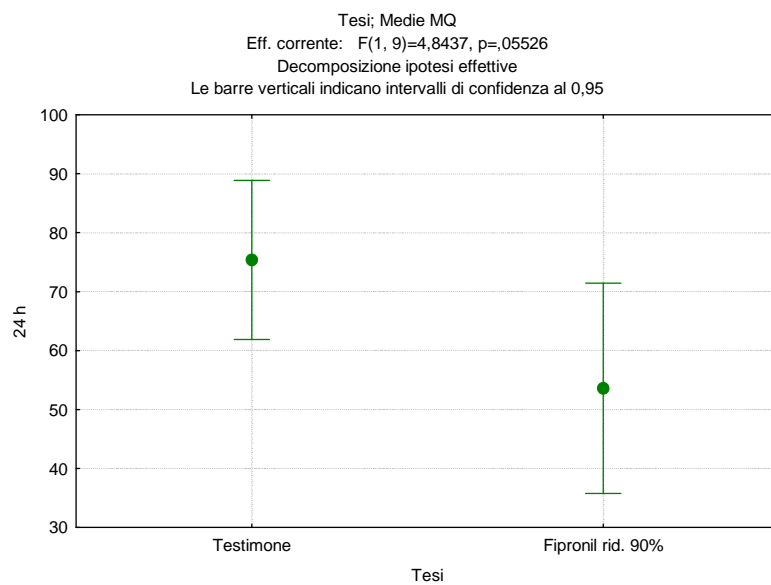
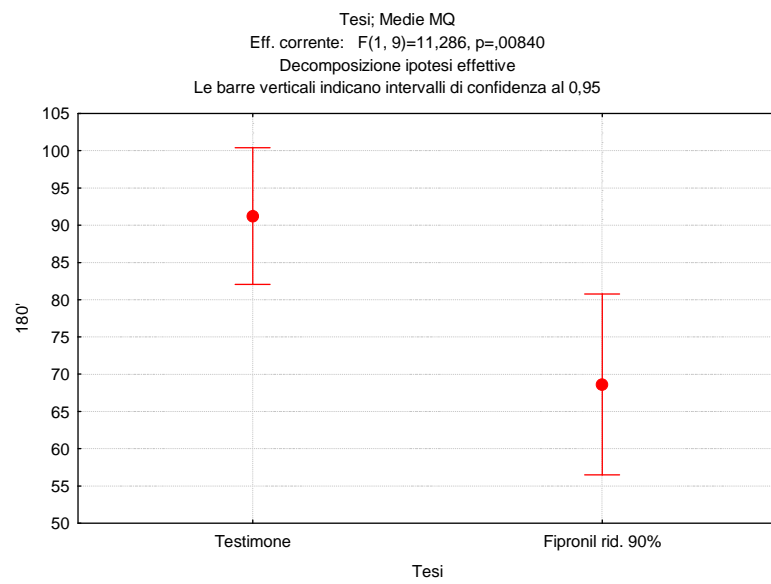
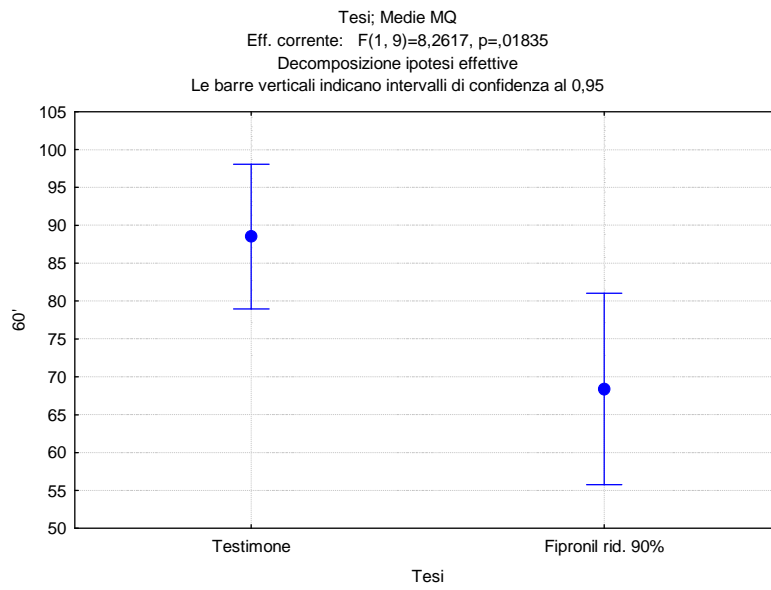
I risultati delle sperimentazioni finora condotte sono riportate nei grafici seguenti, che rappresentano la percentuale di risposte corrette (C+M- estensione della ligula solo in presenza dell'odore di citronello, premiato durante l'addestramento, e non della menta) registrate per le api entrate in contatto con imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin e fipronil.

Il contatto con polveri contenenti il 10% di imidacloprid, thiamethoxam e fipronil (rispetto alla quantità dispersa dalla seminatrice non modificata) compromette la capacità di riconoscere gli odori già dopo 60' (memoria a breve termine) e a 180' (memoria a medio termine), oltre che a 24 h (memoria a lungo termine). A quest'ultimo controllo il livello di significatività statistica per le api trattate con fipronil si è assestato a  $p = 0,055$  . Un risultato analogo si è osservato per le api entrate in contatto con polveri contenenti al massimo il 20% di clothianidin rispetto alla seminatrice non modificata.









## 6.3 Effetti della contaminazione con polveri contenenti thiamethoxam sulla capacità di orientamento in un labirinto semplice e sul riconoscimento dei colori

### 6.3.1 Materiali e metodi

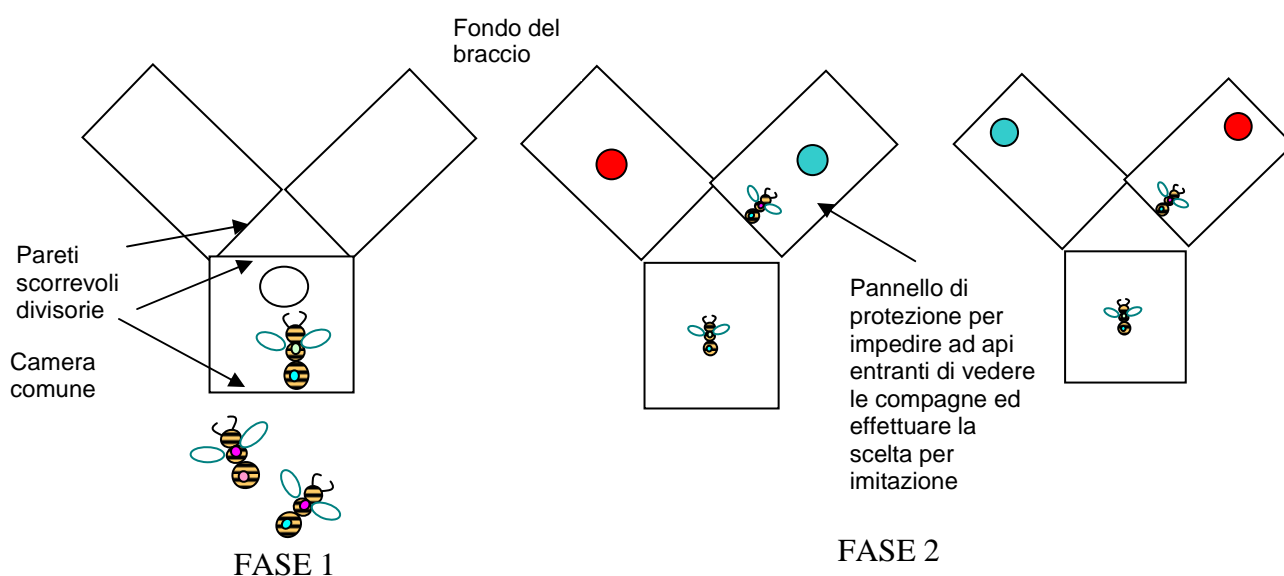
**Alveari, numero api, ripetizioni:** Il piano della sperimentazione prevedeva di eseguire 3 ripetizioni di 10 api ciascuna. Per mancanza di tempo non è stato possibile completarla ed è stato studiato il comportamento di sole 4 api.

**Modalità di indagine:** Un alveare composto di un solo telaino con regina e covata (riscaldato per mantenere una temperatura adeguata) è stato collegato ad una camera di volo posta all'esterno. Le bottinatrici sono state indotte a cercare una ricompensa zuccherina presso un labirinto ad Y collegato alla camera di volo all'estremità opposta dell'alveare.

**Fase 1: addestramento preliminare e marcatura individuale:** addestramento libero e di gruppo nell'anticamera del labirinto a Y (Figura 29), utilizzando soluzione zuccherina al 40 % posta in un contenitore non colorato. Marcatura di un gruppo di api ed esclusione dei soggetti restanti dalle successive fasi (cattura in apposita gabbia).

**Fase 2: addestramento a orientarsi nel labirinto utilizzando il colore.** Utilizzando un alimentatore con il coperchio azzurro contenente soluzione zuccherina al 40 % (= ricompensa), ed uno rosso contenente soluzione salina satura (= punizione) venivano consentite alle api: 6 visite ai due bracci (distanza dalla camera di scelta al fondo dei bracci = 20 cm). La posizione del colore associato al premio (o alla punizione) veniva assegnata secondo una sequenza semirandom (SDSSDD oppure DSDDSS). Ad ogni visita veniva annotato l'orario di arrivo del soggetto ed il lato di prima scelta.

**Cattura e contaminazione con polveri contenenti thiamethoxam.** Le api venivano catturate durante l'ultima visita dell'addestramento, dopo che si erano posate sull'alimentatore corretto ma prima di iniziare ad alimentarsi. Se il numero delle api che avevano compiuto l'addestramento era inferiore a 10, venivano prelevate dalla camera di volo le bottinatrici mancanti, in modo da riprodurre la modalità di contaminazione descritta nel paragrafo dedicato alla contaminazione da contatto con le polveri (vedi sopra). I soggetti sono stati mantenuti all'interno della gabbietta di contaminazione per 3 ore a 26°C al buio.



**Figura 29** - Schema del training per l'associazione della ricompensa al colore azzurro, stimolo visivo scelto per addestrare le api ad orientarsi correttamente nel labirinto a Y. Api marcate con colori su torace e addome. Fase 1 e 2 : vedi testo.

**Test a 1 h:** dopo le 3 ore di permanenza nella gabbietta di contaminazione le api sono state liberate una per volta nella camera di volo, e ogni ape aveva 5 minuti di tempo per entrare nel labirinto. Se dopo 5 minuti l'ape non era entrata, veniva accompagnata nella camera comune, ed disponeva di ulteriori 5 minuti per scegliere il braccio con il colore corretto.

Il test è consistito in due visite alternate ai bracci. Per ogni ape è stata annotata l'ora di ogni visita e il comportamento nei confronti degli alimentatori: V = vola all'interno del braccio senza posarsi sull'alimentatore; N = si nutre, ovvero atterra sull'alimentatore ed estroflette la ligula in corrispondenza dei fori; A = atterra sull'alimentatore senza tentare di nutrirsi.

Indipendentemente dal colore (cioè dal braccio) scelto, l'ape non aveva la possibilità di spostarsi nell'altro braccio in caso di scelta errata (scelta non correttiva). Essa veniva infatti catturata con un barattolo e rimessa nella camera di volo per poter effettuare una seconda visita, con le stesse modalità della prima.

Dopo le due visite, l'ape veniva catturata, introdotta in un puntale Gilson, nutrita a sazietà con soluzione zuccherina al 40% e mantenuta in cella buia a 26°C fino allo scadere delle 24 ore dalla fine della fase di contaminazione.

**Test a 24 h:** i soggetti sono stati liberati dopo 24 h dalla contaminazione e sono stati sottoposti al test 2 secondo le modalità descritte per il Test a 60'.

### 6.3.2 Risultati

La sperimentazione è appena cominciata e sono state sottoposte a trattamento 4 api, i cui risultati sono riportati in Tabella 34.

Le api non hanno avuto alcuna difficoltà ad associare il colore alla ricompensa, compito che è notoriamente molto semplice per le api, per cui tutte le api avevano imparato a seguire correttamente lo spostamento dell'alimentatore corretto (colore azzurro) da un braccio all'altro del labirinto. Tuttavia i dati riportati in tabella indicano una notevole difficoltà a recuperare la memoria corretta del colore associato alla ricompensa nelle api trattate per contaminazione con le polveri di thiamethoxam.

Come si vede, le percentuali di scelta corretta sono al di sotto del 50%, e, seppure in via preliminare, tenendo conto del numero basso di api sottoposte al test, sembrano indicare che gli individui trattati con thiamethoxam recuperino la memoria del colore sbagliato al momento di effettuare la scelta.

**Tabella 34** - Numero di scelte corrette effettuate durante il test. Ogni ape disponeva di due tentativi.

| Ape               | Test a 3 h | Test 24 h |
|-------------------|------------|-----------|
| Ape 1             | 2          | 1         |
| Ape 2             | 0          | 0         |
| Ape 3             | 1          | 1         |
| Ape 4             | 0          | 0         |
| Percentuale media | 37,5 %     | 25,5 %    |

## 6.4 Effetti dell'ingestione di nanodosi di clothianidin e fipronil sulle capacità di *homing* e sul comportamento di bottinatrici all'alveare

La sperimentazione è stata condotta utilizzando clothianidin, per completare la sperimentazione avviata nel 2010 in cui due gruppi di api erano state sottoposte a trattamento per ingestione rispettivamente con 0,7 e 0,47 ng/ape di clothianidin. Tale sperimentazione aveva mostrato una forte compromissione della capacità di ritorno al nido e della frequenza di bottinamento dopo 1 sola ingestione delle dosi sopra citate.



### 6.4.1 Materiali e metodi

Le api di un alveare con pareti a vetro, costituito da 6 telaini di cui 2 di covata, sono state addestrate a cercare la soluzione zuccherina al 40 % da un dispenser artificiale. Le api sono state marcate ed il dispenser è stato gradualmente spostato a 150 m dal nido.

Le frequenze di volo delle api in andata e ritorno dal dispenser sono stati misurati per 40 minuti prima del trattamento. Le api che mostravano una frequenza assidua al dispenser sono state scelte per la sperimentazione con l'obiettivo di raggiungere il numero di 10 api per ciascuna modalità di trattamento e per il testimone.

La cattura degli individui è stata effettuata alla postazione dispenser dopo che l'ape aveva cominciato a nutrirsi della soluzione zuccherina, in modo che la sua motivazione fosse quella di tornare al nido e comunicare alle compagne la posizione del dispenser.

Dopo la cattura, ogni ape è stata introdotta in un puntale per pipette Gilson 1000 la cui punta era stata tagliata, ed è stato somministrato il trattamento. I diversi protocolli di assunzione del p.a. sono riassunti in Tabella 35.

**Tabella 35** - Protocolli di somministrazione di clothianidin per ingestione.

|              | Concentrazione p.a. (ng/μl) | Quantità di p.a. somministrato (ng/ape) | Quantità di soluzione zuccherina utilizzata per la somministrazione | N. somministrazioni       | Consentita ulteriore assunzione di soluzione zuccherina non contaminata per riempire la borsa melaria | Trattamento dell'ape nel puntale | N. api trattate/ Testimone |
|--------------|-----------------------------|---|---|---------------------------|---|----------------------------------|----------------------------|
| Protocollo 1 | 0,0184                      | 0,092                                   | 5 microlitri  | 3-12 in viaggi successivi | si  | No                               | 12/15                      |
| Protocollo 2 | 0,092                       | 0,47                                    | 5 microlitri  | 1                         | no  | Si                               | 9/10                       |
| Protocollo 3 | 0,092                       | 0,47                                    | 5 microlitri  | 3 in viaggi successivi    | no  | Si                               | 4/0                        |
| Protocollo 4 | 0,0184                      | 0,552                                   | 30 microlitri   | 3                         | no  | Si                               | 1/0                        |

#### *Protocollo 1*

Questo protocollo prevedeva la somministrazione di una dose di 0,092 ng/ape in 5 microlitri di soluzione zuccherina al 40 %, lasciando la possibilità di riempire la borsa melaria con zucchero non contaminato, simulando la contaminazione a bassissime dosi solo di una parte dell'areale di bottinamento dell'ape, e lasciando svuotare immediatamente il nettare raccolto, limitando quindi al minimo l'assunzione immediata. Dopo ogni somministrazione, infatti, l'ape veniva subito liberata, e ad ogni successivo ritorno all'alimentatore essa veniva nuovamente catturata per una ulteriore somministrazione, e si è proseguito in questo modo fintanto che l'ape riusciva a tornare al punto di alimentazione.

In questa prova sono state registrate solo le frequenze di visita all'alimentatore e la presenza al nido, senza effettuare videoregistrazioni.

Le api testimoni sono state catturate lo stesso numero di volte delle api trattate ed è stato somministrata loro soluzione zuccherina non contaminata.

#### *Protocolli 2 e 3*

Questi protocolli prevedevano la somministrazione di una dose di 0,47 ng/ape in 5 microlitri una tantum (Protocollo 2) o fino a 3 volte (Protocollo 3), mantenendo l'ape nel puntale dopo il trattamento, (per simulare un viaggio di bottinamento di media durata) e senza lasciare completare il riempimento della borsa melaria con soluzione zuccherina non contaminata; tale modalità simula una situazione di campo in cui tutto l'areale di bottinamento di quell'ape è contaminato. È stato seguito il comportamento di ogni individuo al dispenser e al nido dopo 1, 3 e 24 ore, annotando la frequenza ed i tempi dei voli di ritorno e filmando (quando possibile) il comportamento al nido per

3 volte (durata 5 minuti). Sono stati annotati contestualmente i principali comportamenti (scarica il nettare, danza, trofallassi, cammino, immobilità, uscita). Le api non trattate hanno subito lo stesso numero di catture delle trattate, con somministrazione di soluzione zuccherina non contaminata.

#### *Protocollo 4*

Questo protocollo prevedeva la somministrazione di una dose di 0,552 ng/ape in 30 microlitri di soluzione zuccherina al 40%, una quantità tale da riempire la borsa melaria, e lasciando svuotare la borsa melaria una volta fatto ritorno al nido. Tale modalità simula la contaminazione a bassissime dosi di tutto l'areale di bottinamento e considera un tempo minimo per completare il volo di raccolta da piccole fonti sparse ad una distanza breve dall'alveare.

#### **6.4.2 Risultati**

Per l'insufficiente durata del progetto, non è stato possibile completare tutti i protocolli. Si sono completati i protocolli 1 e 2. L'esame delle riprese video è in corso.

Le osservazioni condotte al momento del rilascio dopo il trattamento e al nido hanno messo in evidenza comportamenti normali per le api non trattate (volo diretto verso il nido, scarico del nettare, interazioni e scambio di cibo con le compagne, uscita e ritorno immediato al dispenser per una nuova raccolta). I risultati delle prove sono riportati nelle tabelle e nei grafici che seguono.

**Tabella 36** - Frequenze di ritorno alla fonte di alimentazione di api trattate secondo il protocollo 1.

| P.A.              | Ape            | Frequenza visita in alimentatore in 40' pre-trattamento | N. assunzioni della nanodose sopportati dall'ape nella giornata | Presenza all'alveare dopo 24 h |
|-------------------|----------------|---|---|--------------------------------|
| CLOT 0,092 prot 1 | RosaVerde      | 2   | 5   | no                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | RosaGialla     | 3   | 10  | no                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | Multicolor     | 5   | 3   | no                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | RosaBlu        | 3   | 10  | no                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | RosaViola      | 4   | 12  | no                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | ArancioArancio | 5   | 8   | no                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | Viola Bianca   | 4   | 10  | Si                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | Rosa Bianca    | 5   | 5   | Si                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | Viola Rosa     | 3   | 5   | No                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | Verde Arancio  | 1   | 6   | No                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | Verde Rosa     | 3   | 4   | No                             |
| CLOT 0,092 prot 1 | Gialla Verde   | 5   | 7   | No                             |
|                   | <b>Media</b>   | <b>3,5</b>  | <b>6,29</b>   | <b>2/12 (16,7%)</b>            |
| Testimone         | ArancioBlu     | 5   | 16  | si                             |
| Testimone         | VerdeArgento   | 3   | 33  | si                             |
| Testimone         | ViolaViola     | 5   | 22  | si                             |
| Testimone         | ViolaVerde     | 4   | 31  | si                             |
| Testimone         | ViolaGiallo    | 4   | 17  | si                             |
| Testimone         | ViolaGiallo2   | -   | 20  | si                             |
| Testimone         | Violabianco    | 3   | 21  | si                             |
| Testimone         | ViolaRosa      | 2   | 19  | si                             |
| Testimone         | Blu Rosa       | 6   | 2   | si                             |
| Testimone         | Verde Blu      | 4   | 14  | no                             |

|           |              |             |             |                      |
|-----------|--------------|-------------|-------------|----------------------|
| Testimone | Verde Bianca | 2           | 25          | si                   |
| Testimone | Verde Verde  | 3           | 2           | si                   |
| Testimone | Verde Viola  | 4           | 34          | si                   |
| Testimone | Rosa Verde   | 1           | 24          | si                   |
| Testimone | Viola Verde  | 1           | 27          | no                   |
|           | <b>Media</b> | <b>3,13</b> | <b>20,5</b> | <b>13/15 (86,7%)</b> |

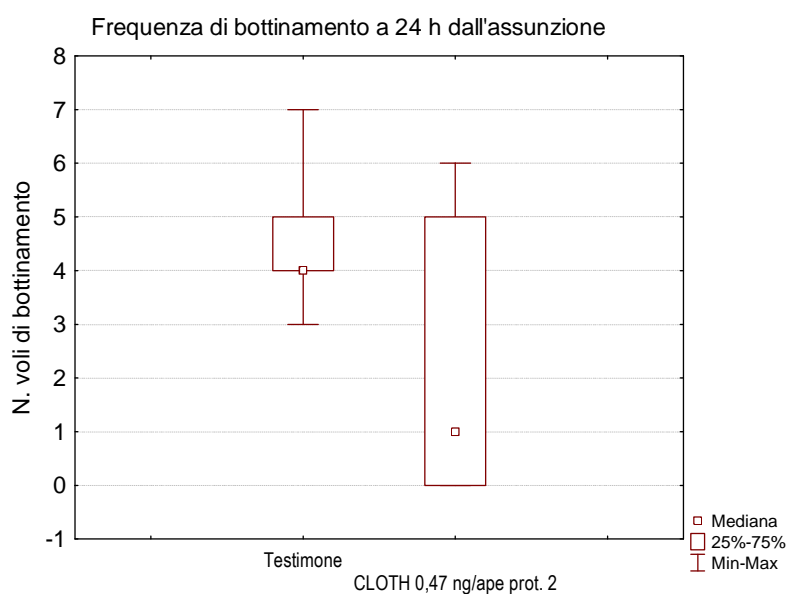
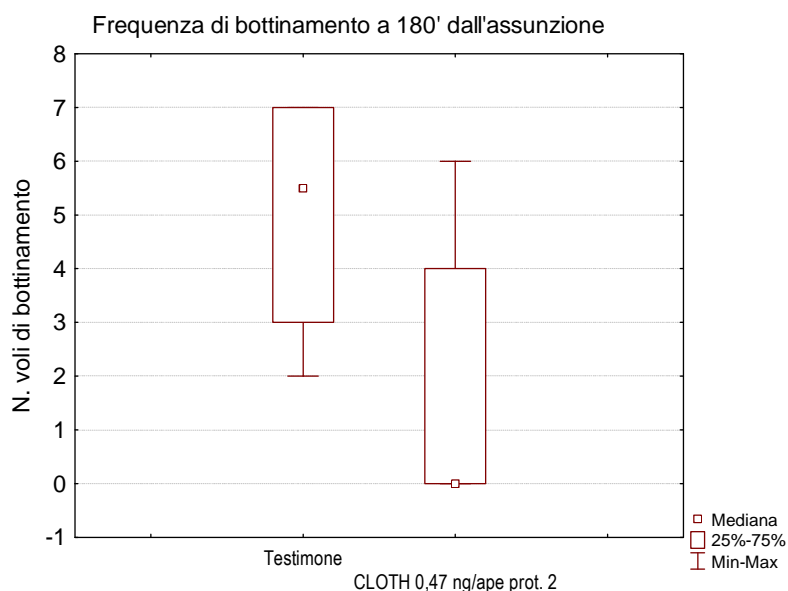
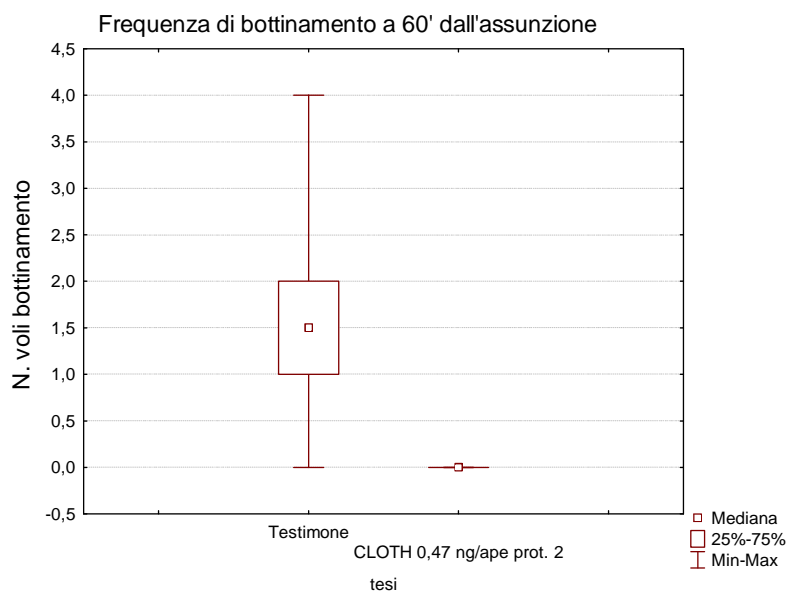
**Tabella 37** - Frequenze di ritorno alla fonte di alimentazione di api trattate secondo il protocollo 2.

| P.A.              | Ape           | Frequenza visita in alimentatore in 40' pre-trattamento | Dosi sommini-strate | Freq. 1 h  | Freq. 3 h  | Freq. 24 h |
|-------------------|---------------|---|---------------------|------------|------------|------------|
| Testimone         | Gialla gialla | 4   | 0                   | 0          | 2          | 4          |
| Testimone         | GiallaArancio | 2   | 0                   | 1          | 6          | 3          |
| Testimone         | FuxiaRosa     | 4   | 0                   | 2          | 3          | 4          |
| Testimone         | FuxiaBlu      | 5   | 0                   | 1          | 4          | 5          |
| Testimone         | FuxiaGialla   | 4   | 0                   | 2          | 7          | 7          |
| Testimone         | FuxiaVerde    | 5   | 0                   | 3          | 5          | 5          |
| Testimone         | ViolaVerde    | 3   | 0                   | 2          | 2          | 4          |
| Testimone         | BluGialla     | 5   | 0                   | 1          | 7          | 4          |
| Testimone         | BluRosa       | 4   | 0                   | 1          | 7          | 6          |
| Testimone         | Multicolor    | 6   | 0                   | 4          | 7          | 4          |
|                   | <b>Media</b>  | <b>4,0</b>  |                     | <b>1,9</b> | <b>5,5</b> | <b>5,0</b> |
| CLOTH 0,47 ng/ape | BiancaArancio | 3   | 1                   | 0          | 4          | 5          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | GiallaBlu     | 3   | 1                   | 0          | 2          | 5          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | RosaArancio   | 3   | 1                   | 0          | 0          | 2          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | VerdeFuxia    | 5   | 1                   | 0          | 0          | 1          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | Rosa Fuxia    | 4   | 1                   | 0          | 0          | 0          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | GiallaRuxia   | 6   | 1                   | 0          | 0          | 0          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | BluBianca     | 5   | 1                   | 0          | 0          | 0          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | ArancioVerde  | 4   | 1                   | 0          | 5          | 6          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | ArancioViola  | 4   | 1                   | 0          | 6          | 0          |
|                   | <b>Media</b>  | <b>3,7</b>  |                     | <b>0,0</b> | <b>1,9</b> | <b>2,1</b> |

**Tabella 38** - Frequenze di ritorno alla fonte di alimentazione di api trattate con il protocollo 3.

| P.A.              | Ape            | Frequenza visita in alimentatore in 40' pre-trattamento | Dosi sommini-strate | Freq. 1 h | Freq. 3 h  | Freq. 24 h |
|-------------------|----------------|---|---------------------|-----------|------------|------------|
| CLOTH 0,47 ng/ape | ArancioViola   | 8   | 2                   | 1         | 1          | 0          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | ArgentoBianca  | 5   | 1                   | 1         | 0          | 0          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | Verde Arancio  | 6   | 3                   | 1         | 1          | 0          |
| CLOTH 0,47 ng/ape | ArgentoArancio | 3   | 2                   | 1         | 0          | 0          |
|                   | <b>Media</b>   | <b>5,5</b>  |                     | <b>1</b>  | <b>0,5</b> | <b>0</b>   |

Una sola ape è stata trattata secondo il protocollo 4, ovvero facendole assumere 0,552 ng/ape in 30 microlitri di soluzione zuccherina una prima volta, in modo da riempire la sacca melaria, e consentendole di svuotarla immediatamente al suo ritorno al nido. L'ape si è presentata per 3 volte all'alimentatore, ma alla terza somministrazione non ha fatto ritorno al nido.



**Figura 30** - Frequenza dei voli di bottinamento in api trattate con 0,47 ng/ape per ingestione in 5 microlitri (Protocollo 2) ed api non trattate.

*Protocollo 1*: nonostante le api avessero la possibilità di nutrirsi dopo aver assunto il trattamento, la grande maggioranza lasciava il punto di alimentazione. Ad un esame dei dati di frequenza riportati in Tabella 36 emerge che le api trattate sono state in grado di recarsi alla fonte contaminata mediamente 6,3 volte (hanno cioè sopportato 6,3 assunzioni di clothianidin) poi hanno cessato di venire, mentre i testimoni hanno effettuato nello stesso tempo più di 20 voli in media. Il trattamento anche a queste bassissime dosi ha avuto un forte impatto sulla presenza delle api al punto di alimentazione 24 ore dopo il trattamento che scende dall'86,7% delle api testimone al 16,7% delle api trattate.

L'analisi statistica dei dati di frequenza all'alimentatore di api sottoposte al Protocollo 2 (Test U di Mann-Whitney) mostra una differenza significativa nella frequenza dei voli di bottinamento di api che hanno assunto una sola dose di 0,47 ng/ape (Figura 30) e le api non trattate, sia a 60' che a 180'. Il confronto tra la frequenza media a 24 ore non è statisticamente significativo, anche se è da rilevare una disparità nella mediana tra le due tesi. L'interpretazione è che le api che superano la fase di intossicazione possono riprendere a bottinare con frequenza simile ai testimoni non trattati, tuttavia la metà di esse non era presente all'alimentatore a 24 ore dal trattamento

## 6.5 Prova di disorientamento nel labirinto complesso con le api

La sperimentazione consisteva nell'addestrare le api a compiere un percorso in un labirinto per accedere alla ricompensa costituita da uno sciroppo zuccherino. L'orientamento delle api in un labirinto complesso si basa sull'apprendimento associativo tra un marchio visivo e la ricompensa della soluzione zuccherina. L'obiettivo della prova era quello di valutare l'effetto subletale di clothianidin, un principio attivo utilizzato nella concia dei semi di mais, sulla capacità di orientamento delle api nel labirinto. Insieme al *PER (Proboscis Extension Reflex)* test, questo metodo potrebbe essere utilizzato in futuro nelle linee guida ufficiali (EPPO, OECD) per saggiare gli effetti subletali dei pesticidi. Tuttavia a differenza del PER, di cui si conoscono molte pubblicazioni e la cui metodologia è ormai abbastanza standardizzata, il test del labirinto complesso è stato finora poco utilizzato. Gli unici studi disponibili in bibliografia sono quelli di Zhang *et al.* (2000) e Decourtye (2009)<sup>1</sup>.

Pertanto l'altro obiettivo della nostra sperimentazione era quello di mettere a punto un protocollo per saggiare gli effetti subletali degli agrofarmaci sulle api con il labirinto complesso. Partendo dal metodo messo a punto da Decourtye *et al.* (2009), abbiamo effettuato cinque prove al fine di poter adattare il suo protocollo alle nostre condizioni ambientali e saggiare contemporaneamente sia le api trattate che il relativo controllo. Nel lavoro di Decourtye il labirinto era collocato in un tunnel di rete insieme ad un nucleo di api.

Per comparare la risposta delle api prima e dopo l'esposizione al principio attivo sulla stessa colonia, il protocollo prevedeva tre periodi: due non trattati intervallati da uno trattato. Questo metodo presentava alcuni svantaggi: 1) è molto lungo, infatti tra una fase e l'altra devono trascorrere alcuni giorni per rinnovare e riaddestrare le nuove api, dato che venivano usate sempre api diverse per ogni periodo; 2) il confronto tra le tesi potrebbe essere "affetto" dal fattore tempo dato che i saggi venivano effettuati in giorni diversi per le api del trattato e quelle del testimone; 3) il confinamento in tunnel può influire negativamente sulle performance della api. Infatti, dalla nostra prova preliminare, effettuata a fine maggio 2011 (si veda relazione APENET 19 giugno), in cui sia le api che il labirinto erano collocati in un tunnel di rete, è emersa l'impossibilità di

---

<sup>1</sup> Zhang S., Mizutani A., V. Srinivasan M. (2000). Maze Navigation by Honeybees: Learning Path Regularity. *Learning & Memory* 7: 363-374.

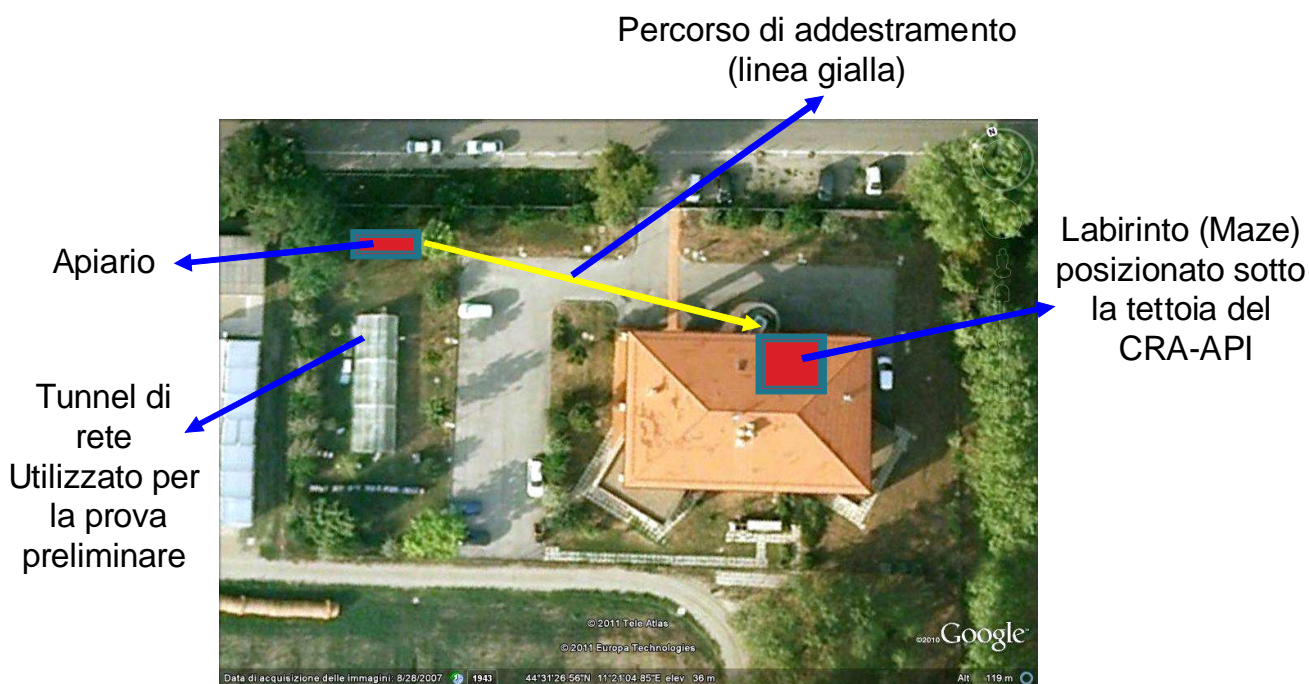
Decourtye A., Lefort S., Devillers J., Gauthier M., Aupinel P., Tisseur M. (2009). Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. *Julius-Kühn-Archiv*, 423: 75-83.

effettuare, nelle nostre condizioni ambientali, la sperimentazione con api confinate. L'elevata temperatura all'interno del tunnel (soprattutto nelle ore centrali della giornata) obbligava le api a rimanere ad arieggiare all'interno dell'alveare per mantenere bassa la temperatura o le costringeva a raccogliere l'acqua in contenitori posizionati nel tunnel anziché la soluzione zuccherina all'interno del labirinto. Tutto questo riduceva enormemente il numero di api disponibili per la prova. Nel lavoro di Decourtye *et al.* (2009) non è specificato il periodo in cui è stata svolta la prova e non è riportata la temperatura interna, mentre in Zhang *et al.* (2000) la sperimentazione era condotta in una serra termoregolata a  $24 \pm 5$  °C durante il giorno e  $17 \pm 3$  °C durante la notte.

### 6.5.1 Materiali e metodi

La sperimentazione è stata svolta presso il CRA-API (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura) di Bologna da giugno ad agosto 2011. Rispetto alla prova preliminare, il labirinto è stato spostato fuori dal tunnel e posizionato in una zona ombreggiata dell'edificio del CRA-API. Le api sono state addestrate a percorrere il tragitto (circa 50 m), dell'apiario sperimentale al labirinto, spostando lungo il percorso un alimentatore con acqua zuccherina fino al primo box del labirinto (Figura 31). L'alimentatore era composto da una scatola di plastica trasparente con uno strato di cotone nel fondo imbevuto di acqua zuccherina al 50% e un ingresso costituito da un foro che combaciava con l'ingresso dei box. Ognuna delle cinque prove è stata svolta in tre fasi:

- 1) addestramento: le api dell'apiario collocato presso il CRA-API che arrivavano al primo box del labirinto, apprendevano ad associare il percorso corretto (contrassegnato da un adesivo circolare verde) ad una fonte zuccherina (ricompensa);
- 2) trattamento: alle api, dopo essere state marcate, veniva somministrata per ingestione una soluzione subletale di un neonicotinoide (principio attivo: clothianidin) alla concentrazione di 10 µg/L (20 µg/L nella prova 5);
- 3) saggio: le performance delle api nel raggiungere e nel percorrere il labirinto fino all'ultimo box, dove è collocata la ricompensa, venivano annotate. Il comportamento delle api è stato rilevato per circa 3 ore dalla liberazione (dopo il trattamento).



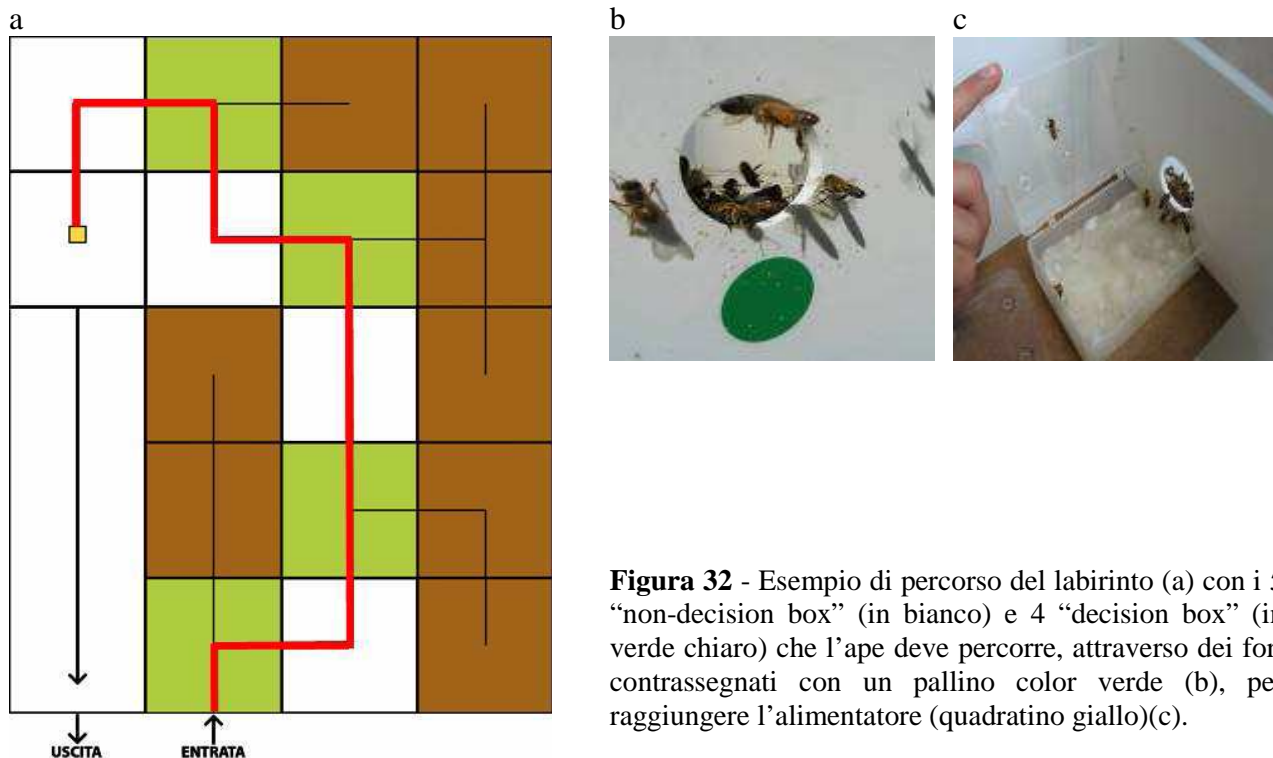
**Figura 31** - Visione satellitare dell'edificio del CRA - API di Bologna dove è stata svolta la sperimentazione.

Il labirinto utilizzato, costruito completamente in Perspex (polietil metacrilato) opaco e ricoperto con una lamina trasparente, era costituito da una matrice di 4 x 5 scatole cubiche identiche (box) ognuna con una parete di 30 cm di lato. Alcune pareti erano corredate di un foro di 4 cm di diametro per consentire all'ape di passare nel box successivo. La struttura era formata da 4 "decision-box" e da 5 "non-decision box". Le camere "non-decision box" avevano due fori, ognuno in due differenti pareti, una di entrata e l'altra di uscita. Le stanze "decision box", invece, avevano tre fori, l'ape entra da uno e può scegliere come proseguire il tragitto tra le altre due aperture.

Il percorso da fare fino all'alimentatore era contrassegnato da un adesivo circolare verde collocato al disotto del foro che l'ape doveva attraversare. L'alimentatore era costituito da un recipiente di plastica trasparente al cui interno vi era una scatola Petri con cotone imbevuto di acqua zuccherina al 50% di peso. Le api accedevano all'alimentatore tramite un foro che combaciava con quello del box (Figura 32 c).

L'addestramento consisteva nel fare associare alle api il percorso indicato dal colore verde del contrassegno con il premio. Le api, condizionate ad arrivare nei pressi del labirinto, sono state attratte nel primo box collocandovi un alimentatore. Dopo circa un'ora l'alimentatore veniva spostato nei box successivi (fino al quinto box) mantenendolo in ognuno per circa mezz'ora. Dal quinto box si proseguiva direttamente al nono marcando le api che raggiungevano l'obiettivo. Le api, arrivate all'alimentatore, non venivano addestrate a tornare indietro nel labirinto ma liberate di volta in volta aprendo il coperchio del box e segnando l'ora del rilascio. La modalità di addestramento delle api dall'apiario fino al nono box è stata la stessa in tutte le prove.

Dopo la fase di trattamento (svolta con diverse modalità nelle varie prove per individuare quella che disturbasse meno le api), è stato eseguito il test per valutare l'effetto del principio attivo sulle api. Il saggio consisteva nel far entrare un'ape alla volta registrando il tempo trascorso dal trattamento al ritorno al labirinto, e il tempo di percorrenza dei box fino al raggiungimento della soluzione zuccherina. Un volta che l'ape raggiungeva il box con la ricompensa, veniva catturata per evitare di farle ripetere il percorso (ad eccezione della prova 5). Di tanto in tanto il percorso nel labirinto veniva modificato e la struttura pulita con acetone per assicurarsi che la api associassero il percorso corretto esclusivamente al marchio verde all'ingresso del box.



**Figura 32** - Esempio di percorso del labirinto (a) con i 5 "non-decision box" (in bianco) e 4 "decision box" (in verde chiaro) che l'ape deve percorrere, attraverso dei fori contrassegnati con un pallino color verde (b), per raggiungere l'alimentatore (quadrantino giallo)(c).

### Prova 1

Il 16 giugno, a mano a mano che le api raggiungevano il nono box, venivano marcate di bianco e liberate per consentire loro di continuare i viaggi di bottinamento dall'alimentatore all'alveare. Successivamente, quando le api marcate sull'alimentatore hanno raggiunto un certo numero (N = 70), il recipiente del nutritore è stato chiuso per trasferirlo in laboratorio e le api al suo interno assopite con CO<sub>2</sub>. A questo punto le api sono state divise in quattro gruppi e marcate per indicare le tesi: due per il "trattato" (ingestione di 10 µg/L di clothianidin) e due per il "testimone" (Figura 33). Le api sono state inserite in gruppi da 15-20 all'intero di gabbiette di cartone (9,5x5x6,5 cm) con un alimentatore contenente la soluzione zuccherina (pura nel "testimone" e addizionata al principio attivo nel "trattato"). Le api consumavano completamente la soluzione in circa 3 ore. Due gruppi (un "trattato" e un "testimone") da 15 api ognuno, sono stati liberati subito dopo la somministrazione per valutare l'effetto immediato, mentre gli altri due gruppi (sempre un "trattato" e un "testimone") da 20 api ognuno, sono stati liberati dopo 24 ore per studiare un eventuale effetto dilazionato. Queste api, in attesa della liberazione, sono state mantenute in incubatore a 25 °C, al buio ed alimentate *ad libitum* con acqua e soluzione zuccherina (al 25%). Dato che nella prova ad effetto immediato non tutte le api sono ritornate al labirinto entro la prima giornata di prove, come ci si aspettava, e dato che i colori utilizzati per le tesi "trattato" trattato effetto immediato e "trattato" effetto dilazionato (così anche per le tesi "testimone") erano uguali, per distinguere le api liberate dopo 24 ore da quelle del giorno prima, sono state riassopite con CO<sub>2</sub> per essere rimarcate con colori diversi. Il test è stato svolto subito dopo che le api sono state liberate tra l'apiario e il labirinto. Per ogni gruppo di api sono stati registrati i seguenti parametri: le api che riuscivano a tornar, quelle che raggiungevano l'alimentatore posto al nono box, il tempo intercorso tra la liberazione e l'arrivo al labirinto e il tempo di percorrenza del labirinto (dall'ingresso all'ultimo box). Durante il trattamento e fino all'inizio del test, è stato impedito l'ingresso al labirinto alle altre api per evitare un eccessivo flusso durante la fase di valutazione dei tempi.

Il 17 giugno è stata effettuata una seconda prova con le stesse modalità della precedente (escluso il test a 24 ore) ma non interrompendo il flusso di api al labirinto durante la fase di trattamento. Sono state marcate 40 api e divise tra le due tesi.



**Figura 33** - Marcatura e divisione api assopite in CO<sub>2</sub> (a sinistra) e divisione delle api in 4 gruppi marcate con colori differenti e divise nelle gabbiette (a destra).

### Prova 2

Supponendo che un eccessivo utilizzo della CO<sub>2</sub> nella fase di marcatura e trasferimento nelle gabbiette causi uno stress eccessivo alle api, che potrebbe interferire con la valutazione degli effetti del principio attivo, in questa seconda prova non è stata utilizzata l'anidride carbonica.

Il 20 giugno le api sono state addestrate a raggiungere il labirinto e, il giorno successivo, sottoposte al test come nella prova 1. In mancanza della CO<sub>2</sub>, il trattamento in questo caso è stato effettuato



sostituendo l'alimentatore con la soluzione zuccherina pura (testimone) con un altro contenente una quantità di principio attivo alla dose di 10 µg/L (trattato). Alle api veniva consentita l'ingestione del principio attivo una sola volta (un singolo volo) direttamente sull'alimentatore del trattato. Le api terminavano di suggerire la soluzione presumibilmente al riempimento della borsa melaria (40 mg). Per avere due gruppi distinti, le api (N = 14) che raggiungevano l'ultimo box e si alimentavano con la soluzione zuccherina, venivano marcate di bianco (testimone); subito dopo il secondo gruppo di api (N = 17) che raggiungevano l'ultimo box e si alimentavano nel contenitore con la soluzione contaminata, venivano marcate di verde (trattato). Tra un gruppo e l'altro l'ingresso dell'ultimo box è stato chiuso. In questa prova, è stato riscontrato che alcune api non si sono alimentate pienamente perché la marcatura è stata fatta contemporaneamente all'alimentazione con il rischio quindi che alcune, disturbate dalle operazioni di marcatura, volino via marcate e senza aver assorbito completamente il principio attivo. Per questo motivo nelle prove successive è stata riutilizzata la CO<sub>2</sub> ma standardizzando i tempi.

### *Prova 3*

Il 19 luglio le api sono state addestrate a raggiungere il nono box con la stessa modalità spiegata in precedenza. Il trattamento è stato eseguito come nella prova n. 2, cioè somministrando il principio attivo alle api una sola volta direttamente dall'alimentatore. Con un numero sufficiente di api, l'alimentatore è stato chiuso e immediatamente trasferito in laboratorio per la marcatura assopendo le api in CO<sub>2</sub> per 30 minuti. Sono state marcate di colore rosa le api che hanno assunto la soluzione contaminata (N = 19) e in bianco quelle che hanno ingerito la soluzione testimone (N = 17). Le api nei rispettivi alimentatori sono state posizionate in un unico box vuoto del labirinto e liberate dopo 90 minuti. Durante la fase di marcatura e avvelenamento è stato mantenuto il flusso di api al labirinto, lasciando l'alimentatore con la soluzione zuccherina al nono box. Il problema riscontrato in questa prova è lo stress causato alle api dall'eccessivo confinamento dopo l'esposizione alla CO<sub>2</sub> (dalla cattura alla liberazione: 120 minuti). Si è deciso quindi di ridurre questi tempi.

### *Prova 4*

Il 25 luglio le api sono state addestrate a raggiungere il nono box nella stessa modalità delle prove precedenti. L'avvelenamento è stato eseguito come nelle prove 2 e 3 con la differenza che sono state lasciate per 30 minuti a contatto con l'alimentatore prima della marcatura per essere sicuri che tutte le api si fossero alimentate con la soluzione contenente il principio attivo. Successivamente sono state assopite in CO<sub>2</sub> per 10 minuti e marcate in verde le api che hanno assunto la soluzione testimone (N = 19) e in arancione le api che hanno assunto la soluzione contaminata (N = 20). Rispetto alla prova precedente è stato diminuito il tempo di esposizione alla CO<sub>2</sub> nella fase di marcatura, per un totale di 10 minuti a gruppo rispetto ai 30 minuti della prova 3. Dopodiché le api sono state posizionate nel labirinto, in box separati e areati, e liberate dopo 35 minuti (tempo totale dalla cattura alla liberazione: 75 minuti). Anche in questa prova durante le fasi di trattamento e marcatura è stato mantenuto il flusso di api al labirinto, con l'alimentatore posizionato al nono box.

### *Prova 5*

Il 1° agosto le api sono state addestrate a raggiungere il nono box, marcate e trattate con le stesse modalità della prova 4. Le 34 api trattate sono state marcate di blu, mentre le 33 testimone di rosa. In questa prova, rispetto alle precedenti, è stata raddoppiata la concentrazione di principio attivo nella soluzione somministrata (20 µg/L). Le api arrivate all'alimentatore sono state poi rimarcate una seconda volta (di viola quelle del trattato e di bianco quelle del testimone) per valutare un eventuale effetto dilazionato al secondo volo.

### *Analisi statistiche*

Il test del  $\chi^2$  è stato utilizzato per analizzare il numero di api del trattato e del testimone che: 1) non sono tornate al labirinto ("smarrite"), 2) sono tornate ma non sono state in grado di raggiungere

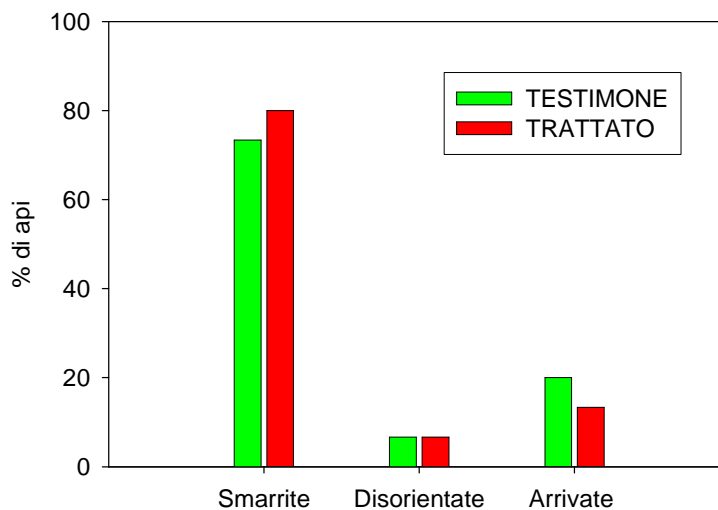
l'ultimo box ("disorientate"), 3) sono tornate nel labirinto e hanno raggiunto l'ultimo box ("arrivate"). Per queste ultime è stato calcolato il tempo di percorrenza del labirinto e le differenze tra le tesi sono state analizzate tramite il t-test (o di Mann-Whitney nel caso in cui gli assunti di normalità non venivano rispettati). Anche il tempo intercorso tra la liberazione dalla gabbietta (prova 1) o il trattamento (prova 2) e il ritorno delle api al labirinto, è stato confrontato tra le tesi con il t-test (o di Mann-Whitney nel caso in cui gli assunti di normalità non venivano rispettati).

### 6.5.2 Risultati

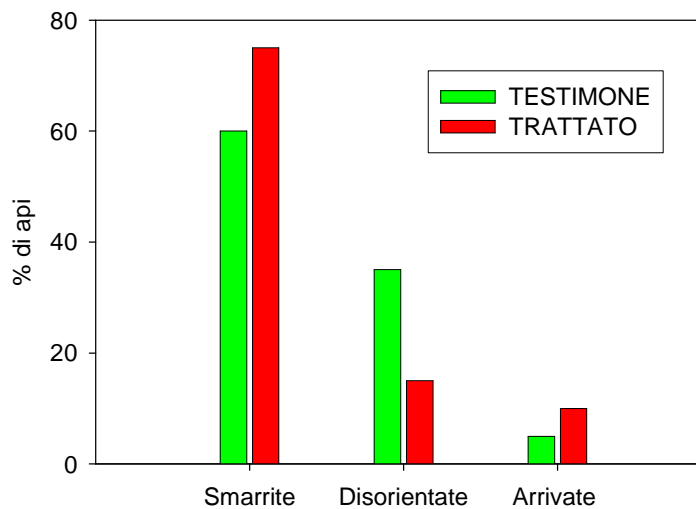
Rispetto alla prova preliminare, il flusso di api che è arrivato al labirinto, dopo che è stato spostato fuori dal tunnel, è stato molto intenso permettendoci di addestrare facilmente un numero elevato di api ad arrivare fino all'ultimo box (nono). La fase di addestramento dal primo box al nono si è rilevata pertanto molto semplice richiedendo circa 2-3 ore.

#### Prova 1

Il 16 giugno, oltre 70 api sono riuscite a fare il percorso completo del labirinto e sono state sottoposte a trattamento. Tuttavia sia nella prova ad effetto immediato che a 24 ore della somministrazione, molte di loro dopo la liberazione non sono ritornate al labirinto (60-80%). Di quelle tornate solo il 5-20% hanno raggiunto l'ultimo box (Figure 34 e 35).



**Figura 34** - Comportamento delle api dopo la liberazione (effetto immediato).

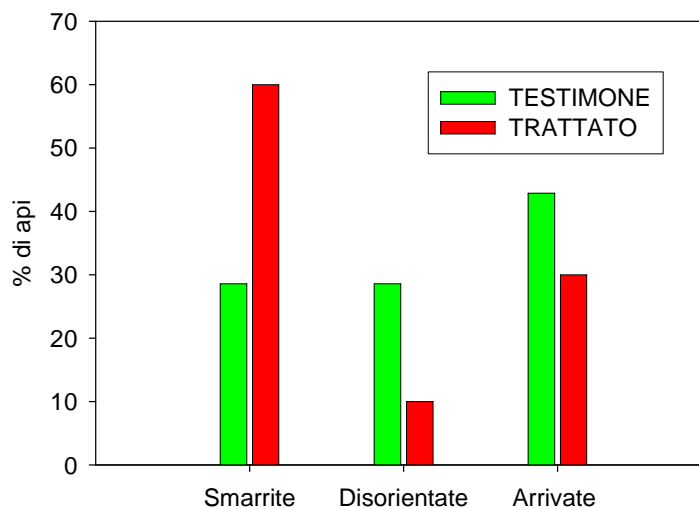


**Figura 35** - Comportamento delle api dopo la liberazione (effetto a 24 ore).

Dal confronto tra trattato e testimone non sono emerse differenze statisticamente significative, sia nell'effetto immediato ( $\chi^2 = 0,243$ ; gdl = 2; P = 0,885) che in quello a 24 ore ( $\chi^2 = 2,267$ ; gdl = 2; P = 0,322). E' probabile che l'interruzione del flusso di api al labirinto abbia scoraggiato le api marcate a tornare, pertanto il 17 giugno si è deciso di non interrompere il flusso di api al labirinto mantenendo un alimentatore al suo ingresso durante il periodo in cui le api marcate erano in gabbietta. In questo caso il numero di api che sono tornate al labirinto è stato maggiore rispetto al giorno precedente ma ancora piuttosto basso, in particolare nella tesi del trattato (Figura 36). Il confronto tra le frequenze di api che sono tornate al labirinto ed hanno effettuato correttamente il percorso fino all'ultimo box non è differito significativamente tra il trattato e il testimone ( $\chi^2 = 4,578$ ; gdl = 2; P = 0,101).

Anche per quanto riguarda i tempi di ritorno (dopo la liberazione delle api) e il tempo che le api impiegavano per percorrere completamente il labirinto, non differiva statisticamente tra le api trattate e quelle del testimone, sia il 16 che il 17 giugno (Tabella 39).

La difficoltà delle api a ritornare al labirinto dopo la liberazione è stata interpretata dal fatto che l'assopimento con CO<sub>2</sub> per inserire le api nelle gabbiette e lo stress indotto dal confinamento nelle gabbiette, può aver scoraggiato le api a tornare al labirinto. Per questo motivo nella prova successiva si è deciso di non addormentare le api con CO<sub>2</sub> e di somministrare il principio attivo direttamente nell'alimentatore posizionato nell'ultimo box.



**Figura 36** - Comportamento delle api dopo la liberazione (prova del 17 giugno).

**Tabella 39** - Tempo medio ( $\pm$  E.S.) di ritorno e di percorrenza del labirinto e risultato del test statistico (t-test o Mann-Whitney).

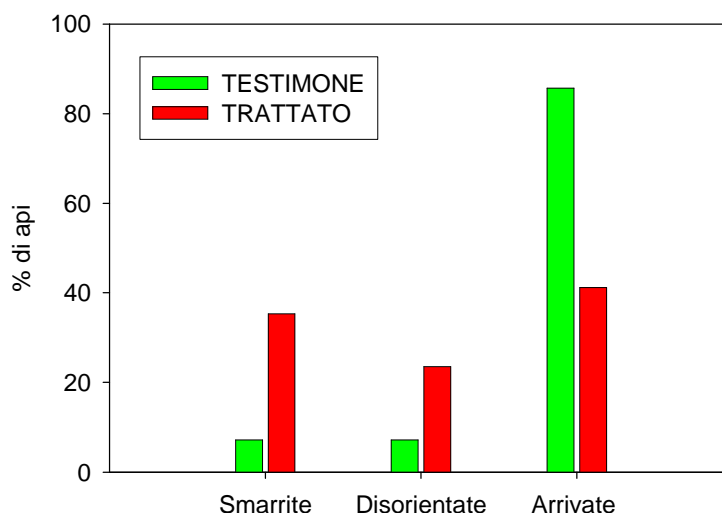
| Data   | Tempo di ritorno al labirinto (minuti) |                          |           | Tempo di percorrenza (secondi) |                          |           |
|--|--|--------------------------|-----------|--------------------------------|--------------------------|-----------|
|  | Testimone                              | Trattato                 | Test      | Testimone                      | Trattato                 | Test      |
| 16 giugno<br>(effetto immediato)               | 45,5 $\pm$ 17,7<br>N = 4               | 13,3 $\pm$ 10,4<br>N = 3 | P = 0,216 | 96,7 $\pm$ 34,2<br>N = 3       | 64,0 $\pm$ 46,0<br>N = 2 | P = 0,6   |
| 16 giugno<br>(effetto dilazionato<br>a 24 ore) | 26,2 $\pm$ 7,2<br>N = 8                | 34,0 $\pm$ 11,9<br>N = 5 | P = 0,564 | 43,0<br>N = 1                  | 49,0 $\pm$ 1,0<br>N = 2  |           |
| 17 giugno                                      | 37,8 $\pm$ 12,0<br>N = 14              | 76,3 $\pm$ 16,5<br>N = 8 | P = 0,562 | 73,6 $\pm$ 15,0<br>N = 8       | 40,3 $\pm$ 7,04<br>N = 6 | P = 0,097 |

### Prova 2

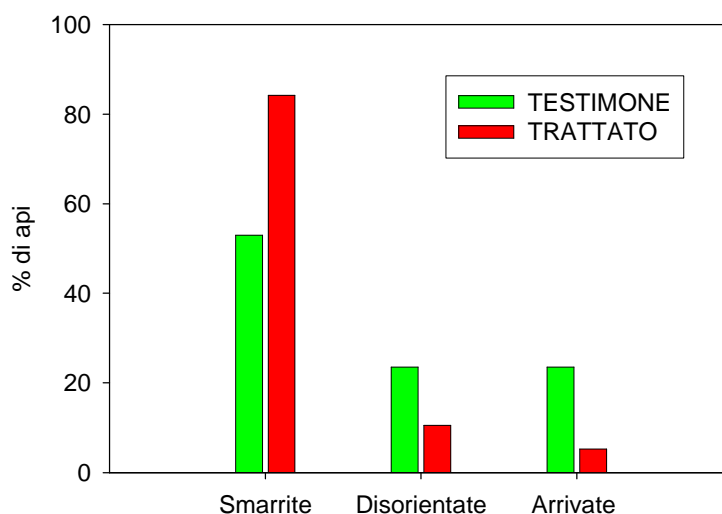
In questo test quindi, svolto il 21 giugno, le api non sono state assopite in CO<sub>2</sub> ma marcate direttamente sull'alimentatore, posto all'ultimo box, mentre si stavano nutrendo: le testimonie con acqua e zucchero al 25% e le trattate con la soluzione contaminata con 10 µg/L di clothianidin. Dalle osservazioni è emerso che il numero di api tornate al labirinto e che hanno raggiunto il nono box è stato significativamente maggiore nel testimone rispetto al trattato ( $\chi^2 = 6,457$ ; gdl = 2; P = 0,04; Figura 37). Non sono invece emerse differenze significative tra le api del trattato e quelle del testimone nel tempo di percorrenza del labirinto ( $t = -0,29$ ; P = 0,78; gdl = 17). Le api del testimone hanno impiegato in media  $52,6 \pm 6,6$  secondi (N=12), contro  $56 \pm 10,6$  del trattato (N=7).

### Prova 3

Il 19 luglio la marcatura delle api è stata eseguita assopendole nuovamente con CO<sub>2</sub> per i motivi spiegati in precedenza; il tempo di esposizione è stato però eccessivo e molte api non sono tornate al labirinto entro i tempi della prova. Tuttavia dopo sei giorni alcune api (sia del trattato che del testimone) sono state viste sull'alimentatore nel labirinto, indicando quindi un effetto transitorio. Osservando il numero di api tornate al labirinto non sono state trovate differenze significative tra le tesi del trattato e del testimone ( $\chi^2 = 4,32$ ; gdl = 2; P = 0,115; Figura 38).



**Figura 37** - Comportamento delle api dopo la liberazione (prova del 21 giugno).



**Figura 38** - Comportamento delle api dopo la liberazione (prova del 19 luglio).

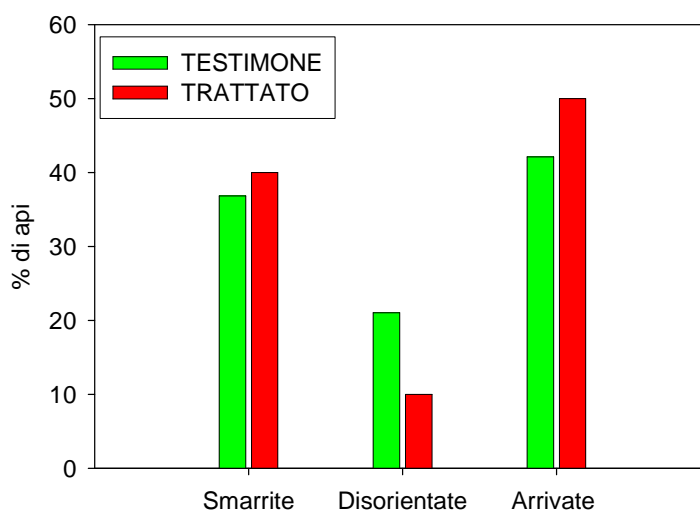
Per quanto riguarda i tempi di percorrenza del labirinto tra le api del trattato e del testimone non è stato possibile effettuare nessun test statistico in quanto solo un'ape del trattato ha raggiunto l'alimentatore impiegando 35 secondi. Le api del testimone hanno invece impiegato  $72,75 \pm 11,49$  (media  $\pm$  ES) secondi (N = 4).

#### Prova 4

In questa ulteriore prova si è osservato un maggior numero di api tornate al labirinto (62%) rispetto alla prova precedente (31%). Il dato può essere ricondotto probabilmente alla minor esposizione delle api alla CO<sub>2</sub> durante la fase di marcatura e alla riduzione del confinamento nel box (30 minuti rispetto ai 90 della prova 3).

Le differenze tra le frequenze di arrivo tra le api del trattato e le api del testimone non sono state comunque significative ( $\chi^2 = 0,931$  ; gdl = 2; P = 0,628; Figura 39).

Le api dopo aver assimilato il principio attivo, hanno percorso il labirinto in  $62,70 \pm 11,49$  (media  $\pm$  ES) secondi (N = 10), mentre quelle della soluzione testimone hanno impiegato  $47,37 \pm 5,348$  (media  $\pm$  ES) secondi (N = 8). Non sono emerse differenze significative tra le due tesi (t = 1,09; gdl = 16; P = 0,29).

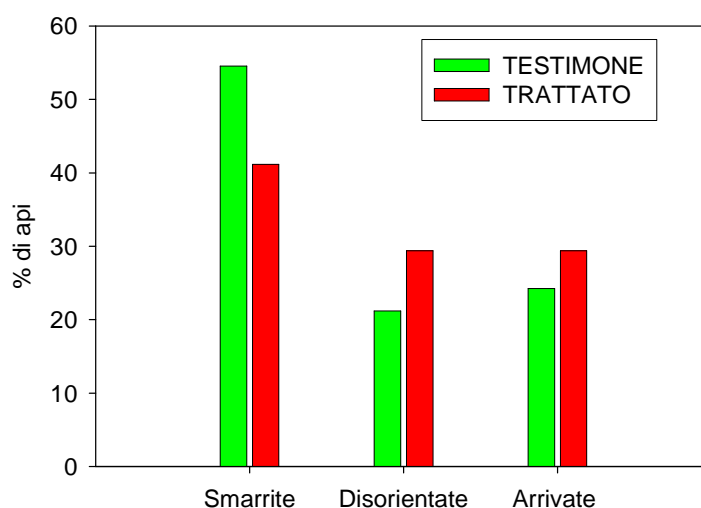


**Figura 39** - Comportamento delle api dopo la liberazione (prova del 25 luglio).

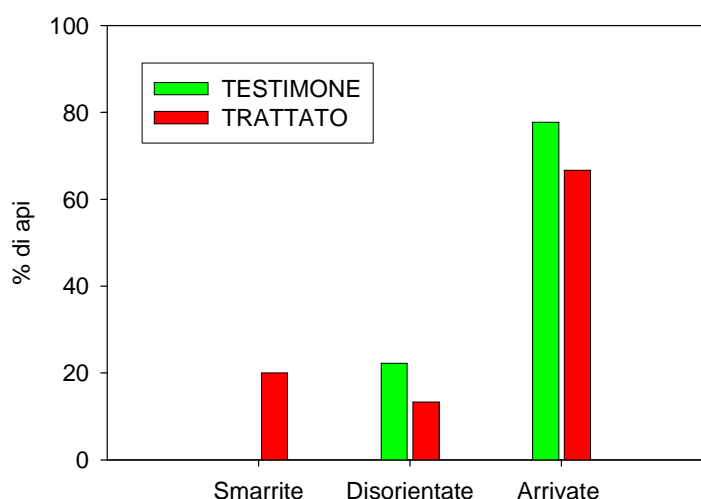
#### Prova 5

Nell'ultimo test condotto, il numero totale di api tornate al labirinto dopo le tre ore dalla liberazione è stato simile alla prova precedente (52%). Sia nel primo volo che nelle api che ne hanno effettuato due, per quanto riguarda le frequenze di arrivo, non sono emerse differenze significative tra il trattato ed il testimone, né nel primo che nel secondo volo (1° volo:  $\chi^2 = 1,237$  ; gdl = 2; P = 0,539; Figura 40; 2° volo:  $\chi^2 = 2,165$  ; gdl = 2; P = 0,339; Figura 41).

Neanche nella durata di percorrenza del labirinto sono emerse differenze significative, sia nel primo (t-test = -0,16; gdl = 16; P = 0,87; testimone:  $90,87 \pm 15,74$  secondi (N = 8); trattato:  $94,25 \pm 14,17$  secondi (N = 10)) che nel secondo volo (t-test = 0,46; gdl = 15; P = 0,65; testimone:  $55,86 \pm 11,18$  (N = 7); trattato:  $49,30 \pm 8,98$  secondi (N = 10)).



**Figura 40** - Comportamento delle api dopo la liberazione – 1° volo (prova del 1° agosto).



**Figura 41** - Comportamento delle api dopo la liberazione – 2° volo (prova del 1° agosto).

## 6.6 Conclusioni

### *Memoria olfattiva*

Le sperimentazioni confermano i risultati delle sperimentazioni già condotte sulla contaminazione con polveri nel corso del 2009. Tutti i principi attivi saggiati, anche a queste piccolissime concentrazioni, si mostrano in grado di perturbare l'apprendimento e la memoria olfattiva. La percentuale media di api che hanno risposto correttamente alla presentazione degli odori è sempre inferiore a quella dei testimoni, a tutti gli intervalli di tempo.

### *Riconoscimento del colore e orientamento in labirinto ad Y*

Le sperimentazioni sulle capacità di orientamento di api libere in un labirinto semplice a Y, in cui le api devono entrare e trovare la ricompensa sulla base di uno stimolo visivo, ovvero seguendo un colore, dimostrano che le dosi sub letali di thiamethoxam contenute nelle polveri ricadute a 5 m con la seminatrice modificata (5 % del p.a. rispetto alla seminatrice non modificata) sono in grado di

ridurre dopo 24 ore la capacità di recarsi ad una fonte di cibo conosciuta (solo il 50% delle api si è presentata al labirinto alla liberazione dopo 24 ore) e di riconoscere i colori associati alla ricompensa zuccherina. Addirittura 2 api hanno scelto ripetutamente il colore associato al sale durante il training.

### *Homing e comportamento al nido*

Le ricerche sugli effetti di dosi sub letali sulle capacità di *homing* e sul comportamento delle api all'alveare sono in corso, ma allo stato attuale ci sono già chiare evidenze che anche a dosi bassissime, come quella applicata nel protocollo 1 (0,092 ng/ape, pari a 1/10 di quella utilizzata nelle sperimentazioni PER 2010 sugli effetti della contaminazione per ingestione sulla memoria olfattiva - 2009 e 2010) portano nel giro di un numero di assunzioni variabile da 3 a 10 all'intossicazione dell'ape con compromissione dell'attività di bottinamento e perdita dell'orientamento a 24 ore.

Il numero di micro-assunzioni necessarie a determinare il blocco dell'attività dell'ape, provocando anche nella maggior parte dei casi la sua dispersione, è variabile: alcune api non si sono più presentate al punto di alimentazione dopo 3-5 somministrazioni, fermandosi al nido; altre hanno effettuato 10-12 voli (venendo quindi sottoposte a 10-12 somministrazioni). Solo una era presente al nido dopo 24 ore, mentre erano presenti tutte le api testimone.

Il protocollo di somministrazione 2 costituisce la ripetizione della sperimentazione condotta nel corso del 2010, dove era stato osservato il comportamento di 10 api trattate e 10 testimoni. I risultati ottenuti nei due anni di studio sono analoghi, e dimostrano che la somministrazione in una sola volta di quantità di clothianidin pari a 0,47 ng/ape determina effetti immediati evidenti: l'ape rientra al nido ma rimane molto tempo ferma, non scambia cibo e non svuota la borsa melaria. Il trattamento riduce significativamente la frequenza dei voli di raccolta nelle ore immediatamente successive all'assunzione, e anche il giorno dopo la frequenza di bottinamento per molte api è azzerata.

Il protocollo 3 prevedeva la somministrazione ripetuta della dose utilizzata per il protocollo 2 (0,47 ng/ape). Due api su 4 hanno fatto ritorno al punto di alimentazione per una seconda volta, ricevendo una seconda somministrazione; esse hanno fatto ritorno al nido ma non sono più uscite, e al controllo delle 24 ore non erano presenti né all'alimentatore né al nido. L'unica ape che è riuscita a tornare per la terza volta, ricevendo una terza dose, non è più riuscita a rientrare al nido.

L'unica ape alla quale è stato somministrato una quantità paragonabile (0,552 ng/ape) in 30 microlitri (borsa melaria piena) non ha fatto ritorno al nido.

E' evidente che clothianidin, somministrato secondo diversi protocolli che simulano diverse modalità di assunzione in campo, ha prodotto sempre un effetto di riduzione della frequenza di bottinamento, alterazioni del comportamento delle api che rientrano al nido, e perdita dell'orientamento con mancato ritorno al nido quando la dose assunta raggiunge all'incirca 0,4 ng/ape attraverso assunzioni multiple di bassissime dosi.

Se ne conclude che il contatto con bassissime dosi di neonicotinoidi e fipronil, sia sotto forma di polveri che assunto per ingestione (da nettare, polline o acqua contaminate) compromette la capacità dell'ape di attuare i comportamenti adeguati a svolgere le sue funzioni, e se ripetuto (come evidentemente avviene se la dose assunta non è tale da uccidere immediatamente l'ape) ne provoca il disorientamento (incapacità di tornare al nido) e/o la morte.

E' logico e sequenziale dedurre che, poiché le api bottinano in massa sulle stesse colture, se si verifica la contaminazione di un numero significativo di bottinatrici ciò compromette l'equilibrio dell'intera colonia. L'assunzione di dosi sub letali di tali principi attivi può quindi concorrere a determinare uno stato di "debolezza cronica" della colonia.

### *Prova disorientamento nel labirinto complesso*

Uno degli obiettivi della sperimentazione è stato quello di mettere a punto un protocollo per valutare l'effetto dei neonicotinoidi sulla capacità di orientamento delle api in un labirinto complesso adattandolo alle nostre condizioni sperimentali. Partendo dai lavori di Decourtye *et al.* (2009), che ha svolto la prova in tunnel, si è appurato che, nelle nostre condizioni ambientali, non è possibile addestrare sotto tunnel in rete un elevato numero di api a percorrere il labirinto (massimo 6 api e solo fino al quinto box. Si veda relazione APENET del 19 giugno). Durante la prova abbiamo osservato uno scarso volo delle api, soprattutto nelle ore centrali e più calde della giornata, e un forte indebolimento della famiglia. Tutto questo è stato attribuito alle eccessive temperature presenti nel tunnel durante il periodo della prova ed al fatto che le api in ambiente confinato sono molto più stressate. Inoltre Decourtye e i suoi collaboratori hanno diviso la sperimentazione in tre fasi (due periodi "non trattato" intervallato da uno "trattato") in cui si valutava la risposta della api prima e dopo l'esposizione al prodotto fitosanitario. Questo metodo rende, secondo noi, la sperimentazione soggetta alla variabile "tempo". Infatti, uno degli obiettivi della nostra ricerca, era quello di poter saggiare contemporaneamente sia le api del trattato che quelle del testimone.

Spostando il labirinto fuori dal tunnel è emersa una certa facilità nell'addestramento delle api a raggiungere il labirinto ed a percorrerlo fino al nono box. Infatti in tutte le prove svolte sono state utilizzate da un minimo di 30 ad un massimo di 70 api. Le fasi più delicate della prova consistevano nella marcatura e nel trattamento delle api. Infatti dovevamo essere sicuri che le soluzioni somministrate fossero interamente ingerite dalle api. Nei test in cui è stata utilizzata la CO<sub>2</sub> e le api costrette in gabbietta per assumere la soluzione con il principio attivo, si è notato un aumento del numero di api che ritornano al labirinto al diminuire dei tempi di esposizione all'anidride carbonica e di confinamento in gabbietta (Tabella 40). Ovviamente la percentuale maggiore è stata riscontrata nella prova 2 in cui le api, non essendo state trattate con CO<sub>2</sub>, non hanno mai interrotto la loro attività. Tuttavia è stato osservato che marcando le api direttamente sull'alimentatore senza addormentarle (prima quelle del trattato e poi le api testimone), c'era il rischio che alcune api testimoni non si alimentassero pienamente, perché disturbate dall'operazione di marcatura, e inoltre, una volta liberate, rientrassero nel labirinto percorrendolo interamente fino all'alimentatore durante la fase di alimentazione delle api trattate, rischiando così di contaminarsi. Per questo motivo non è stato possibile marcare un numero elevato di api. Nelle prova 4 e 5 è stato dimostrato che standardizzando e diminuendo il più possibile l'interruzione dell'attività di volo e di bottinamento, era possibile ottenere una buona percentuale di api rientranti al labirinto (Tabella 40).

**Tabella 40** - Percentuale di api tornate al labirinto per essere sottoposte al test

|                          | Prova 1<br>16 giugno<br>(Effetto immediato) | Prova 1<br>16 giugno (Effetto<br>dilazionato – a 24<br>ore) | Prova 1<br>17 giugno | Prova 2<br>21 giugno<br>(senza CO <sub>2</sub> ) | Prova<br>3<br>19<br>luglio | Prova<br>4<br>25<br>luglio | Prova<br>5<br>1<br>agosto |
|--------------------------|---|---|----------------------|--|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| N                        | 30  | 40  | 41                   | 31   | 36                         | 39                         | 67                        |
| CO <sub>2</sub> (minuti) | 30  | 30  | 30                   | 0  | 30                         | 10                         | 10                        |
| Confinamento<br>(minuti) | 180   | 24 ore  | 180                  | 0  | 120                        | 75                         | 75                        |
| % api tornate            | 23.3  | 32.5  | 56.1                 | 77.4   | 30.6                       | 61.5                       | 52.2                      |

In tutte le prove (ad eccezione della prova 2) non sono emerse differenze significative tra il testimone e il trattato nella percentuale di api ritornate e nei tempi di ritorno e di percorrenza del labirinto. La concentrazione da noi saggiata nelle prime 4 prove era di 10 µg/L: nella prova numero 1 la quantità di soluzione somministrata ad ogni ape era di 10 µL, corrispondenti a 0,1 ng/ape di principio attivo (40 volte più bassa della DL<sub>50</sub>), nelle prove n. 2, 3 e 4 ogni ape ha assunto dall'alimentatore fino 40 mL di soluzione (capacità della borsa melaria) contenente il principio attivo, sempre alla concentrazione di 10 µg/L, corrispondenti ad una dose di 0,4 ng/ape di principio



attivo (10 volte più bassa della  $DL_{50}$ ); mentre nell'ultima prova, la numero 5, la concentrazione è passata a 20  $\mu\text{g/L}$ , corrispondenti ad una dose massima di principio attivo di 0,8 ng/ape (5 volte più bassa della  $DL_{50}$ ). Le quantità di principio attivo da noi saggiate, somministrate alle api in dose unica e non *ad libitum*, sono paragonabili alla concentrazione di p.a. teoricamente rinvenibile sulle gocce di rugiada o di nettare della vegetazione circostante calcolata in circa 15  $\mu\text{g/L}$  (assumendo che le gocce di rugiada siano di 0,05  $\mu\text{L}$ ). Tale valore è stato ottenuto sulla base della quantità di p.a. (clothianidin) ricaduto a 5 metri con la macchina modificata del 2011 (2,78  $\mu\text{g/m}^2$ ).

Gli effetti di queste quantità di principio attivo somministrato a dose unica, non sono quindi così evidenti o manifesti dopo poche ore dall'assunzione, rispetto alla somministrazione *ad libitum* (come è più verosimile che succeda in natura). Altri studi hanno infatti dimostrato che effetti subletali si manifestano dopo 3 ore (Bortolotti *et al.*, 2003; Medrzycki *et al.*, 2003), però con dosi più elevate. Tuttavia alcune conseguenze sono state evidenziate come osservato nelle prova n. 2, dove un numero significativo di api del trattato non sono tornate al labirinto.

## 7. Possibilità di applicazione della lotta integrata per il controllo delle virosi nella coltura del mais

**Obiettivo fondamentale:** valutare le possibilità di lotta integrata alle virosi nella coltura del mais ed individuare le possibilità di controllo con ridotta richiesta di insetticidi.

**Obiettivo intermedio:** valutazione incidenza delle virosi, suscettibilità degli ibridi, possibilità di monitoraggio dei vettori e di trattamenti di post-emergenza sui vettori.

### 7.1 Materiali e metodi

#### 7.1.1 Siti

Il rischio d'infezioni da virus, in particolare da nanismo ruvido, tende ad aumentare con la presenza di vegetazione spontanea e coltivata (*Echinochloa crus-galli*, *Agropyrum repens*, *Cynodon dactylon*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*) che favorisce le popolazioni dei vettori (in modo particolare *Laodelphax striatellus*). E' noto che tale infezione tende ad essere più elevata in talune aree circoscritte con specifiche caratteristiche territoriali (aree di alta pianura con alta incidenza di prati, anche stabili, e aree incolte di Friuli, Veneto e Piemonte). I siti sperimentali sono stati individuati tra quelli in cui la presenza di piante affette da nanismo ruvido era già stata accertata in passato o in zone con numerose aree incolte attorno agli appezzamenti. Per l'elevata presenza di fasce inerbite/prati talora anche boscate in prossimità degli appezzamenti, 7 siti sugli 11 prescelti si possono considerare con un potenziale di elevata pressione di vettori di virus (in uno di questi, Friuli, Premariacco si è scelto un reparto in cui la presenza del virus del nanismo ruvido è stata analiticamente accertata nel 2010). Per gli altri 4 campi la pressione può essere considerata media o medio bassa legata alle sole fasce inerbite perimetrali.

In ciascun sito, per isolare il fattore virosi rispetto ad altri fattori di pressione fitosanitaria sulla coltura, si è cercato di scegliere appezzamenti a mais avvicendato (no mais nel 2010) se in zona a elevata presenza di diabrotica e con basse popolazioni di elateridi. In base alle buone conoscenze disponibili per accertare il livello delle popolazioni di questi fitofagi, che costituiscono un basso rischio di danno, ci si è basati, per la scelta, sulla valutazione dei fattori di rischio dei diversi siti.

#### 7.1.2 Tesi a confronto

- a) Mais sensibile alle virosi DKC 5276 solo fungicida;
- b) Mais sensibile alle virosi DKC 5276 conciato Poncho®-clothianidin-0,5 mg s.a./seme + fungicida;
- c) Mais tollerante alle virosi DKC 6666 solo fungicida;
- d) Mais tollerante alle virosi DKC 6666 conciato Poncho®-clothianidin-0,5 mg s.a./seme + fungicida;
- e) Mais tollerante alle virosi DKC 6677 solo fungicida;
- f) Mais tollerante alle virosi DKC 6677 conciato Poncho®-clothianidin-0,5 mg s.a./seme + fungicida;
- g) PR32G44 solo fungicida;
- h) Mais sensibile alle virosi DKC 5276 + trattamento in post emergenza con piretroide (Karate Zeon 200 cc/hl) alla presenza dei vettori del virus (osservazioni trappole).

Fungicida comune a tutti: Metalaxil+fludioxonil (Celest®) alla dose di 1 l/t di seme.

La tecnica colturale, di tipo convenzionale con aratura e lavorazioni complementari, è stata omogenea negli appezzamenti in prova. In tutti si è proceduto al trattamento contro la piralide tra il 10 e il 25 luglio al fine di ridurre la possibile incidenza della piralide sulla variabilità all'interno del campo e quindi meglio isolare il principale fattore allo studio (virosi).

Le principali caratteristiche agronomiche di ciascuna prova sono sintetizzate in Tabella 41.

**Tabella 41** - Principali caratteristiche dei campi sperimentali e delle tecniche adottate nel 2011.

| Regione   | PV | COMUNE                 | Azienda      | Pressione vettori virus nanismo ruvido | Terreno                 | Schema di campo | Epoche di semina | Coltura precedente | Data di semina     | Densità di semina (pp/m <sup>2</sup> ) | Trattamento insetticida post-emergenza |
|-----------|----|------------------------|--------------|--|-------------------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|--|--|
| Friuli    | UD | Orsaria di Premariacco | De Sabbata   | alta                                   | medio impasto           | parcellare      | 2                | mais               | 1 apr, 27 apr      | 7,84/7,01                              | 19-mag                                 |
| Friuli    | UD | Camino al Tagliamento  | Panigutti    | alta                                   | medio impasto           | strip           | 1                | mais               | 12-apr             | 7,67                                   | no                                     |
| Veneto    | VE | S. Donà di Piave       | Bogoni       | alta                                   | medio impasto           | strip           | 1                | mais               | 9-apr              | 7,24                                   | 22-apr                                 |
| Veneto    | VE | S. Donà di Piave       | Florian      | medio-bassa                            | medio-impasto           | strip           | 1                | mais               | 9-apr              | 7,21                                   | 22-apr                                 |
| Veneto    | RO | Ceregnano              | Sasse Rami   | medio-bassa                            | medio impasto argilloso | strip           | 1                | frumento           | 12-apr             | 7,24                                   | 27-apr                                 |
| Veneto    | TV | Mogliano Veneto        | Diana        | alta                                   | medio impasto argilloso | parcellare      | 1                | colza              | 14-apr             | 7,45                                   | 16-apr                                 |
| Veneto    | VE | Caorle                 | Vallevecchia | alta                                   | sabbioso-limoso         | parcellare      | 1                | sorgo              | 14-apr             | 7,24                                   | 15-apr                                 |
| Veneto    | VE | Eraclea                | Moizzi       | medio-bassa                            | medio impasto           | strip           | 1                | soia               | 14-apr             | 7,24                                   | 22-apr                                 |
| Veneto    | PD | Legnaro                | Corte        | alta                                   | medio impasto           | strip           | 1                | frumento           | 29-apr             | 7,01                                   | 23-mag                                 |
| Lombardia | BG | Bergamo                | CRA MAC      | medio-bassa                            | medio impasto           | parcellare      | 2                | mais               | 22 apr, 16 giu.... | 6,00                                   | 1a sem 30 giu, 2 semina 5 lug          |
| Piemonte  | TO | Cavour                 | Bertinetto   | alta                                   | medio impasto           | strip           | 1                | mais               | 12-apr             | 7,41                                   | 18-mag                                 |

### ***7.1.3 Schemi sperimentali***

Le tesi sono state distribuite negli appezzamenti prescelti secondo blocchi randomizzati di parcelloni (strip test) o parcelle (prove parcellari).

#### ***Parcelle***

La dimensione delle singole parcelle è stata di 45 – 60 m<sup>2</sup> (m 3 X m 15-20) e i rilievi effettuati nella porzione centrale (8 – 10 m) delle 2 file centrali con 4 ripetizioni.

#### ***Strip test (parcelloni)***

La dimensione dei parcelloni è variata da 400 a 1500 m<sup>2</sup> (m 3 – 9 di larghezza per la lunghezza dell'appezzamento allo studio). Seme omogeneo proveniente da uno stesso lotto.

Ripetizioni da 2 a 6 per sito.

### ***7.1.4 Rilievi***

#### **A) Agronomici**

##### ***Prove parcellari***

Al centro di ciascuna parcella su 8-10 m delle due file centrali allo stadio di 4-6 foglie, e 8-12 foglie (aree identificate con paletti e mantenute da inizio a fine prova) sono stati eseguiti i seguenti rilievi:

##### **A1 Prime fasi**

- A1.1 numero piante normali (nessun sintomo);
- A1.2 numero piante con sintomi di attacco da elateridi;
- A1.3 numero piante con sintomi di attacco di altri fitofagi ipogei;
- A1.4 numero piante con sintomi di virosi “nanismo ruvido” (raccolta campioni fuori area di saggio per analisi);
- A1.5 numero piante con sintomi di altre virosi (ingiallimenti non riconducibili a erosioni da elateridi (raccolta campioni fuori area di saggio per analisi);
- A1.6 numero piante con afidi (verdi, neri) o cicaline;
- A1.7 vigore precoce.

##### **A2 Valutazione pre-raccolta**

Sulle stesse aree di saggio sono stati condotti i seguenti rilievi:

- A2.1 piante totali;
- A2.2 piante senza spiga (non attribuibili a virus);
- A2.3 piante con sintomi di attacco da virus – nanismo ruvido (specifico, non confondibile) con raccolta campioni da mettere immediatamente in freezer (<-18 C°); piante con sintomi di attacco da virus Barley BYDV (strie rosse tra nervature su foglie in diverse posizioni, piante più piccole, spiga piccola deforme) o da Fitoplasmosi del mais (i sintomi più evidenti si notano sulle foglie che mostrano un arrossamento della nervatura che si estende successivamente alla foglia e allo stocco, con successivo deperimento e disseccamento della pianta; sintomi su informazioni a oggi disponibili simili a Barley) raccolta campioni da mettere immediatamente in freezer (<-18 C°);
- A2.4 piante anomale con altri sintomi non definibili con precisione - raccolta campioni da mettere immediatamente in freezer (<-18 C°);
- A2.5 altri fitofagi (afidi, ragnetto rosso): osservazione piante sub-parcelle distinguendole in 3 categorie “afidi” e 3 categorie “ragnetto rosso”: 0 = no presenza significativa; 1= presenza 1 -2 colonie non estese; 2= diverse colonie che coprono superficie significativa di foglie e culmo.

##### **A3 Produzione**

Eliminazione regolare delle testate, misura della lunghezza della parcelle residue e loro raccolta con mietitrebbia parcellare o convenzionale; prelievo campione granella di circa 1 kg per determinazione umidità e peso ettolitrico.

### *Strip test (parcelloni)*

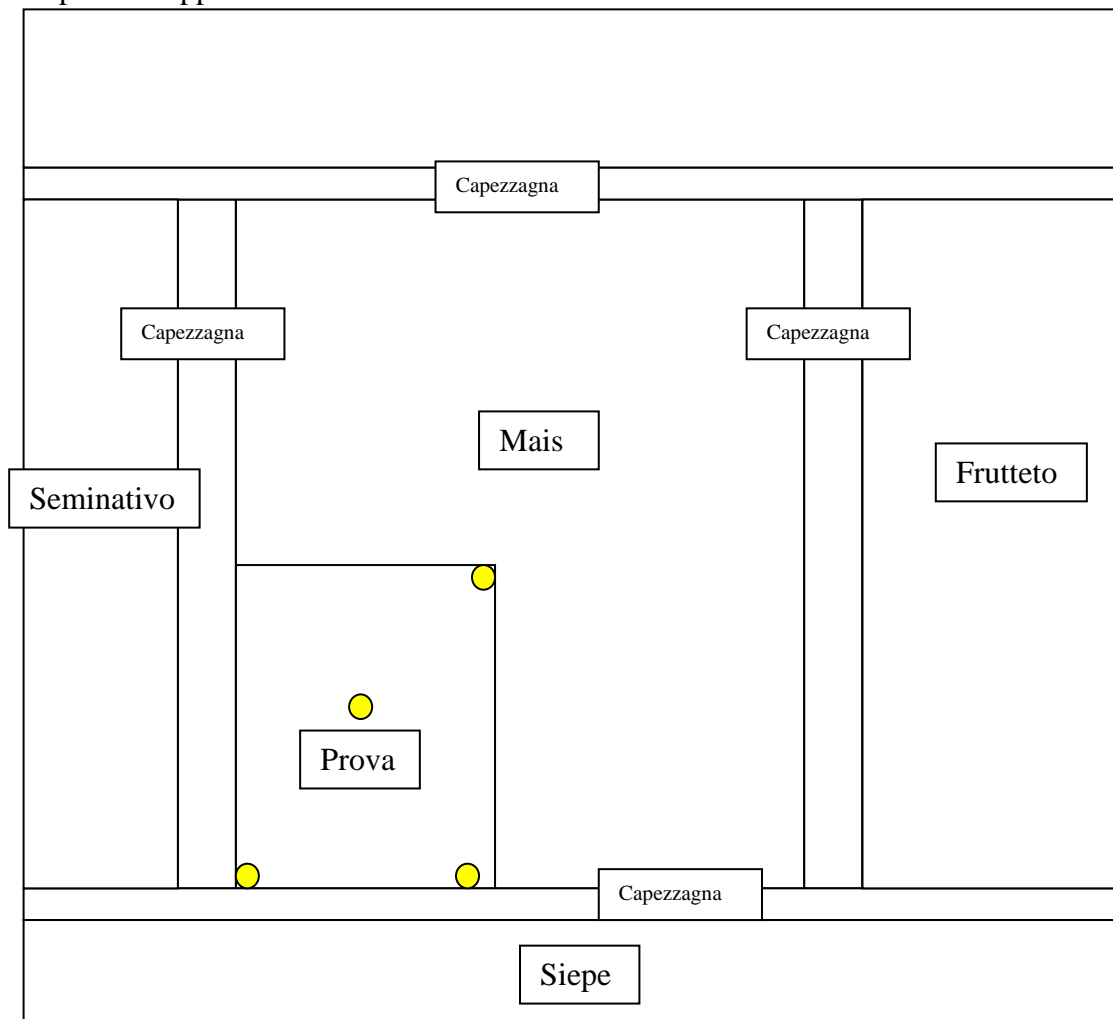
Come sopra ma le aree di saggio sono state almeno 2 sub-parcelle per ciascun parcellone, 20 m x 2 file, prese a caso lungo il parcellone, previa valutazione dell'omogeneità del parcellone stesso. Per le raccolte si è proceduto come sopra ma utilizzando mietitrebbie convenzionali e carri-pesa.

### **B) Entomologici**

La presenza delle specie vettori di virus (Delphacidae) e in particolare del nanismo ruvido (*L. striatellus*) è stata monitorata utilizzando trappole cromotropiche ed eseguendo campionamenti con retino nelle fasce inerbite attorno agli appezzamenti in prova e all'interno di quest'ultimi.

Per ogni appezzamento oggetto di studio sono state rilevate le coordinate geografiche, le dimensioni della parte seminata a mais, le distanze dai bordi, le piante presenti ai bordi per almeno 100-150 m. In particolare se non sono colture agrarie (es. siepi) sono state indicate le specie vegetali prevalenti.

Esempio di mappa



Ai bordi (in corrispondenza della fila più esterna del mais) e al centro dell'appezzamento in prova, dall'emergenza – 2-3 foglie vere, si sono poste almeno 4 trappole invischiata cromotropiche gialle Temo-o-cid Kollant con parte invischiata verso l'esterno. Le trappole sono state poste due per lato maggiore, perlomeno dai lati in cui vi è presenza di fasce inerbite o incolte, ad altezza da terra di circa 1 m. Le trappole sono state sostituite ogni 15-20 giorni avendo cura di ricoprirle con film di nylon trasparente e scrivendo su un angolo località, sigla della trappola (posizione – E – esterno o I interno, numero da 1 in su in senso orario partendo da testata) e data.

Dopo la sostituzione, le trappole sono state conservate in un luogo fresco e asciutto.

### Campionamenti con retino

Nel periodo agosto-settembre sono stati eseguiti campionamenti con retino da sfalcio e aspiratore entomologico nella fascia inerbita attorno agli appezzamenti in prova nonché al centro degli stessi (per ogni campionamento, all'esterno ed all'interno dell'appezzamento, sono stati eseguiti 60 sfalci della vegetazione con osservazione e cattura degli insetti ogni 10 battute) con osservazione successiva degli esemplari catturati al binoculare. Gli esemplari di *L. striatellus* campionati sono stati immersi in RNA later e successivamente conservati in freezer a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 1$  per successive analisi molecolari.

#### 7.1.5 Elaborazione dei dati

I dati sono stati elaborati mediante t test nel caso di due trattamenti a confronto e ANOVA con successivo test di Tukey (HSD) nel caso di tre e più trattamenti a confronto. I dati delle piante con sintomi di malattia sono stati trasformati in radice di  $x+0,5$  prima dell'analisi.

## 7.2 Risultati

### 7.2.1 Rilievi agronomici

#### Investimenti ed attacchi

Gli investimenti sono risultati buoni (Tabella 42) e, analogamente a quanto riscontrato in precedenti sperimentazioni, gli attacchi di fitofagi ipogei sono risultati irrilevanti o bassi in tutte le stazioni (Balconi *et al.*, 2010a, 2010b, 2011, Furlan *et al.* 1989, 2001, 2002, 2007, 2009, 2011a, 2011b, relazioni APENET 2009 e 2010).

**Tabella 42** - Effetto del tipo di ibrido e della concia sul seme sullo stato sanitario della coltura di mais; tutte le prove (parcellari e strip) ed epoche di semina (precoce-ordinaria, ritardata) considerate (13 prove, undici prima epoca, due seconda epoca).

I valori seguiti dalle stesse lettere non sono significativamente diversi al  $P < 0,05$  (Tukey).

|   | Investimento (pp/mq) |           | piante attaccate da elateridi |      | piante sintomi con nanismo ruvido 1° rilievo |      | piante sintomi nanismo ruvido (raccolta) |      |
|---|----------------------|-----------|-------------------------------|------|--|------|--|------|
|   | alla raccolta        | con spiga | pp/mq                         | %    | pp/mq  | %    | pp/mq                                    | %    |
| <i>sensibile DKC5276</i>                | 6,338                | 6,297     | 0,072                         | 1,13 | 0,012 a                                      | 0,19 | 0,016 a                                  | 0,25 |
| <i>sensibile DKC5276+poncho®</i>        | 6,502                | 6,470     | 0,045                         | 0,69 | 0,001 b                                      | 0,02 | 0,003 b                                  | 0,05 |
| <i>sensibile DKC5276+post emergenza</i> | 6,343                | 6,317     | 0,066                         | 1,04 | 0,005 ab                                     | 0,07 | 0,010 ab                                 | 0,16 |
| <i>tollerante DKC6666</i>               | 6,285                | 6,253     | 0,045                         | 0,72 | 0,001 b                                      | 0,02 | 0,004 b                                  | 0,06 |
| <i>tollerante DKC6666+poncho®</i>       | 6,476                | 6,445     | 0,041                         | 0,64 | 0,000 b                                      | 0,01 | 0,001 b                                  | 0,02 |
| <i>tollerante DKC6677</i>               | 6,391                | 6,338     | 0,047                         | 0,74 | 0,001 b                                      | 0,02 | 0,008 ab                                 | 0,13 |
| <i>tollerante DKC6677+poncho®</i>       | 6,469                | 6,438     | 0,044                         | 0,68 | 0,000 b                                      | 0,01 | 0,001 b                                  | 0,02 |
| <i>PR32G44 no insetticida</i>           | 6,232                | 6,138     | 0,062                         | 0,99 | 0,003 b                                      | 0,05 | 0,007 ab                                 | 0,11 |
| F (ANOVA)                               | 1,426                | 1,730     | 1,331                         |      | 4,066  |      | 3,318                                    |      |
| P                                       | 0,193                | 0,100     | 0,234                         |      | 0,000  |      | 0,002                                    |      |

In talune prove fallanze, localmente con densità apprezzabile, sono state causate da uccelli nella fase di emergenza – 3 foglie ma gli investimenti finali degli ibridi trattati con clothianidin non sono risultati statisticamente diversi da quelli non trattati. Comunque la densità di piante non appare un fattore in grado di aver inciso significativamente sui risultati dei diversi ibridi.

#### Fitofagi epigei

La presenza di fitofagi epigei (afidi, cicaline, altica) è stata molto bassa in tutti i campi sperimentali e mai tale da incidere significativamente sui risultati dei diversi ibridi. La pressione di piralide è

risultata bassa in tutte le parcelle di ogni sito (percentuale di piante spezzate sopra e sotto spiga inferiori al 5%) e quindi tale fattore si ritiene non possa avere determinato apprezzabile variabilità negli esperimenti.

### Nottue

Gli attacchi di nottue sono risultati assenti o trascurabili (<0,1% delle piante) in tutti i campi sperimentali e quindi non in grado di determinare variabilità.

### Incidenza virosi

L'incidenza delle piante con sintomi di nanismo ruvido è risultata molto bassa; la presenza dei sintomi è stata riscontrata in soli 2 appezzamenti su 11 ed è risultata di gran lunga inferiore al 1% delle piante osservate (Tabella 42) malgrado la scelta di appezzamenti con particolari fattori di rischio per la malattia. L'incidenza è risultata significativa, sia pur sempre contenuta, solo in un sito (Friuli, Premariacco, Tabelle 43, 44, e 45) ove la presenza della virosi era stata accertata anche per via analitica nel 2010 (Salvador, 2010).

In tale località l'effetto bordo è risultato significativo. L'ibrido ritenuto sensibile alle virosi ha effettivamente evidenziato una incidenza di piante con sintomi di virosi del nanismo ruvido significativamente superiore agli altri ibridi ritenuti tolleranti; la presenza di piante con sintomi è risultata decrescente dall'esterno verso l'interno (Tabella 46) in accordo con le osservazioni sulla malattia riportate in letteratura (Caciagli, 1991; Furlan *et al.*, 2009).

Il clothianidin utilizzato in concia ha ridotto significativamente l'incidenza della malattia (Tabelle 42, 43, 44); analoghi bassi livelli di incidenza della malattia sono stati riscontrati negli ibridi tolleranti anche non conciatati con l'insetticida.

Il trattamento insetticida di post emergenza ha evidenziato livelli inferiori di danno rispetto al testimone ma mai significativi all'analisi statistica.

L'incidenza della malattia è risultata inferiore nella prova seminata in seconda epoca (Tabella 45) pur rimanendo simili alla prima epoca gli effetti di ibridi e trattamenti.

Non sono state rilevate piante con sintomi di altri virus.

**Tabella 43** - Effetto del tipo di ibrido e della concia sul seme sullo stato sanitario del mais nella prova parcellare (prima e seconda epoca di semina) di Premariacco, Friuli ove è stata riscontrata la più elevata pressione della virosi del nanismo ruvido del mais.

I valori seguiti dalle stesse lettere non sono significativamente diversi al  $P < 0,05$  (Tukey).

|   | Investimento (pp/mq) |           | piante attaccate da elateridi |      | piante sintomi nanismo ruvido 1° rilievo |    | piante sintomi nanismo ruvido (racc.ta) |       |       |
|---|----------------------|-----------|-------------------------------|------|--|----|---|-------|-------|
|   | alla raccolta        | con spiga | pp/mq                         | %    | pp/mq                                    | %  | pp/mq                                   | %     |       |
| <i>sensibile DKC5276</i>                | 5,992                | 5,992     | 0,042                         | 0,70 | 0,086                                    | a  | 1,43                                    | 0,095 | 1,59  |
| <i>sensibile DKC5276+poncho®</i>        | 6,375                | 6,375     | 0,025                         | 0,39 | 0,010                                    | b  | 0,16                                    | 0,023 | 0,37  |
| <i>sensibile DKC5276+post emergenza</i> | 6,017                | 6,017     | 0,058                         | 0,97 | 0,030                                    | ab | 0,50                                    | 0,051 | 0,84  |
| <i>tollerante DKC6666</i>               | 5,808                | 5,808     | 0,092                         | 1,58 | 0,010                                    | b  | 0,18                                    | 0,027 | 0,47  |
| <i>tollerante DKC6666+poncho®</i>       | 6,358                | 6,358     | 0,042                         | 0,66 | 0,003                                    | b  | 0,04                                    | 0,008 | 0,12  |
| <i>tollerante DKC6677</i>               | 6,150                | 6,150     | 0,050                         | 0,81 | 0,008                                    | b  | 0,13                                    | 0,059 | 0,95  |
| <i>tollerante DKC6677+poncho®</i>       | 6,417                | 6,417     | 0,033                         | 0,52 | 0,003                                    | b  | 0,04                                    | 0,010 | 0,16  |
| <i>PR32G44 no insetticida</i>           | 6,108                | 6,108     | 0,058                         | 0,95 | 0,018                                    | b  | 0,30                                    | 0,042 | 0,68  |
| F (ANOVA)                               | 1,641                | 1,641     | 0,456                         |      | 2,160                                    |    |   |       | 1,407 |
| P                                       | 0,132                | 0,132     | 0,864                         |      | 0,044                                    |    |   |       | 0,210 |

**Tabella 44** - Effetto del tipo d'ibrido e della concia sul seme sullo stato sanitario del mais nella prova parcellare di prima epoca (1 aprile) di Premariacco, Friuli ove è stata riscontrata la più elevata pressione della virosi del nanismo ruvido del mais.

I valori seguiti dalle stesse lettere non sono significativamente diversi al  $P < 0,05$  (Tukey).

|   | Investimento (pp/mq) |           | piante attaccate da elateridi |      | piante sintomi nanismo ruvido 1° rilievo |      | piante sintomi nanismo ruvido (racc.ta) |      |
|---|----------------------|-----------|-------------------------------|------|--|------|---|------|
|   | alla raccolta        | con spiga | pp/mq                         | %    | pp/mq                                    | %    | pp/mq                                   | %    |
| <i>sensibile DKC5276</i>                | 5,917                | 5,917     | 0,067                         | 1,13 | 0,122 a                                  | 2,07 | 0,141 a                                 | 2,38 |
| <i>sensibile DKC5276+poncho®</i>        | 6,617                | 6,617     | 0,050                         | 0,76 | 0,003 b                                  | 0,04 | 0,029 a                                 | 0,43 |
| <i>sensibile DKC5276+post emergenza</i> | 6,067                | 6,067     | 0,083                         | 1,27 | 0,052 ab                                 | 0,28 | 0,091 a                                 | 1,51 |
| <i>tollerante DKC6666</i>               | 6,017                | 6,017     | 0,117                         | 1,93 | 0,018 b                                  | 0,09 | 0,052 a                                 | 0,79 |
| <i>tollerante DKC6666+poncho®</i>       | 6,583                | 6,583     | 0,067                         | 1,00 | 0,005 b                                  | 0,23 | 0,016 a                                 | 0,26 |
| <i>tollerante DKC6677</i>               | 6,033                | 6,033     | 0,067                         | 1,08 | 0,016 b                                  | 0,04 | 0,117 a                                 | 1,76 |
| <i>tollerante DKC6677+poncho®</i>       | 6,667                | 6,667     | 0,050                         | 0,82 | 0,003 b                                  | 0,47 | 0,018 a                                 | 0,30 |
| <i>PR32G44 no insetticida</i>           | 6,150                | 6,150     | 0,033                         | 0,55 | 0,029 ab                                 | 0,87 | 0,076 a                                 | 1,24 |
| F (ANOVA)                               | 1,992                | 1,992     | 0,319                         |      | 2,478                                    |      | 1,991                                   |      |
| P                                       | 0,077                | 0,077     | 0,942                         |      | 0,031                                    |      | 0,077                                   |      |

**Tabella 45** - Effetto del tipo d'ibrido e della concia sul seme sullo stato sanitario del mais nella prova parcellare di seconda epoca (27 aprile) di Premariacco, Friuli ove è stata riscontrata la più elevata pressione della virosi del nanismo ruvido del mais.

I valori seguiti dalle stesse lettere non sono significativamente diversi al  $P < 0,05$  (Tukey).

|   | Investimento (pp/mq) |           | piante attaccate da elateridi |      | piante sintomi nanismo ruvido 1° rilievo |      | piante sintomi nanismo ruvido (racc.ta) |      |
|---|----------------------|-----------|-------------------------------|------|--|------|---|------|
|   | alla raccolta        | con spiga | pp/mq                         | %    | pp/mq                                    | %    | pp/mq                                   | %    |
| <i>sensibile DKC5276</i>                | 6,067                | 6,067     | 0,017                         | 0,27 | 0,049                                    | 0,82 | 0,049                                   | 0,82 |
| <i>sensibile DKC5276+poncho®</i>        | 6,133                | 6,133     | 0,000                         | 0,00 | 0,018                                    | 0,30 | 0,018                                   | 0,30 |
| <i>sensibile DKC5276+post emergenza</i> | 5,967                | 5,967     | 0,033                         | 0,54 | 0,008                                    | 0,04 | 0,010                                   | 0,17 |
| <i>tollerante DKC6666</i>               | 5,600                | 5,600     | 0,067                         | 1,06 | 0,003                                    | 0,00 | 0,003                                   | 0,05 |
| <i>tollerante DKC6666+poncho®</i>       | 6,133                | 6,133     | 0,017                         | 0,27 | 0,000                                    | 0,00 | 0,000                                   | 0,00 |
| <i>tollerante DKC6677</i>               | 6,267                | 6,267     | 0,033                         | 0,55 | 0,000                                    | 0,04 | 0,000                                   | 0,00 |
| <i>tollerante DKC6677+poncho®</i>       | 6,167                | 6,167     | 0,017                         | 0,28 | 0,003                                    | 0,13 | 0,003                                   | 0,04 |
| <i>PR32G44 no insetticida</i>           | 6,067                | 6,067     | 0,083                         | 1,49 | 0,008                                    | 0,14 | 0,008                                   | 0,13 |
| F (ANOVA)                               | 1,964                | 1,964     | 1,072                         |      | 0,509                                    |      | 0,4895                                  |      |
| P                                       | 0,082                | 0,082     | 0,397                         |      | 0,823                                    |      | 0,8372                                  |      |

**Tabella 46** - Incidenza di piante con sintomi di nanismo ruvido del mais a distanze crescenti dal prato stabile con l'appezzamento a mais nella prova di Premariacco, Friuli.

I valori seguiti dalle stesse lettere non sono significativamente diversi al  $P < 0,05$  (Tukey)..

| distanza media da prato stabile (m) | piante con sintomi nanismo ruvido per 48 m <sup>2</sup> |
|-------------------------------------|---|
| 1                                   | 25,3 a  |
| 4                                   | 15,0 ab   |
| 16                                  | 6,5 b   |
| F (ANOVA)                           | 9,138   |
| P                                   | 0,015   |



### Produzioni

Per quanto concerne le produzioni (essendo allo stato attuale le raccolte in fase di completamento), i dati relativi ad oltre l'80% delle prove (Tabella 47) evidenziano differenze contenute e non statisticamente significative tra ibridi trattati e non trattati con il conciante insetticida. Ciò conferma quanto emerso dai dati pubblicati nell'ultimo decennio sull'effetto dei concianti sulle produzioni con diverse condizioni agronomiche e di pressione dei parassiti (Tabella 48), che indicano come la concia non sia un fattore produttivo "forte", incisivo sul risultato finale della coltura del mais, poiché in nessuna pubblicazione le differenze produttive (limitate a pochi quintali) tra sementi trattate e non trattate con neonicotinoidi o fenilpirazoli risultano statisticamente significative.

Considerando i concianti nel loro insieme, o i concianti senza clothianidin, gli incrementi produttivi registrati negli ultimi anni sono nulli o trascurabili anche in presenza di forte pressione di diabrotica. Anche clothianidin tende a dare incrementi produttivi in condizioni di basse pressioni di fitofagi (largamente le più diffuse) e il suo effetto risulta leggermente più marcato con forte pressione di diabrotica; tale trattamento dovrebbe tuttavia trovare soluzione con l'applicazione della lotta integrata (obbligatoria dal 2014).

**Tabella 47** - Effetti dell'uso dei concianti sulla produzione di mais nella sperimentazione 2011. Dati medi di 10 prove.

I valori con almeno una lettera in comune non sono significativamente diversi al  $P < 0,05$  (Tukey).

|   | q/ha 14%   |
|---|------------|
| <i>sensibile DKC5276</i>                | 114,097 b  |
| <i>sensibile DKC5276+poncho®</i>        | 118,696 ab |
| <i>sensibile DKC5276+post emergenza</i> | 114,796 b  |
| <i>tollerante DKC6666</i>               | 117,972 ab |
| <i>tollerante DKC6666+poncho®</i>       | 121,293 ab |
| <i>tollerante DKC6677</i>               | 124,006 ab |
| <i>tollerante DKC6677+poncho®</i>       | 127,077 a  |
| <i>PR32G44 no insetticida</i>           | 120,868 ab |
| F (ANOVA)                               | 3,409      |
| P                                       | 0,002      |

### 7.2.2 Rilievi entomologici

Sulla base delle catture rilevate con il retino da sfalcio (Tabella 49) e dalle prime osservazioni delle trappole cromotropiche (il cui completo esame richiederà ancora molte giornate di lavoro) la presenza delle specie vettrici di virus (Delphacidae) e in particolare del nanismo ruvido (*L. striatellus*) è in pratica ubiquitaria. Infatti è stata individuata in tutte le fasce inerbite contermini agli appezzamenti in prova. Tuttavia, la tendenza della specie a entrare negli appezzamenti appare scarsa poiché difficilmente si riescono a catturare esemplari all'interno. L'insetto normalmente colonizza temporaneamente le piante delle file più perimetrali.

**Tabella 48** - Effetti dell'uso dei concianti sulla produzione di mais negli articoli ad oggi pubblicati inclusi dati APENET 2009 – 2010.

n.d.: non disponibile

| REGIONE                    | AUTORI  | periodo   | ibrido                 | numerosità<br>a<br>località/ripetizioni<br>(+bassa,<br>+++++elevata) | Pressione<br>diabrotica<br>(+bassa,<br>+++++elevata) | solo<br>fungicida | fungicida<br>+<br>concianti<br>insetticidi | differenza<br>insetticidi<br>vs solo<br>fungicida | % su test | Significatività<br>statistica | fung. +<br>concianti<br>senza<br>poncho | differenza<br>concianti<br>senza<br>poncho vs<br>solo<br>fungicida | % su test | Significatività<br>statistica | fungicida<br>+<br>poncho | differenza<br>poncho vs<br>solo<br>fungicida | % su test | Significatività<br>statistica |
|----------------------------|---|-----------|------------------------|--|--|-------------------|--|---|-----------|-------------------------------|---|--|-----------|-------------------------------|--------------------------|--|-----------|-------------------------------|
|                            |   |           |                        |  |  | t/ha 14%          | t/ha 14%                                   | t/ha 14%  |           |                               | t/ha 14%                                | t/ha 14%   |           |                               | t/ha 14%                 | t/ha 14%                                     |           |                               |
| Veneto                     | Furlan et al., 2007                               | 2003-2006 | Tevere<br>DKC,<br>6530 | +++  | no   | 12,43             | 12,17                                      | -0,264  | -2,12     | no                            | 12,166                                  | -0,264   | -2,12     | no                            | no                       | no   | no        | no                            |
| Veneto                     | Furlan et al., 2007                               | 2006      | DKC 6530               | ++   | no   | 11,59             | 11,42                                      | -0,170  | -1,47     | no                            | 11,470                                  | -0,120   | -1,04     | no                            | 11,170                   | -0,420                                       | -3,62     | no                            |
| Pianura Padana             | Furlan et al., 2007                               | 2006      | DKC 6530               | +  | si++   | 7,96              | 7,79                                       | -0,170  | -2,14     | no                            | 7,650                                   | -0,310   | -3,89     | no                            | 8,070                    | 0,110  | 1,38      | no                            |
| Pianura Padana,<br>Toscana | Boicelli, 2007                                    | 2000-2006 | Tevere<br>DKC 6530     | +++++  | si+  | n.d               | n.d.                                       | 0,300   | 2,00      | no                            | n.d                                     | 0,300  | 2,00      | no                            | n.d                      | n.d  | n.d.      | n.d.                          |
| Veneto                     | Furlan et al., 2009                               | 2007-2008 | DKC 6530               | ++   | no   | 10,90             | 10,57                                      | -0,332  | -3,05     | no                            | 10,510                                  | -0,390   | -3,58     | no                            | 10,740                   | -0,160                                       | -1,47     | no                            |
| Veneto                     | Furlan et al., 2009                               | 2007-2008 | mess, Kla              | ++   | no   | 12,68             | n.d  | n.d.  | n-d       | n.d.                          | n.d.                                    | n.d.   | n.d.      | n.d.                          | 12,950                   | 0,270  | 2,13      | no                            |
| Lombardia                  | Agosti et al., 2009                               | 2007-2008 | PR33A46                | +  | si++++   | 12,71             | 13,61                                      | 0,907   | 7,14      | no                            | 13,371                                  | 0,665  | 5,23      | no                            | 13,855                   | 1,149  | 9,04      | no                            |
| Lombardia                  | Agosti et al., 2010                               | 2009-2010 | PR32G44                | +  | si++++   | 11,39             | 11,84                                      | 0,454   | 3,99      | no                            | 11,487                                  | 0,100  | 0,88      | no                            | 12,294                   | 0,907  | 7,97      | no                            |
| Pianura Padana,<br>Toscana | Balconi et al.,<br>2010; Relazione<br>APENET 2009 | 2009      | PR31N27                | ++++   | no   | 13,30384          | 13,18593                                   | -0,12   | -0,89     | no                            | 13,14663                                | -0,16  | -1,18     | no                            | 13,43157                 | 0,13   | 0,96      | no                            |
| Pianura Padana,<br>Toscana | Balconi et al.,<br>2011; Relazione<br>APENET 2009 | 2010      | PR32G44                | ++++   | no   | 12,98942          | 13,35297                                   | 0,37  | 2,8       | no                            | 13,28419                                | 0,3  | 2,27      | no                            | 13,57895                 | 0,6  | 4,54      | no                            |
|                            |   |           |                        |  |  | MEDIA             |  | 0,108   | 0,696     |                               |   | 0,013  | -0,159    |                               |                          | 0,323  | 2,616     |                               |

**Tabella 49** - Individui di *Laodelphax striatellus*, vettore del nanismo ruvido del mais, rinvenuti nei diversi siti sperimentali mediante sfalcio con retino e aspiratore entomologico. Totale esemplari catturati con 60 sfalci della vegetazione con osservazione e cattura degli insetti ogni 10 battute.

| Regione  | Azienda           | Data campionamento | Individui di <i>Laodelphax striatellus</i> |                      |
|----------|-------------------|--------------------|--|----------------------|
|          |                   |                    | Esterno appezzamento                       | Interno appezzamento |
|          |                   |                    |  |                      |
| Friuli   | De Sabbata        | 09/08/2011         | 19   | 0                    |
| Friuli   | Panigutti         | 09/08/2011         | 10   | 0                    |
|          |                   |                    |  |                      |
| Veneto   | Bogoni            | 11/08/2011         | 0  | 0                    |
| Veneto   | Florian           | 11/08/2011         | 5  | 0                    |
| Veneto   | Sasse Rami        | 22/08/2011         | 2  | 0                    |
| Veneto   | Diana             | 22/08/2011         | 7  | 0                    |
| Veneto   | Vallevecchia      | 11/08/2011         | 4  | 0                    |
| Veneto   | Moizzi            | 11/08/2011         | 1  | 0                    |
|          |                   |                    |  |                      |
| Piemonte | Cavour-Bertinetti | 20/07/2011         | 4  | 0                    |
| Piemonte | Cavour-Bertinetti | 25/07/2011         | 3  | 0                    |
| Piemonte | Cavour-Bertinetti | 05/08/2011         | 15   | 0                    |
| Piemonte | Cavour-Bertinetti | 17/08/2011         | 6  | 0                    |
| Piemonte | Cavour-Bertinetti | 30/08/2011         | 3  | 0                    |
| Piemonte | Cavour-Bertinetti | 26/08/2011         | 2  | 0                    |

### 7.3 Conclusioni

La sperimentazione, pur limitata ad una sola stagione vegetativa, appare particolarmente indicativa almeno per tre aspetti: 1) l'incidenza delle virosi appare bassa e limitata ad areali specifici come emerso nel passato, ove vi è significativa presenza della malattia; 2) il clothianidin utilizzato come conciante su ibridi sensibili riesce a ridurre significativamente l'incidenza del nanismo ruvido anche su ibridi sensibili; 3) analoga riduzione dell'incidenza della malattia può essere raggiunta utilizzando ibridi resistenti senza utilizzare insetticidi. La presenza delle specie vettrici di virus (Delphacidae) e in particolare del nanismo ruvido (*L. striatellus*) è ubiquitaria. La specie infatti è stata individuata in tutte le fasce inerbite contermini agli appezzamenti in prova. Tuttavia, la tendenza della specie a entrare negli appezzamenti appare scarsa poiché difficilmente si riescono a catturare esemplari all'interno. Si conferma uno scarso effetto, statisticamente non significativo, della concia insetticida sulle produzioni del mais da granella.

### *Bibliografia citata*

- Caciagli P, 1991 – Recent observations on the epidemiology of maize rough dwarf virus. *Phytoparasitica* 19(3): 240 (abs).
- Furlan L., Caciagli P., Causin R., Di Bernardo A., 2009 - Il seme di mais va protetto solo quando serve. *L'Informatore Agrario*, 5: 36–44.
- Salvador C., 2010 - Artropodofauna dell'agroecosistema a mais in relazione a diverse tecniche di coltivazione. Tesi di laurea, Università di Trieste.

## 8. Interazioni sinergiche tra agenti di stress e collasso delle colonie d'api

### 8.1 Introduzione

Vari autori hanno ipotizzato che i recenti fenomeni di morie di api registrati anche in Italia derivino dalle interazioni fra patogeni e altri fattori di stress, come parassiti.

Per chiarire quest'aspetto è stato svolto uno studio su alveari in cui il collasso è stato indotto dall'infestazione progressiva da parte dell'acaro parassita *Varroa destructor*. Allo scopo sono stati installati, in una località isolata, due apiari, uno trattato con i metodi acaricidi convenzionali, l'altro non trattato. Le colonie sono state seguite per tutta la stagione eseguendo osservazioni periodiche sulla consistenza della famiglia, l'infestazione della stessa, la mortalità delle api e la prevalenza dei principali patogeni delle api. Parallelamente sono state svolte indagini di laboratorio volte a confermare gli effetti osservati in campo, oltre ad indagini trascrittomiche aventi per oggetto i geni della difesa immunitaria dell'ape. È stato così possibile accertare che, nelle condizioni della prova, il collasso della colonia è determinato da una netta impennata della mortalità delle api che si registra all'inizio dell'autunno in concomitanza con l'aumento del numero di copie genomiche del virus delle ali deformi (DWV); contemporaneamente sono stati registrati gravi effetti a carico dell'espressione di geni-chiave del sistema immunitario dell'ape.

Nel complesso, i risultati suggeriscono che la *Varroa* eserciti un effetto sinergico nei confronti del DWV, provocando, tramite l'influsso sulle difese immunitarie dell'ape, la transizione da innocue infezioni latenti a disastrose esplosioni virali (lavoro inoltrato alla rivista *Science* e attualmente in fase di valutazione da parte dei revisori).

La sensibilità dei fattori immunitari, individuati mediante questo studio, rispetto a vari agenti di stress ambientale, suggerisce la possibilità che non solo le parassitosi ma anche stress determinati da carenze nutrizionali o dosi subletali di pesticidi possano interferire con la difesa nei confronti degli organismi patogeni e causare, quindi, conseguenze nocive sulla salute delle api (Desneaux *et al.*, 2007; Mullin *et al.*, 2010).

Le prove qui riportate puntano a valutare, in condizioni controllate di laboratorio, l'impatto dell'agrofarmaco neonicotinoide clothianidin sulla replicazione del DWV e sulla sopravvivenza delle api esposte a dosi fino a 15 volte inferiori ai valori di DL<sub>50</sub> ufficialmente riportati. I dati ottenuti indicano che, nelle condizioni del presente studio, clothianidin è capace di indurre la proliferazione di virus latenti, associata a percentuali di mortalità maggiori di quelle attese.

Poiché la risposta immunitaria antivirale, analogamente a numerose reazioni ad agenti di stress biotico e abiotico, è modulata anche dalla via di segnalazione Toll (Zambon *et al.*, 2005; Sabin *et al.*, 2010), si è voluto valutare l'impatto di clothianidin su di essa, utilizzando linee transgeniche di *Drosophila melanogaster*. I risultati ottenuti indicano che il neonicotinoide in esame influenza negativamente tale attivazione trascrizionale di molecole antimicrobiche.

### 8.2 Materiali e metodi

Da una colonia di api in buono stato di salute è stato prelevato un telaino di covata con cellette opercolate, ponendolo in incubatore a temperatura e umidità controllata (34 °C, 80% U.R.). Dopo 12 ore è stata prelevata la quantità necessaria di api neosfarfallate coetanee per lo svolgimento dell'esperimento. Le api sono state divise in 8 gruppi di 30 e inserite in appositi contenitori (Figura 42), secondo il protocollo definito da Evans *et al.* (2009), previa applicazione sulla superficie del torace di 1 µl di acetone, come controllo, o di una soluzione di acetone contenente quantitativi di clothianidin compresi fra 3 ng e 50 ng.

Ogni gruppo di api è stato alimentato con sciroppo zuccherino e proteico, fornito *ad libitum*, e mantenuto in incubatore alle condizioni sopra indicate. Dopo 12, 24 e 48 ore dal trattamento, per ogni tesi sperimentale, sono state contate ed eliminate le api morte; 5 api vive sono state prelevate e riposte a -80 °C per le successive analisi. La prova così descritta è stata replicata due volte.

Nelle api vive è stato quantificato il livello d'infezione da DWV mediante Real-time RT-PCR, seguendo un protocollo consolidato (Chen *et al.*, 2005). La DL<sub>50</sub> è stata calcolata dai dati sperimentali mediante "Probit-analysis" (Finney, 1971).

La *Drosophila* rappresenta un importante sistema modello per lo studio dei meccanismi di base e dell'evoluzione dell'immunità negli insetti (Lemaitre & Hoffmann, 2007). In *Drosophila* sono state prodotte linee transgeniche esprimenti la proteina GFP sotto il controllo dei promotori di differenti geni codificanti per peptidi antimicrobici (AMP) (Tzou *et al.*, 2000). L'utilizzo di tali linee consente di analizzare gli effetti sulla risposta immunitaria mediata dalle vie di segnalazione Toll e/o IMD attraverso la quantificazione della fluorescenza emessa dalla GFP, usata come indicatore del livello di attivazione trascrizionale dei differenti geni AMP. Per valutare gli effetti di clothianidin (agrofarmaco neonicotinoide) sulla risposta immunitaria è stata utilizzata la linea transgenica di *Drosophila* esprime la proteina GFP fusa con il peptide antimicrobico drosomicina sotto il controllo del promotore specifico del gene della drosomicina (drs-GFP). L'attivazione di tale gene chimerico è sotto il controllo della via di segnalazione di Toll, pertanto l'inibizione di tale via può essere visualizzata mediante assenza o riduzione di fluorescenza prodotta dalla GFP.

Poiché l'effetto più marcato sulle api è stato osservato in corrispondenza della DL<sub>50</sub>, si è provveduto a trattare le larve sperimentali di *Drosophila* con tale concentrazione. La definizione della DL<sub>50</sub> per *Drosophila melanogaster* è stata eseguita su larve di 3<sup>a</sup> età, opportunamente trattate con differenti dosi di p.a. (da 1 a 100 ng/larva) di una popolazione selvatica, allevata su dieta artificiale in condizioni di temperatura costante (25 °C). A 24 ore dall'esposizione sono stati isolati e contati gli individui morti. Il calcolo della DL<sub>50</sub> è stato fatto come indicato in precedenza.

L'esperimento con la linea transgenica *Drosophila* è stato eseguito come segue: larve al terzo stadio di sviluppo sono state singolarmente trattate con 1 µl di acetone contenente clothianidin, ad una concentrazione pari alla DL<sub>50</sub>. Le larve sono state quindi singolarmente infettate mediante puntura con un ago di tungsteno, in precedenza immerso in una soluzione concentrata di muffe, e incubate a 21 °C. Dopo 4 ore le larve sono state osservate mediante microscopia ad epifluorescenza. Come controllo, larve al terzo stadio di sviluppo sono state trattate solo con acetone e successivamente infettate e incubate nello stesso modo e per lo stesso tempo di quelle trattate con clothianidin.



**Figura 42** – Isolatori utilizzati per il mantenimento delle api trattate.

### 8.3 Analisi statistica

I risultati della quantificazione del DWV sono stati espressi come media delle copie virali presenti in ogni singola ape, per ogni dose di agrofarmaco, a 12, 24 e 48 ore dal trattamento. I dati sperimentali sono stati analizzati con i test statistici Kruskal-Wallis e Dunn's Multiple Comparison Test. Per la *Drosophila*, i risultati sono stati espressi come percentuale di larve con fluorescenza intensa, le differenze sono state analizzate mediante il test statistico del chi-quadro ( $\chi^2$ ).

Tutte le analisi sono state eseguite con il pacchetto statistico "Prism 5.0c" (GraphPad Software, Inc.).

## 8.4 Risultati

La Figura 43 mostra la quantità di DWV in api trattate con diverse dosi di clothianidin, a diversi tempi dopo il trattamento. Le api non sopravvivono alle dosi 30 e 40 ng/ape a 48 ore dal trattamento. Il livello di DWV, alle dosi 10 e 20 ng/ape aumenta significativamente con il trascorrere del tempo. Alla dose 3 ng/ape e nel testimone, non vengono rilevate differenze significative.

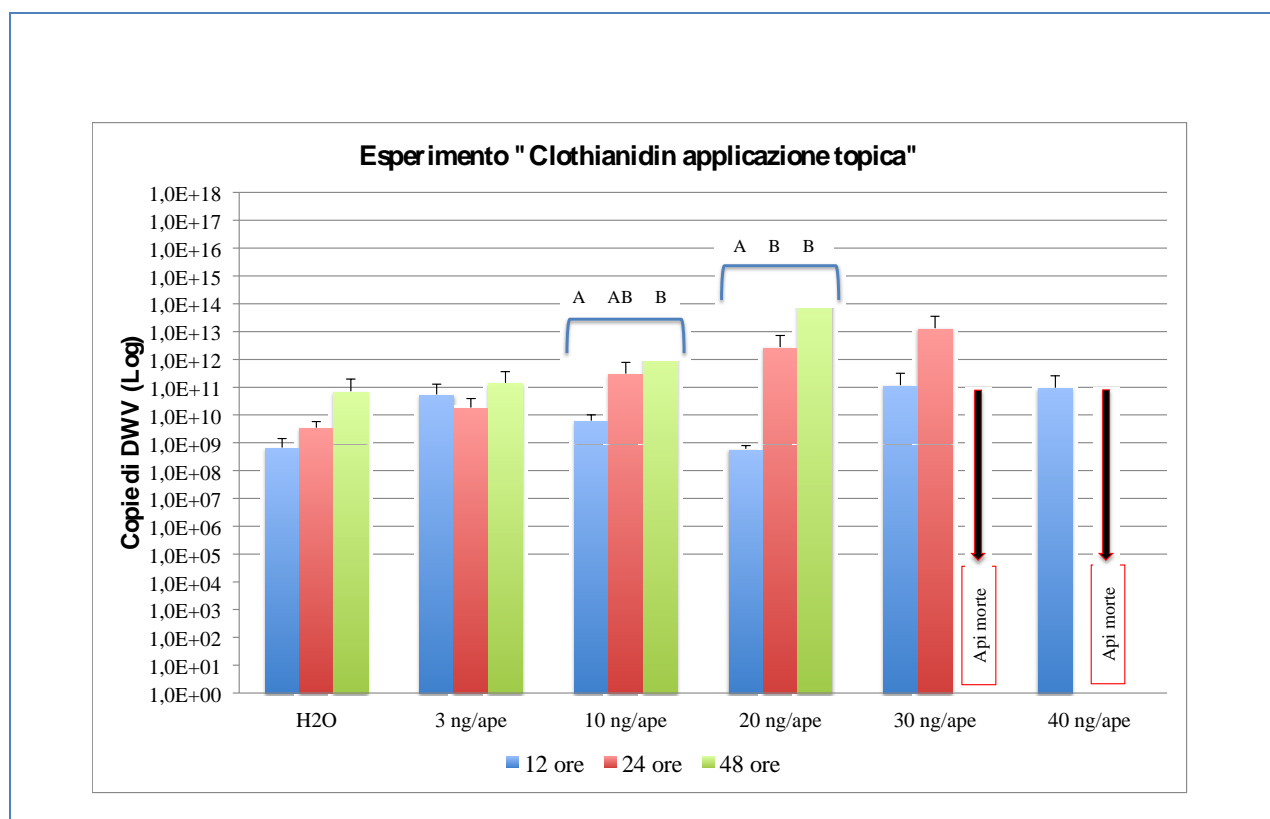
E' importante notare che le differenze quantitative osservate, oltre ad essere statisticamente significative, sono, in termini assoluti, assai rilevanti, anche se la scala logaritmica adottata nella rappresentazione grafica non ne consente un'immediata percezione. Se si considera il rapporto fra le cariche virali delle api trattate con clothianidin e quelle testimoni, tale valore è pari a circa 100, per la dose di 10 ng e a 1000, per la dose di 20 ng.

Le curve di sopravvivenza delle api esposte a diversi quantitativi di clothianidin (Figura 44) consentono il calcolo di una  $DL_{50}$  sperimentale di 18,89 ng/ape (Figura 45), pari a circa la metà di quella ufficialmente riportata (EC working document, 2005).

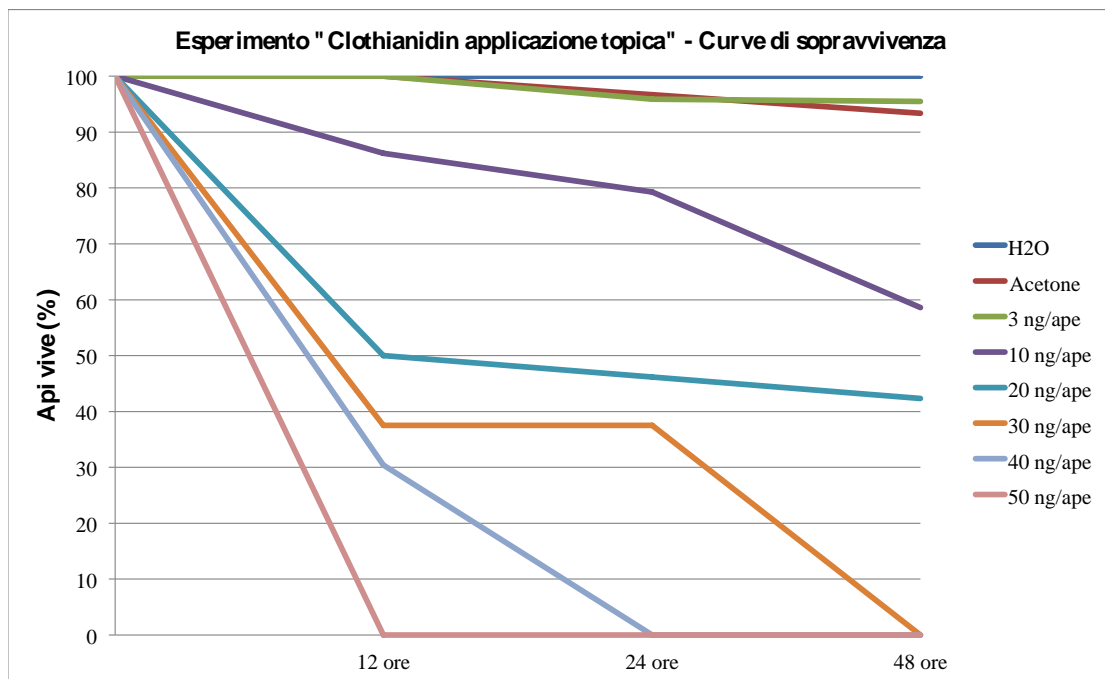
Per la *Drosophila*, in via preliminare, è stata stimata la  $DL_{50}$  su larve di 3<sup>a</sup> età di una popolazione selvatica della mosca, opportunamente trattate con differenti dosi di p.a. (da 1 a 100 ng/larva). La  $DL_{50}$  a 24h è stata stimata pari a 42,53 ng/larva.

Il trattamento delle larve con 40 ng di clothianidin riduce sensibilmente l'espressione del gene *drs*-GFP, in quanto solo il 20% delle larve mostra un alto livello di fluorescenza della GFP, mentre nel restante 80% la fluorescenza della GFP è molto bassa o assente (Figura 46). Tali valori sono significativamente diversi da quelli registrati nei controlli ( $\chi^2 = 7,500$ ;  $df=1$ ;  $p=0,0062$ ), dove una fluorescenza molto forte si registra in circa l'80% delle larve (Figura 47).

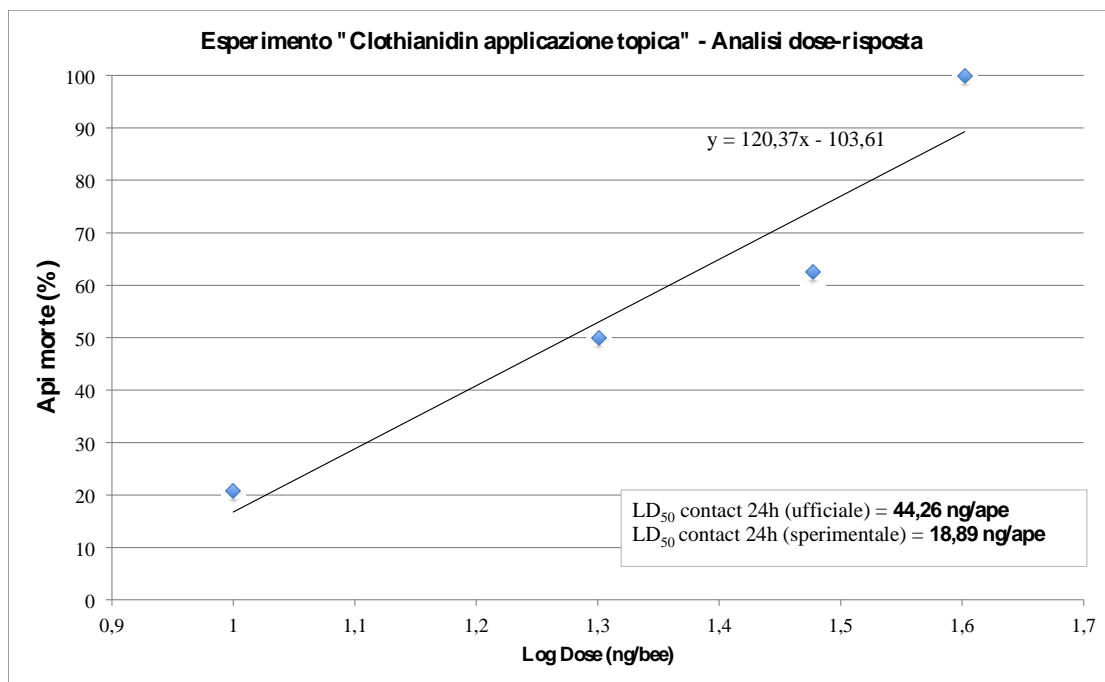
Poiché l'espressione del transgene *drs*-GFP è attivata dalla via di segnalazione di Toll, la riduzione della sua espressione nelle larve trattate con 40 ng di clothianidin indica che tale insetticida inibisce la funzione di un componente di tale via.



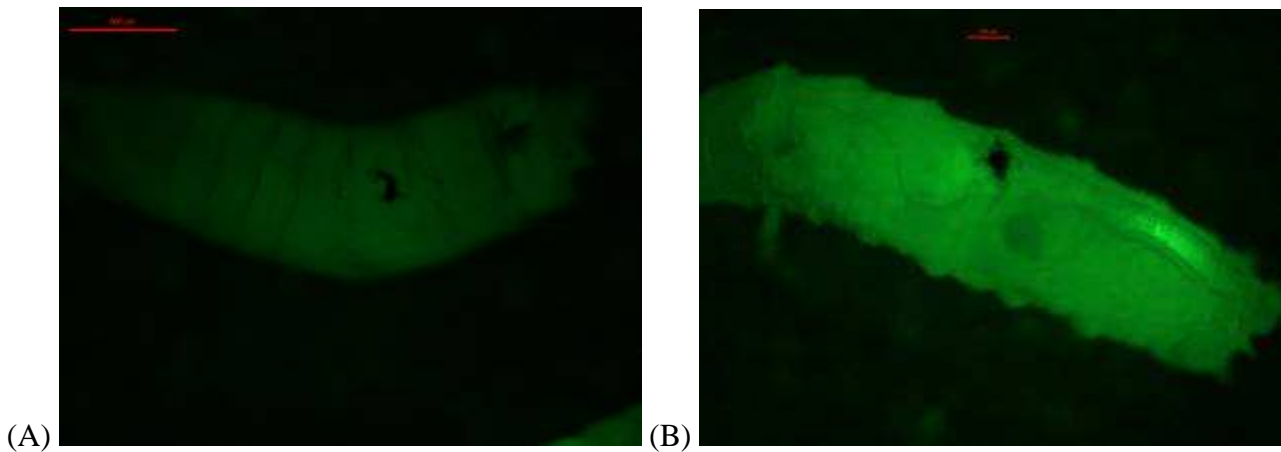
**Figura 43** – Quantificazione relativa di DWV in api trattate con clothianidin. Per la dose 10 ng/ape  $p=0,0192$  (ANOVA, Kruskal-Wallis Test); per la dose 20 ng/ape  $p=0,0022$  (ANOVA, Kruskal-Wallis Test).



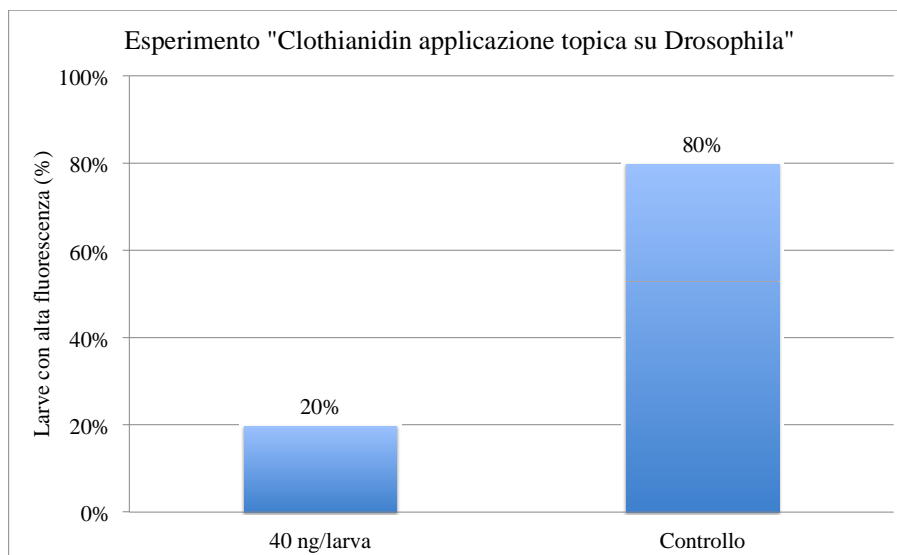
**Figura 44** – Curve di mortalità delle api trattate con clothianidin.



**Figura 45** – Analisi dose-risposta di api trattate con clothianidin.



**Figura 46** – Livello di espressione di GFP in larve di *Drosophila* trattate con 40 ng di clothianidin (A) e controllo (B).



**Figura 47** – Frequenza relativa di larve di *Drosophila* mostranti elevati livelli di espressione di GFP.

## 8.5 Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che clothianidin è in grado di promuovere la proliferazione di DWV, comunemente presente nelle api in condizioni di infezione latente, con ovvie conseguenze negative sulla sopravvivenza. L'effetto negativo di tale insetticida sulla modulazione della risposta mediata dalla via di segnalazione Toll, consente di formulare un'ipotesi esplicativa delle proliferazioni di infezioni latenti di DWV osservate in api esposte a clothianidin. L'entità dell'impatto negativo derivante da tale incremento indotto della carica virale dipende, ovviamente, dallo stato di infezione al momento dell'esposizione a questo principio attivo e dalle altre condizioni di stress (parassiti, alimentazione, ecc.) che influenzano il livello delle difese immunitarie. Ciò consente anche di fornire una parziale spiegazione della variabilità dei dati tossicologici registrati nei diversi studi effettuati. Pertanto, nella valutazione degli effetti sulle api di clothianidin e di altri agrofarmaci è importante considerare quest'ulteriore aspetto di tossicità indiretta, il cui esito finale può variare in funzione dello stato di salute delle colonie.



### *Bibliografia citata*

- Chen Y. P., Higgins J. A., Feldlaufer M. F., 2005 - Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol.* 71:1 pp. 436-41.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J., 2007 - The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52(1): 81–106.
- Evans J.D., Chen Y.P., Di Prisco G., Pettis J.S., Williams, V., 2009 - Bee cups: Single-use cages for honey bee experiments. *J. Apicultural Res*, 48(4): 300-302.
- European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 2005. Directorate D - Food Safety: Production and distribution chain - Unit D.3 - Chemicals, contaminants and pesticides: Clothianidin.
- Finney D.J., 1971 - *Probit Analysis* (3rd edition). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Lemaitre B., Hoffmann J., 2007 - The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697–743.
- Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashcraft S., Simonds R., van Engelsdorp D., Pettis J.S., 2010 - High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE*, 5(3): e9754.
- Sabin L.R., Hanna S. L., Cherry S., 2010 - Innate antiviral immunity in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 4-9.
- Tzou P., Ohresser S., Ferrandon D., Capovilla Reichhart J., Lemaitre B., Hoffmann J.A., Imler, J., 2000 - Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*, 13: 737–748.
- Zambon R. A., Nandakumar M., Vakharia V. N., Wu L. P., 2005 - The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *PNAS* 102, 7257-7262.

## Considerazioni conclusive relative ai diversi aspetti indagati

### Dati 2010 (risultati non discussi nella relazione precedente)

Le sperimentazioni sull'**utilità agronomica e produttiva** della concia del mais mediante il confronto fra i diversi parametri agronomici rilevati – tra cui la produzione di granella -, non ha messo in evidenza differenze significative fra trattato (concianti) e controllo (solo fungicida) per i diversi caratteri esaminati, anche a causa della notevole variabilità dei risultati ottenuti nelle varie località e tra i diversi p.a. conciati. Elaborando i dati località per località, in 6 delle 19 totali (quindi nel 31,5% dei casi), si sono notate delle differenze significative (in positivo o in negativo) nelle produzioni tra una o più tesi conciati rispetto al testimone o agli stessi altri conciati. Nel complesso, tuttavia, la semente trattata con clothianidin ha mostrato un incremento medio produttivo di quasi il 5% (al 15.5% U.R.) rispetto al controllo.

Non è possibile fare confronti con i risultati ottenuti nella precedente sperimentazione in quanto l'ibrido commerciale inviatoci da Assosementi per le prove 2010 è diverso da quello fornitoci nella prova precedente; si tratta infatti dell'ibrido commerciale PR32G44- FAO 600 anziché dell'ibrido PR31N27-FAO 700. Tale sostituzione di ibrido potrebbe aver determinato un'interazione genotipo-ambiente, diversa e non confrontabile con quanto osservato lo scorso anno, anche in risposta all'utilizzo della concia insetticida.

Nelle prove agronomiche condotte in Veneto utilizzando la tecnica *strip-test* (parcelloni adiacenti), le differenze tra le produzioni medie dei diversi trattamenti (controllo e conciati) non sono risultate statisticamente significative, malgrado la percentuale di piante attaccate dai parassiti siano risultate significativamente superiori nel testimone rispetto ai trattati.

I rilievi delle **popolazioni larvali**, monitorati con le trappole a feromoni per elateridi, ha messo in evidenza che l'attacco grave di fitofagi ipogei su mais (in grado di influire sulla produzione) è un evento raro; gli investimenti sono stati buoni e gli attacchi inferiori o di poco superiori all'1% delle piante includendo anche le piante con sintomi facilmente reversibili (strisce gialle). I risultati del monitoraggio con trappole a feromoni per elateridi e diabrotica ottenuti negli appezzamenti delle regioni Lombardia, Piemonte e Veneto indicano una notevole variabilità tra le località, per quanto riguarda le catture delle diverse specie di adulti (*Agriotes brevis*, *Agriotes sordidus*, *Agriotes litigiosus*, *Diabrotica virgifera*). Ciò indica la possibilità di applicare una lotta integrata differenziando le aree a seconda dei livelli di rischio.

La valutazione, in pieno campo, dell'effetto dell'**esposizione diretta alle polveri** emesse dalla seminatrice durante la semina di mais conciato con i diversi p.a. sulle api in volo, ha confermato i risultati preliminari del 2010: le polveri emesse della seminatrice sono sufficienti a uccidere le api, senza che l'intossicazione sia mediata dall'assunzione di cibo contaminato.

### Dati 2011

Sulla base della rete di monitoraggio APENET, la **mortalità invernale** 2010/11 si è attestata al 22,48%. Il dato non si discosta da quanto rilevato nell'inverno 2009/10 sia attraverso la rete APENET (17,6%, 113 alveari morti su 753), sia attraverso la somministrazione di questionari (19,5%, 2.437 alveari morti su 12.933).

Per quanto riguarda il **sistema delle segnalazioni**, nella primavera 2010 nessuna segnalazione ha riguardato aree maidicole. In nessuna delle stazioni di monitoraggio si sono verificati fenomeni rilevanti.

Le modifiche messe a punto sulle **seminatrici (filtri antipolline)** sono in grado di aumentare in modo significativo la capacità di abbattimento delle polveri mostrata dai semplici deflettori dell'aria. I dati attualmente a disposizione mostrano che, nella migliore delle ipotesi, si è passati da percentuali di abbattimento delle deposizioni a terra intorno al 50 % osservate per i deflettori (prove 2009 e 2010) al 76% per clothianidin, al 89,5% per thiamethoxam, al 90% per imidacloprid e al 95,2% per fipronil. Tuttavia, una parte della frazione più sottile della polvere (inferiore a 4-5  $\mu\text{m}$ ) sfugge ai filtri impiegati: osservando l'andamento delle concentrazioni in funzione della distanza, essa tenda a persistere nell'aria ed è in grado di giungere a distanze notevoli.

Per quanto riguarda l'**effetto sulle api** delle polveri emesse dalla seminatrice dotata di filtri, le prove, effettuate utilizzando api chiuse in gabbiette a rete, portate a sorvolare la seminatrice, mostrano ancora elevate percentuali di mortalità, variabili dal 30 al 60% a seconda dell'altezza di volo. Tali valori sono significativamente superiori a quelli del controllo (mortalità del 15%), ma nettamente inferiori a quelli delle api che sorvolano la seminatrice con deflettori ma priva di filtri (mortalità dell'85%).

I risultati sin qui ottenuti dalle prove di **sub letalità**, seppur condotte con un inferiore numero di ripetizioni e repliche e con un numero inferiore di individui rispetto a quelle degli scorsi anni a causa del minor tempo a disposizione, confermano quanto rilevato negli sperimentazioni APENET 2009 e 2010, con dosaggi superiori: le quantità di principio attivo saggiate, sebbene al di sotto della soglia di tossicità acuta per le api, sono in grado di provocare, sulla base dei primi risultati di laboratorio, un danno ai processi d'apprendimento e memoria delle api adulte.

Il contatto con polveri contenenti il 10% di imidacloprid, thiamethoxam e fipronil (rispetto alla quantità dispersa dalla seminatrice non modificata), è in grado di compromettere la capacità di riconoscere gli odori già dopo 60' (memoria a breve termine) e a 180' (memoria a medio termine), oltre che a 24 h (memoria a lungo termine).

Nelle prove sulla capacità di orientamento in un labirinto semplice e sul riconoscimento dei colori, le percentuali di scelta corretta sono al di sotto del 50% e, se pure in via preliminare, tenendo conto del numero basso di api sottoposte al test, indicano che gli individui trattati con thiamethoxam recuperano la memoria del colore sbagliato al momento di effettuare la scelta.

Nelle prove di orientamento in un labirinto complesso non sono emerse differenze significative tra il testimone e il trattato nella percentuale di api ritornate e nei tempi di ritorno e di percorrenza del labirinto; tuttavia alcune conseguenze sono state evidenziate come osservato in una delle prove, dove un numero significativo di api trattate non sono tornate al labirinto.

I risultati ottenuti studiando le **interazioni sinergiche** tra agenti di stress e collasso delle colonie d'api, indicano che il clothianidin è in grado di promuovere la proliferazione del virus delle ali deformi (DWV), comunemente presente nelle api in condizioni di infezione latente, con ovvie conseguenze negative sulla sopravvivenza.

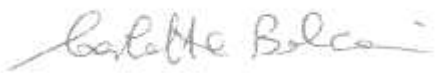
## **Responsabili delle ricerche descritte nei singoli capitoli**

### **1. Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais e persistenza nella pianta dei principi attivi usati per la concia**

Dr Mario Motto  
Direttore CRA - Unità di ricerca per la maiscoltura



Dott.ssa Carlotta Balconi  
CRA - Unità di ricerca per la maiscoltura



Dr Lorenzo Furlan  
Veneto Agricoltura



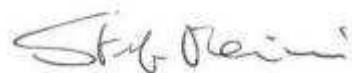
### **2. Effetti dell'impolveramento delle api durante il sorvolo di un campo seminato con mais conciato**

Prof. Vincenzo Girolami  
Dipartimento di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali – Entomologia, Università di Padova



### **3. PER-test per saggiare gli effetti di clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam e fipronil somministrato attraverso le polveri contaminate**

Prof. Stefano Maini  
Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



Dr Claudio Porrini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



*Collaboratori esterni*

Dr.ssa Bettina Maccagnani

Centro Agricoltura Ambiente “Giorgio Nicoli”, Bologna



#### **4. La rete di monitoraggio**

Dr Franco Mutinelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie



Dr Claudio Porrini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



#### **5. Determinazione del minimo livello di concentrazione di polveri emesse dalle seminatrici modificate durante la semina di mais conciato tecnicamente ottenibile con interventi sulle seminatrici ed effetti sulle api**

Dr Daniele Pochi

CRA - Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria

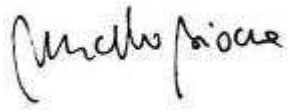


Prof. Vincenzo Girolami

Dipartimento di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali – Entomologia, Università di Padova



Dr. Marcello Biocca,  
CRA - Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria - Monterotondo



Dr.ssa Elisa Conte  
CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



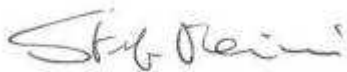
Dr Patrizio Pulcini  
CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



**Altri collaboratori:** Dr. Roberto Fanigliulo, Dr. Marco Fedrizzi (CRA-ING); Dr.ssa Lucia Donnarumma (CRA-PAV), Dr. Matteo Marzaro; Dott.ssa Linda Vivian (Dipartimento di Agronomia Ambientale – Entomologia, Università di Padova)

## **6. Effetti sub letali di neonicotinoidi e fipronil su apprendimento e memoria olfattiva e sulle capacità di orientamento**

Prof. Stefano Maini  
Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



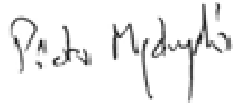
Dr Claudio Porrini  
Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



Dr.ssa Bettina Maccagnani  
Centro Agricoltura Ambiente “Giorgio Nicoli”, Bologna



Dr Piotr Medrzycki  
Unità di ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (CRA-API), Bologna



Dr Fabio Sgolastra  
Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



### **7. Possibilità di applicazione della lotta integrata per il controllo delle virosi nella coltura del mais**

Dr Lorenzo Furlan  
Veneto Agricoltura



### **8. Interazioni sinergiche tra agenti di stress e collasso delle colonie d'api**

Prof. Francesco Pennacchio  
Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri", Università di Napoli



### **Coordinamento del progetto APENET**

Dr. Marco Lodesani  
Unità di ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (CRA-API), Bologna

