



CRA-ING

UNITÀ DI RICERCA
PER L'INGEGNERIA AGRARIA



Interventi finalizzati alla riduzione della dispersione di polveri durante la semina del mais conciato.

Responsabile - Dr. Daniele Pochi

Collaboratori

CRA-ING - Dr. Marcello Biocca;

CRA-PAV - Dr.ssa Elisa Conte; Dr.ssa Lucia Donnarumma;

Dr. Enzo Marinelli; Dr. Patrizio Pulcini;

CRA-MAC - Dr. Mario Motto; Dr.ssa Carlotta Balconi



CRA-ING, Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria, Monterotondo

CRA-PAV, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

CRA-MAC, Unità di Ricerca per la Maiscoltura, Bergamo



Obiettivi

- Dare indicazioni in merito alla qualità del trattamento conciante del seme utilizzato in termini di tenuta in seguito alle manipolazioni subite fra lo stabilimento e l'azienda**
- Valutazione della deriva di polveri da abrasione in seguito alla semina di mais con una seminatrice pneumatica dotata di deflettore in confronto alla medesima senza deflettore**
- Osservazione effetti su api in gabbiette spia, esposte alla deriva durante la semina prove, associate alle concentrazioni a terra e su colonie di api in prossimità delle parcelle di semina, nel periodo ad essa successivo**
- Valutazione dell'utilità agronomica dei preparati per la concia delle sementi di mais**
- Valutazione della persistenza dei residui dei principi attivi nel terreno e traslocati nella pianta di mais nei diversi stadi di sviluppo**



CRA-ING, Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria, Monterotondo
CRA-PAV, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



Azioni svolte

- 1. Test di Heubach sul seme conciato fornito dall'industria**
- 2. Prove di semina in campo con seminatrice modificata e non modificata**
- 3. Attività di analisi dei campioni (piastre Petri, api esposte alle polveri, terreno e piante alle varie fasi fenologiche, polline)**

Materiali - Seminatrice pneumatica

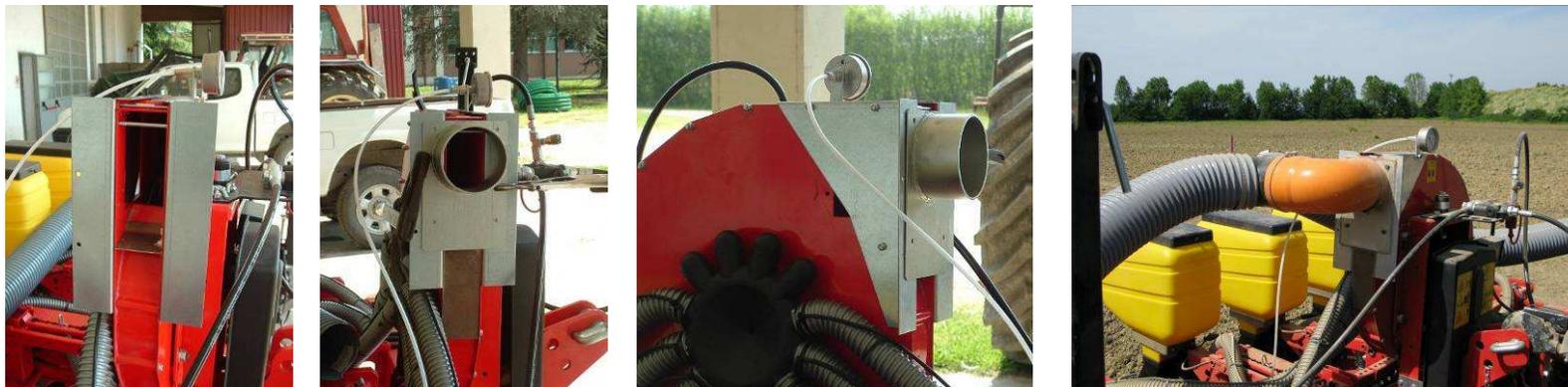
**Seminatrice pneumatica a 6 file,
con distanza fra le file di 45 cm.
Regolazione della larghezza di
lavoro solo manuale, eliminando
uno o più distributori di semina.**



Regolazioni	
Interfila, m	0.45
larghezza di lavoro, m	2.70
distanza semi sulla fila, m	0.18
investimento, semi/ha	123457
depressione, mbar	-45
regime p.d.p., giri/min	1500
velocità di semina, km/h	6

	modifica	
	si	no
Distanza tubi da terra, m	0.15	-
Sezione tot. uscita aria, m ²	0.0226	0.0098
Velocità aria in uscita, m/s	8	20
Portata aria totale: m ³ /min	10.85	11.74

Materiali - Seminatrice pneumatica



**Applicazione della
doppio deflettore
all'uscita del
depressore**



Materiali - Seminatrice pneumatica

Il deflettore è stato smontato, riportando la macchina alle condizioni standard, per l'esecuzione delle prove della seconda fase



Materiali - Seme conciato - Caratteristiche

AIS ha fornito 4 lotti di seme di mais ibrido conciato con:

- Imidacloprid (Gaucho)
- Clothianidin (Poncho)
- thiametoxam (Cruiser)
- Fipronil (Regent)

Tutto il seme è stato trattato con Celest XL (fungicida) e Sepiret (adesivante)

Il produttore ha sottoposto il seme al test di Heubach secondo il metodo ESA_09.0125.1, che ha evidenziato in tutti i casi una produzione di polveri da abrasione nettamente inferiore al limite di 3g/q di seme

Il peso medio di un seme è di 281 mg.

Il seme è confezionato in sacchetti da 10.000 unità. In ogni ripetizione sono stati impiegati 2 sacchetti di semi applicati a parcelle di circa 0.16 ha (**40x40m; 15 passaggi della seminatrice; superf. equiv. con interfila di 75 cm: 0,27 ha**)

Materiali - Seme conciato - Analisi

Principio attivo	Quantità p.a. applicata mg /seme	Quantità p.a. rilevata (CRA-PAV) mg /seme
gaucho	1.00	0.89
poncho	1.25	1.25
cruiser	0.60	0.55
regent	0.50	0.40

I risultati delle analisi della quantità di p.a. applicato per ogni seme confermano sostanzialmente i dati forniti dai produttori

Materiali - Seme conciato - Polverosità



Il CRA-ING dispone di un cilindro di Heubach utilizzato per:

- rilievo della polverosità su campioni di seme prelevati dalle stesse confezioni destinate alle prove di semina, allo scopo di valutare la stabilità del trattamento sul seme in azienda. Ad esclusione delle modalità di prelievo dei campioni di seme, è stato seguito il metodo ESA_09.125.1

Materiali - Seme conciato - Polverosità



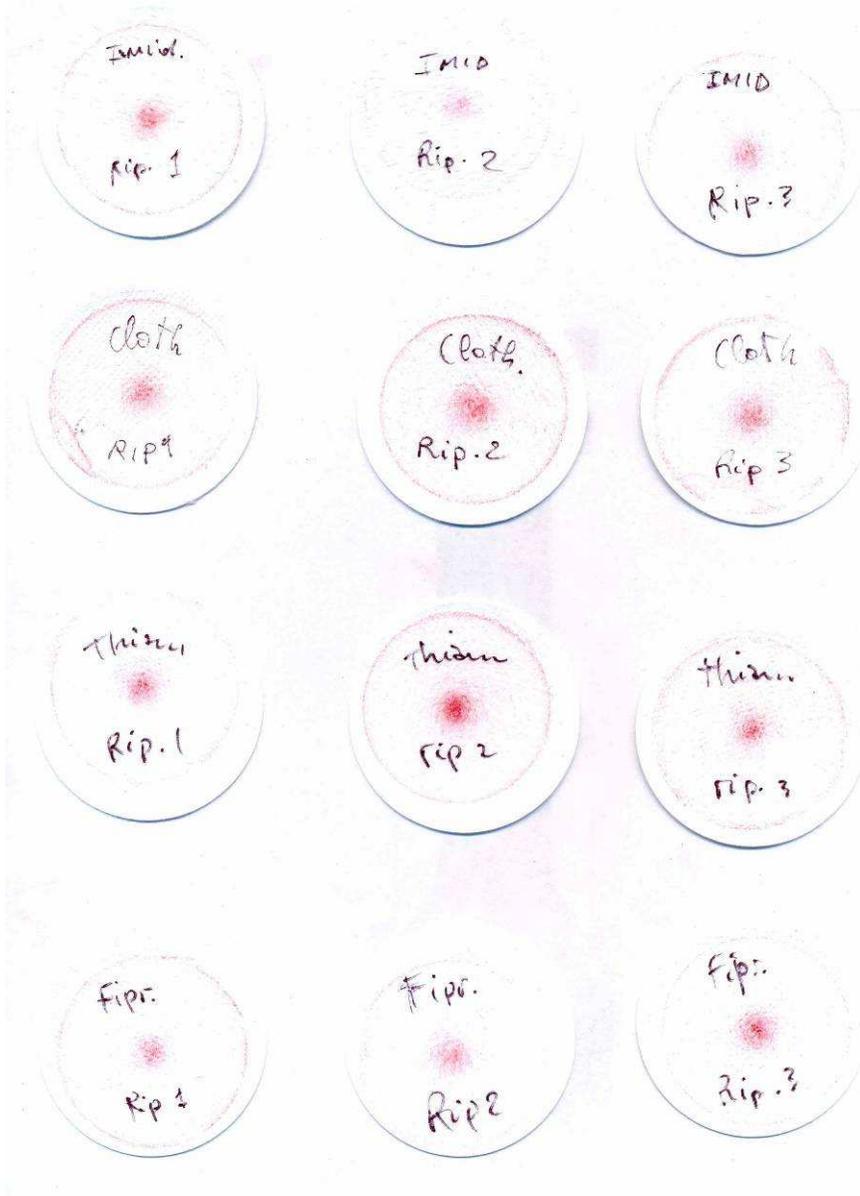
Il seme pervenuto al CRA-ING ha subito manipolazioni e variazioni delle condizioni ambientali normali nel periodo fra produzione e utilizzo.

Da ogni sacchetto destinato alle prove di semina sono stati prelevati 100 g di seme.

Per ogni ripetizione (semina) sono stati impiegati 2 sacchetti, campionando 200 g di seme (il contenuto di ciascuna vaschetta)

Per ogni p.a. sono state effettuate 3 ripetizioni e complessivamente 3 campioni da 200 g di seme

Il seme è stato conservato in condizioni controllate di temperatura e umidità (25°C e 50% di U.R.).



Materiali - Seme conciato Polverosità

Filtri al termine del
test di Heubach

Materiali - Seme conciato - Polverosità

La polvere da abrasione è utilizzata nella valutazione del seme dal punto di vista del trattamento conciante.

E' risultata superiore ai valori dichiarati ma non ha mai superato la soglia di riferimento di 3 g/q di seme.

<i>Principio attivo</i>	<i>dati AIS g/q</i>	<i>CRA-ING g/q</i>
gaucho	0.9600	1.6664
poncho	1.7700	2.1668
cruiser	1.3300	2.4999
regent	1.1100	1.6663

I risultati del test condotto secondo lo standard ESA_09.125 costituiscono i valori di riferimento nella valutazione del seme.

Il test condotto al CRA-ING su seme sottoposto a manipolazioni, stress termici, ecc., aveva lo scopo di fornire indicazioni utili sulla tenuta del trattamento fino al momento dell'impiego del seme. Nel caso specifico i risultati sono stati confortanti, con quantità di polvere nettamente inferiori alla soglia stabilita

Prove di campo - Deriva delle polveri da abrasione in conseguenza dell'applicazione del deflettore

Valutazione di:

- distribuzione a terra del p.a., nelle zone limitrofe alle parcelle seminate (concentrazione di p.a. in $\mu\text{g}/\text{m}^2$);
- presenza di p.a. nell'aria a varie distanze dalla zona di semina, tramite campionatori d'aria (concentrazione di p.a. in $\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb)
- quantità di principi attivi su api contenute in gabbiette, esposte vicino alle piastre Petri (in relazione alla concentrazione osservata a terra)
- effetti, nel periodo successivo alla semina, su comunità di api collocate in prossimità delle parcelle di prova

Prove di campo – Deriva delle polveri da abrasione in conseguenza dell'applicazione del deflettore

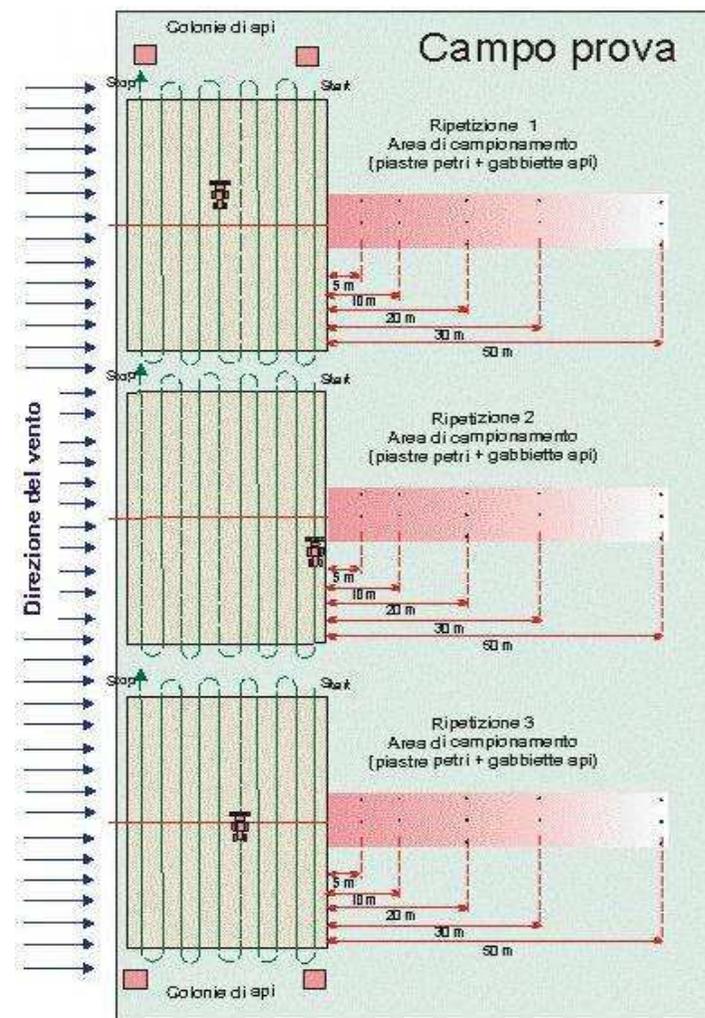
- distribuzione a terra di p.a.

piastre Petri (*BBA Drift Guideline, Part VII, 2-1.1, 1992, "Measuring direct drift when applying liquid plant protection products outdoors"*)

- concentrazione di p.a. nell'aria: campionatori d'aria (*UNI CEN TR 15547:2007*)

- osservazioni su api esposte:

- 1) gabbiette spia accanto alle piastre Petri;
- 2) colonie di api (6 per ogni campo di prova)



Caratteristiche terreno di prova

Classi granulometriche	
scheletro (%)	0
sabbia (%)	2,3
limo (%)	43,4
argilla (%)	54,3
tessitura	argilloso- limosa
Limiti di Atterberg	
limite liquido (%)	62,2
limite plastico (%)	40,3
indice di plasticità (%)	21,9
Resistenza media alla penetrazione (MPa)	1,2
Massa volumica apparente	
da 0 a 250 mm (g/cm ³)	1,41
da 250 a 500 mm (g/cm ³)	1,39

Prove di campo – deriva delle polveri da abrasione e loro effetti sulle api in conseguenza dell'applicazione del deflettore

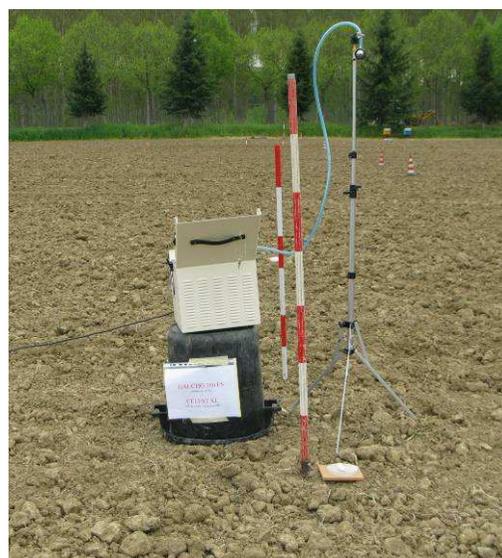
Organizzazione parcelle di prova (prima fase)

- seminatrice (con e senza modifica)
- principi attivi (4)
- ripetizioni (3)

Nella scansione temporale delle prove e nella dislocazione delle parcelle si è tenuto conto del tempo necessario alle osservazioni sulle api, onde evitare contaminazioni

Prove di campo – Deriva delle polveri da abrasione in conseguenza dell'applicazione del deflettore

Piastre Petri (soluzione al 50% di acqua/acetone) e gabbiette spia (con 25-30 api) sono state posizionate sotto vento al centro di ogni parcella, in tre ordini distanti fra loro 5m e a distanze di 5, 10, 20, 30, 50 m dal bordo della stessa.



Durante ciascuna ripetizione, due pompe aspiratrici con filtro in fluoropore da 45 mm, posizionate a metà parcella, alla distanza di 5 e 10 m da essa, hanno campionato 100 l di aria ciascuno (tempo circa 20 min). I filtri con il contenuto sono stati analizzati per quantificare la presenza di p.a. nell'aria (ppb).

Prove di campo – Deriva delle polveri da abrasione in conseguenza dell'applicazione del deflettore

Ciascun appezzamento destinato alla prova con un p.a. è stato suddiviso in tre parcelle. Ai bordi (capezzagne) dell'appezzamento sono stati posizionati 6 alveari per osservare gli effetti del bottinamento in un'area sottoposta alla deriva della polvere espulsa dalla seminatrice. Nei giorni successivi alla semina si è provveduto al periodico conteggio delle api morte raccolte nelle gabbie underbasket



Prove di campo – Deriva delle polveri da abrasione in conseguenza dell'applicazione del deflettore

Sono stati monitorati i principali parametri ambientali durante le prove:

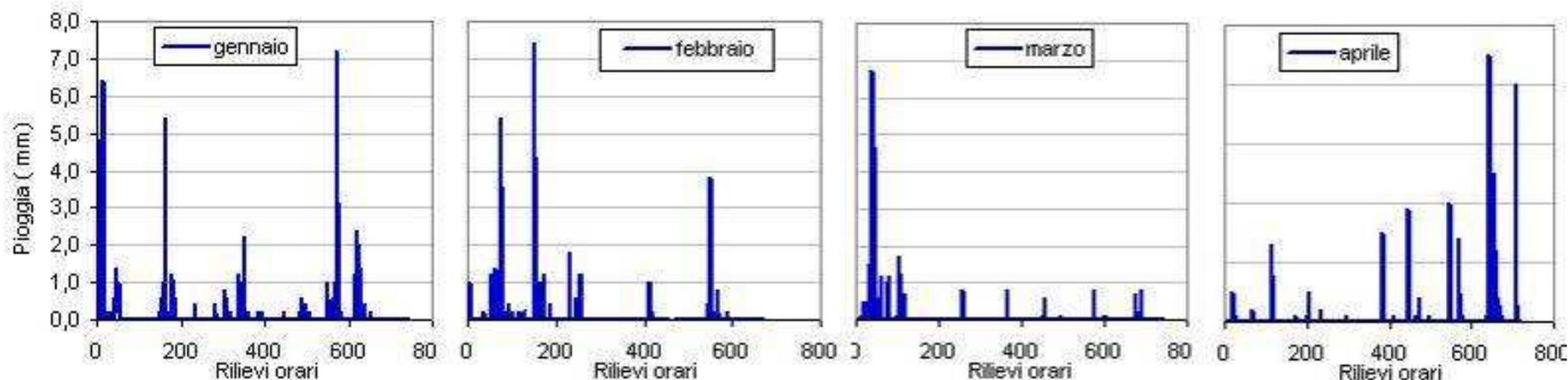
- Temperatura;
- Umidità relativa;
- Pressione atmosferica;
- Radiazione solare
- Velocità dell'aria
- Direzione dell'aria.



Calendario delle Prove di campo

L'inizio delle prove era previsto per la metà di Marzo 2009, epoca indicata come quella più significativa per valutare eventuali effetti sulle api dei principi attivi oggetto di studio.

L'andamento del tempo per tutto il periodo fra febbraio e fine aprile ha consentito un primo accesso ai campi a metà aprile e successivamente solo a partire da inizio maggio



Pioggia caduta nel periodo gennaio-aprile (mm/h)

Prove di campo - il vento

**Deriva della
polvere verso la
zona di
campionamento,
durante la prova
di semina**





Prove di campo - Analisi delle diverse matrici

Tutte le analisi dei campioni delle prove, le soluzioni delle piastre di Petri, i dischi/filtro delle pompe di aspirazione, nonché gli estratti provenienti dai campioni delle api delle gabbiette e delle underbasket, sono state effettuate in **cromatografia liquida ad alta risoluzione con rivelazione di massa o tandem HPLC-MS-MS**. È stato utilizzato un triplo quadruplo Waters 4micro equipaggiato con interfaccia ESI (Electrospray Ionisation) e in modalità MRM, con “ion mode” positivo, per imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, e negativo per fipronil.

Tutti i metodi utilizzati, sia per l'estrazione dei p.a. dalle soluzioni campione che per l'analisi in Liquido Massa, sono stati testati e validati, secondo procedure di GLP, nel periodo immediatamente precedente e durante lo svolgimento delle prove.

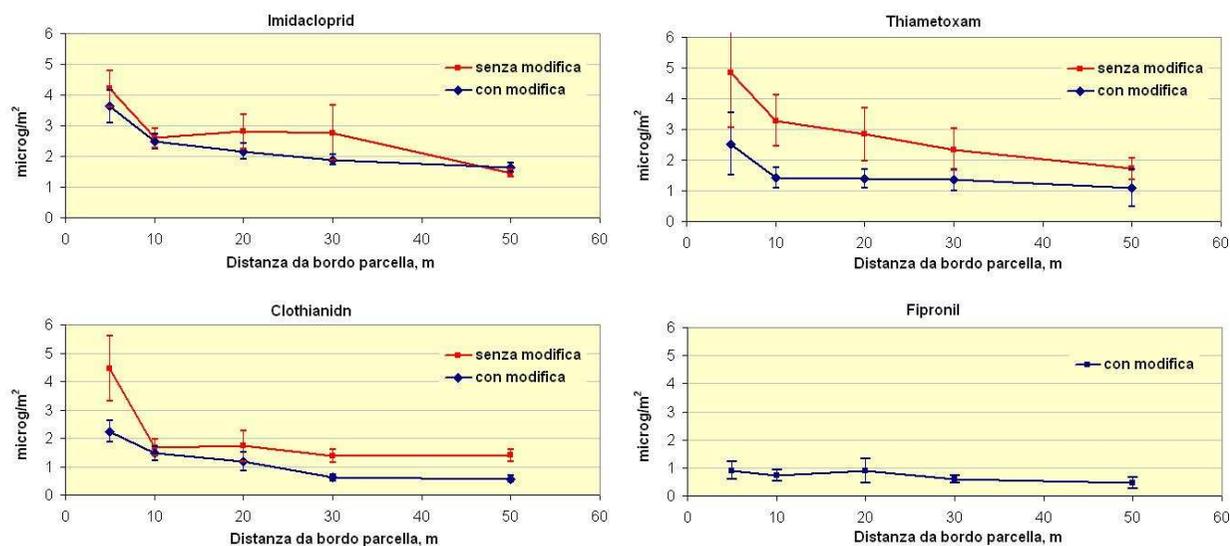
Per tutti i p.a il range di linearità delle calibrazioni va da 0,5 a 100 ppb con coefficienti di correlazione tra 0,994 e 0,998 e LOD compresi tra 0,2 e 0,5 ppb.

Per quanto riguarda i recuperi questi sono stati validati sia per le piastre Petri che per i dischi/filtro su tre livelli quantitativi e con due tipi di aggiunte, una di p.a. standard e una con p.a. proveniente dalle polveri ottenute dai semi concitati utilizzati per le prove e sottoposti al test di Heubach.

In generale i Recuperi sono stati compresi, per tutte le matrici in un intervallo percentuale tra il 90 e il 105.

Infine per quanto riguarda le api, è stato applicato il metodo di estrazione dei p.a. utilizzato presso il CRA-API che prevede la liofilizzazione delle api stesse e la successiva purificazione dei campioni con GPC (Gel Permeation Chromatography).

Prove di campo – Concentrazioni a terra nella zona di campionamento



In tutte le prove con deflettore si osserva la riduzione della concentrazione a terra all'aumentare della distanza dal bordo della parcella

In generale l'impiego del deflettore comporta una riduzione delle concentrazioni a terra di principi attivi rispetto alla seminatrice standard

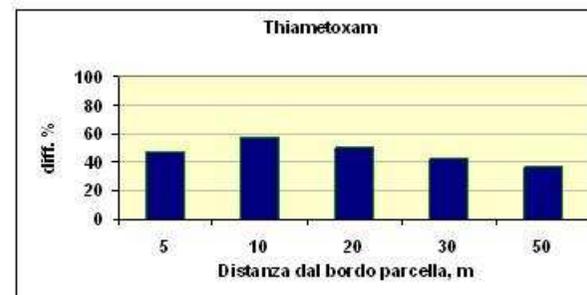
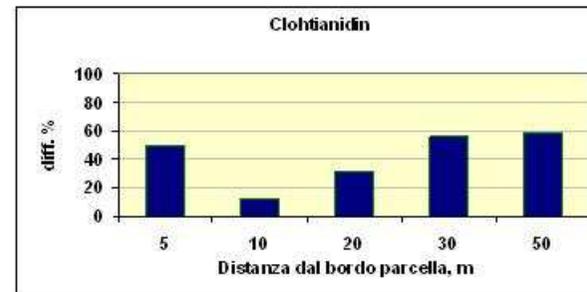
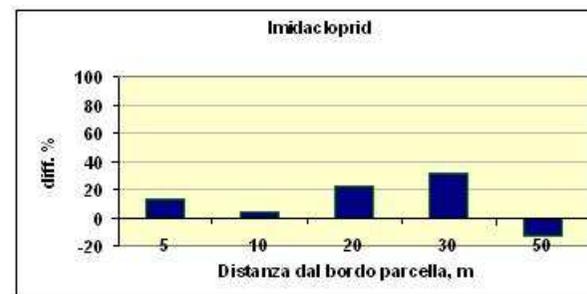
Fipronil senza modifica

Il p.a. è stato sempre ritrovato a valori pari al LOQ o al LOD. Lo stesso risultato si è avuto anche nel controllo, con il p.a. a concentrazioni note, secondo la procedura applicata in tutte le prove.

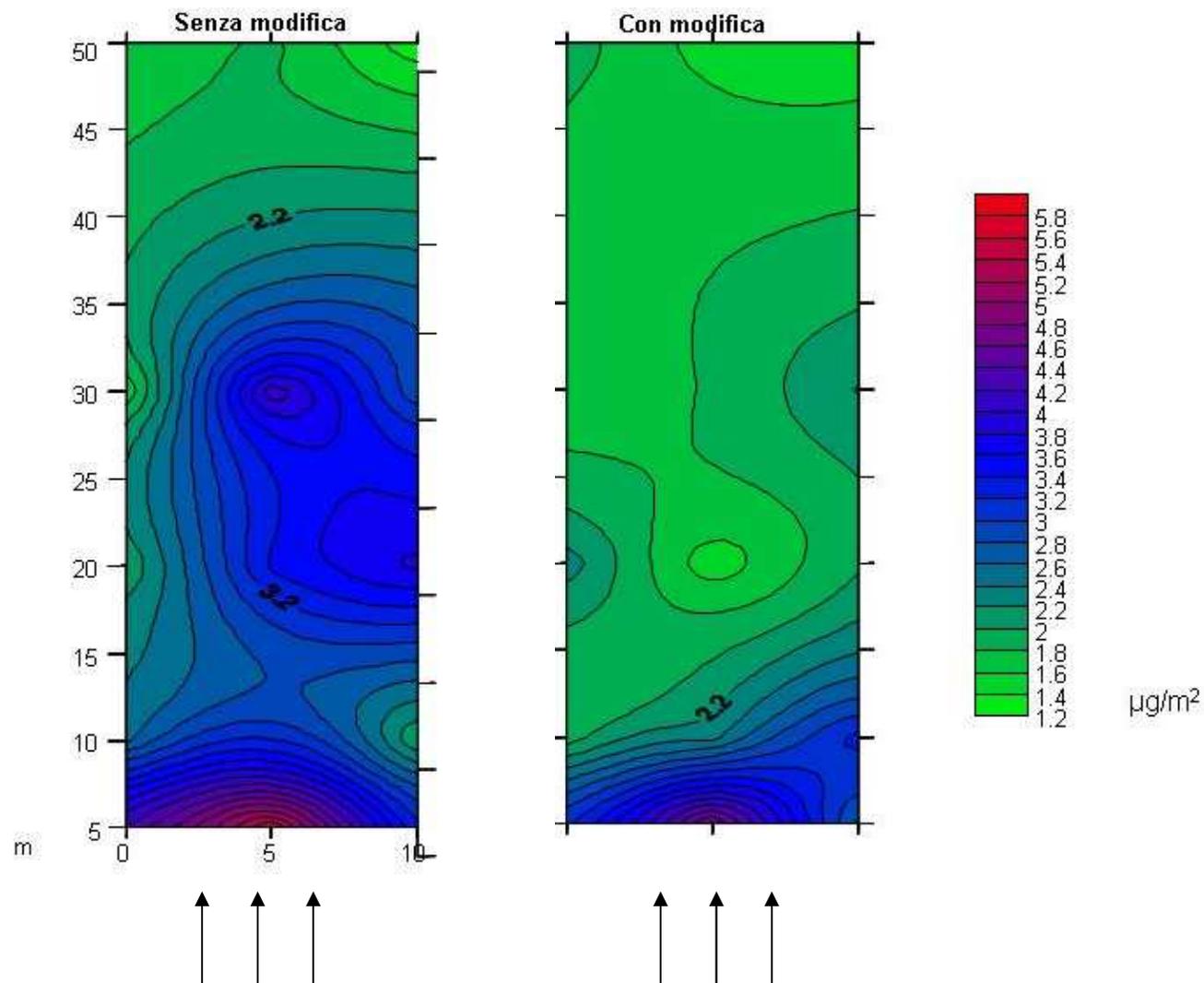
E' ipotizzabile che le temperature del 13/7, molto al di sopra dei 30 °C, e le condizioni di vento, pressoché assente, abbiano determinato degradazione e/o assenza di dispersione.

Prove di campo – Percentuali di abbattimento della concentrazione a terra di principi attivi in seguito all'impiego del deflettore

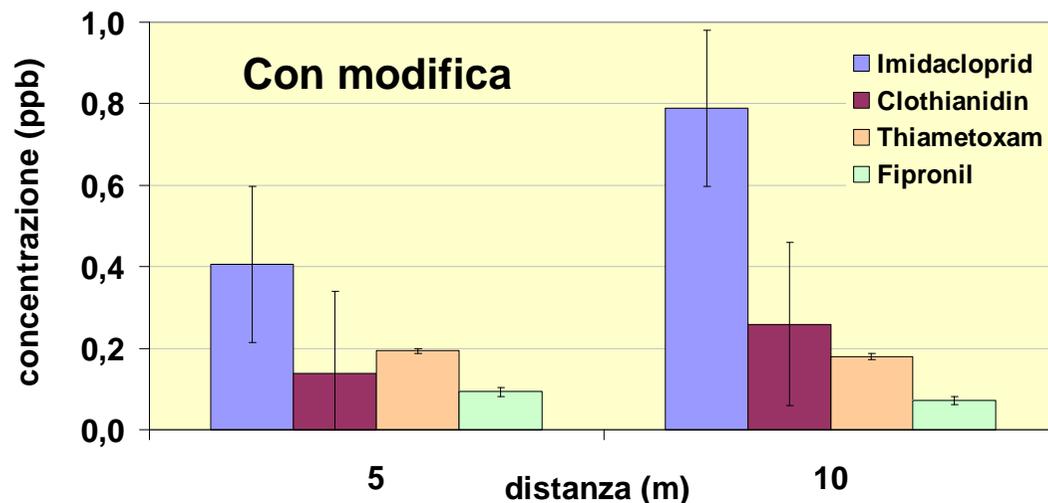
Sempre tenendo conto della variabilità ambientale fra le tesi a confronto, l'abbattimento è risultato più evidente (dell'ordine del 50%) per clothianidin e thiametoxam (significativo al test U di Mann-Whitney)



Distribuzione superficiale di Imidacloprid nella zona di campionamento (media di tre ripetizioni)

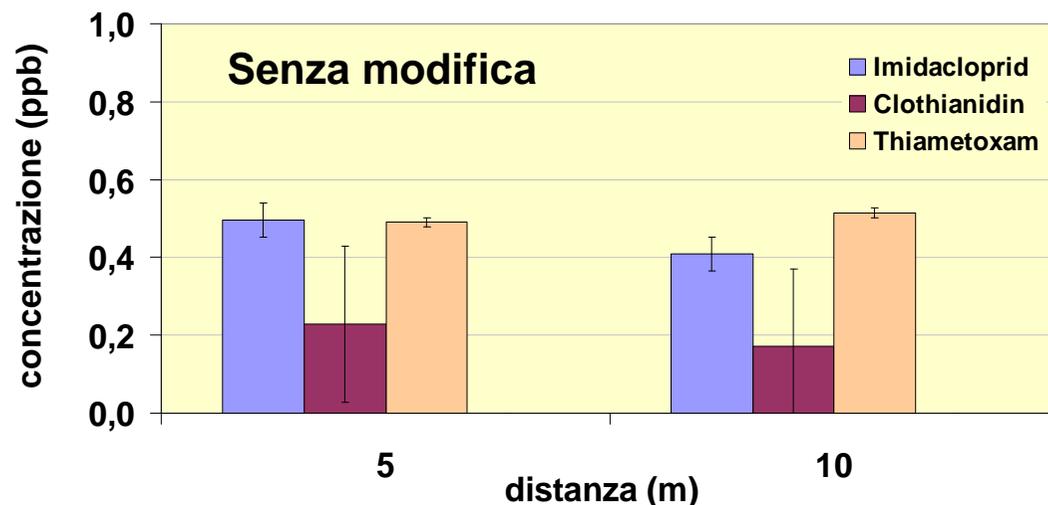


Prove di campo – Concentrazione di p.a. nell'aria (ppb) (filtri a 170 cm da terra)



Le concentrazioni a 5 m con modifica sono inferiori per i tre p.a., mentre a 10 m l'andamento non è omogeneo

Con modifica:
la concentrazione mostra una tendenza ad aumentare con la distanza
(imid. e cloth.)

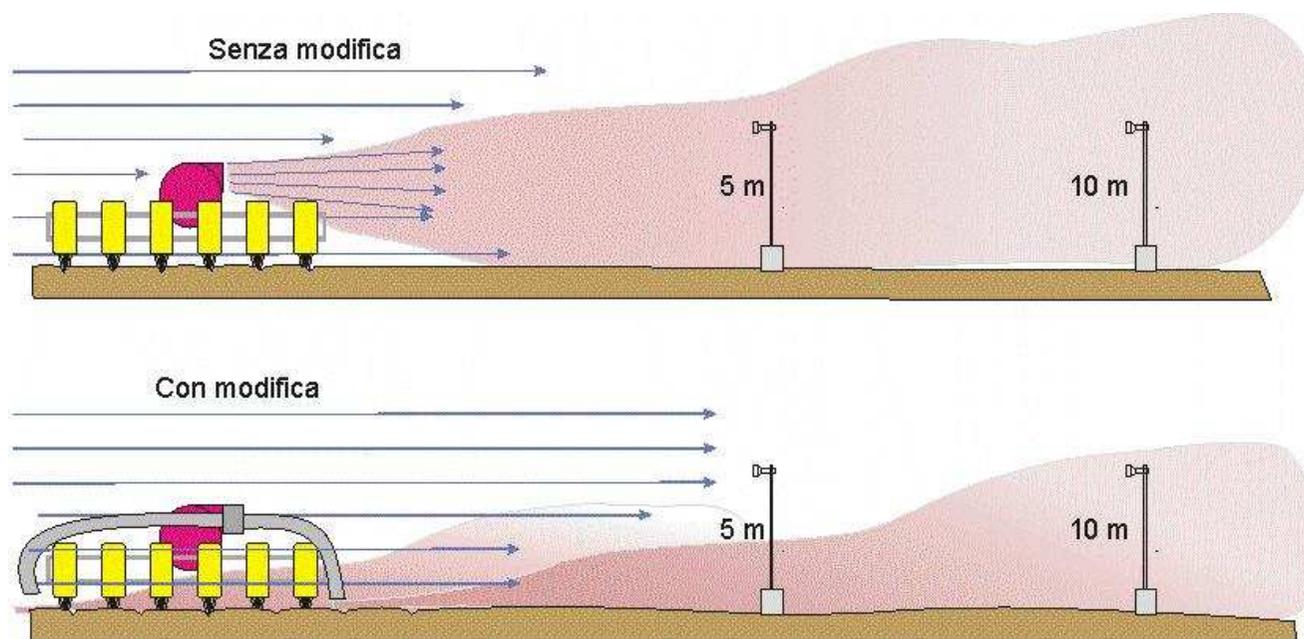


Senza modifica:
la concentrazione non sembra variare in modo significativo con la distanza

Prove di campo – Concentrazione di p.a. nell'aria (ppb) (filtri a 170 cm da terra)

A causa delle
variabili condizioni
ambientali, non si
possono trarre
conclusioni
generali.

Lo schema
proposto è
un'ipotesi per
spiegare le
differenti tendenze
riscontrate nelle
due condizioni di
semina



Valutazione della persistenza dell'imidacloprid nel terreno durante lo sviluppo della coltura

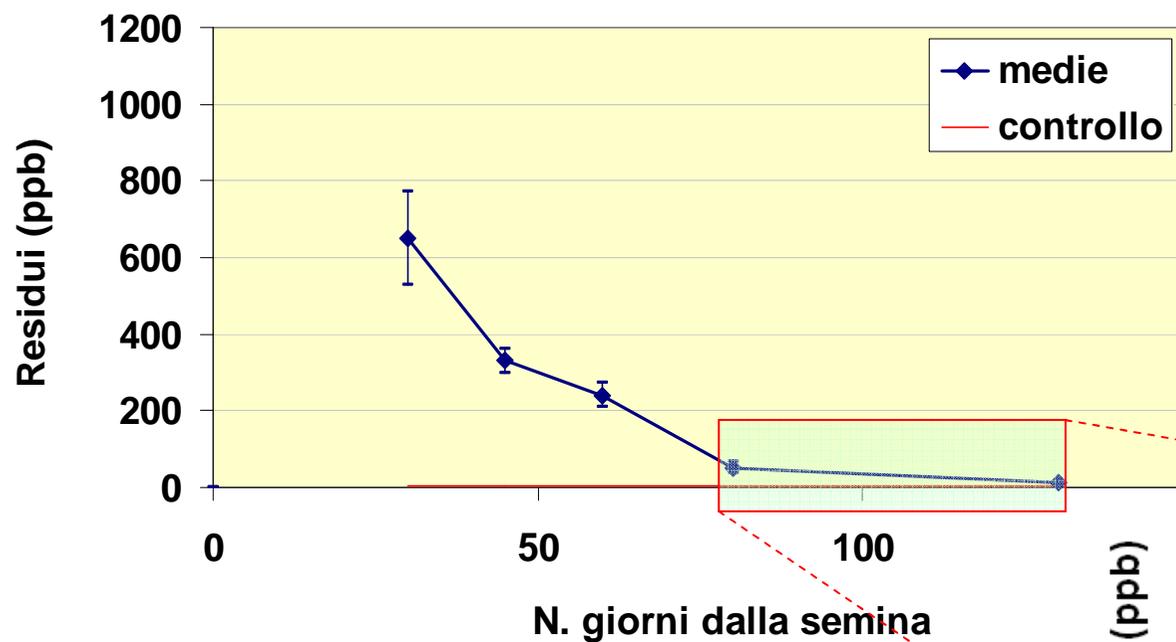
ATTIVITA'

- Campionamento del terreno nella zona circostante alle radici delle piante durante il ciclo colturale
- Analisi dei residui di imidacloprid e suoi metaboliti nel terreno e nei tessuti della pianta mediante HPLC MS/MS

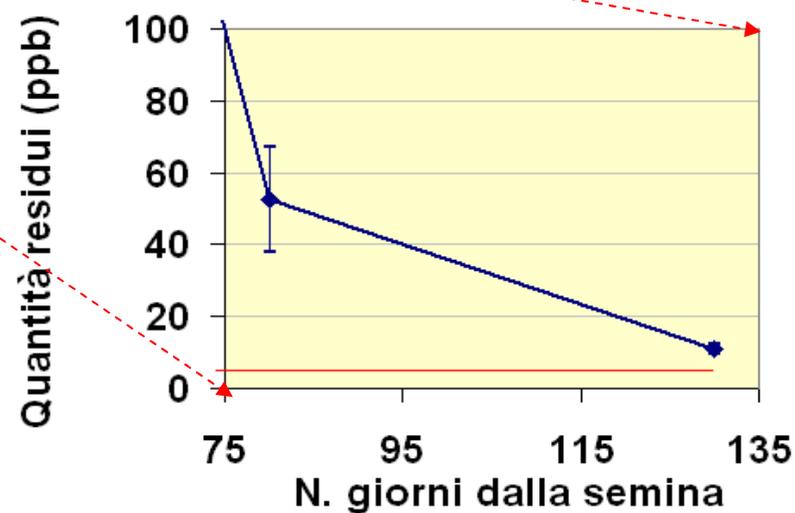
<i>EPOCA CAMPIONAMENTO</i>	<i>STADIO FENOLOGICO</i>
30 gg dalla semina	2 foglie
45 gg dalla semina	5 foglie
60 gg dalla semina	8 foglie
80 gg dalla semina	Emissione pennacchio
130 gg dalla semina	Maturazione fisiologica

Valutazione della persistenza dell'imidacloprid nel terreno durante lo sviluppo della coltura

macchina modificata



Valori in linea con quelli riportati in letteratura



Prove di campo – Conclusioni

La qualità del processo conciante è fondamentale per il contenimento della concentrazione di principio attivo a terra. Rispetto a precedenti esperienze con seme sottoposto a trattamenti meno recenti ed efficaci, sono stati osservati importanti progressi anche in assenza di modifica.

La presenza della modifica costituisce un ulteriore contributo alla riduzione della quantità di polvere soggetta a deriva. Nelle prove effettuate la riduzione è apparsa sui livelli medi intorno al 50 %

I test sono influenzati da fattori ambientali ed operativi. Nella continuazione del progetto, i loro effetti andrebbero eliminati o ridotti, per avere avere condizioni di prova ripetibili e dati comparabili, relativamente sia al contenuto delle capsule Petri e dei campionatori d'aria, che alle osservazioni sulle api. In particolare:

- Rigidità del sistema di prove in soluzione unica nei confronti delle variabili meteorologiche.** La presenza di alveari rende necessario seminare in periodi e zone significativi per la presenza di fiori, limitando il periodo utile per le prove e la possibilità di orientare le parcelle di prova secondo il vento.
- Tutte le prove sono state eseguite su parcelle di piccole dimensioni (max 3600 m²)** idonee allo studio della deriva secondo la metodologia adottata. Superfici più estese, probabilmente potrebbero dare maggiori indicazioni sia sulla deriva che sugli effetti sulle api (sia in gabbiette che in colonie),



CRA-ING, Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria, Monterotondo
CRA-PAV, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



Attività previste nel 2010

- 1. Test di Heubach su seme conciato secondo tecnologia innovativa**
- 2. Prove di semina a punto fisso per valutazione obiettiva di seminatrici e deflettori**
- 3. Prove di semina su superfici estese (deriva ed osservazioni su api)**
- 4. valutazione dei residui di principi attivi sul terreno e nei tessuti delle piante fino al polline**



CRA-ING Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria, Monterotondo
CRA-PAV, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



Osservazioni sulle colonie di api

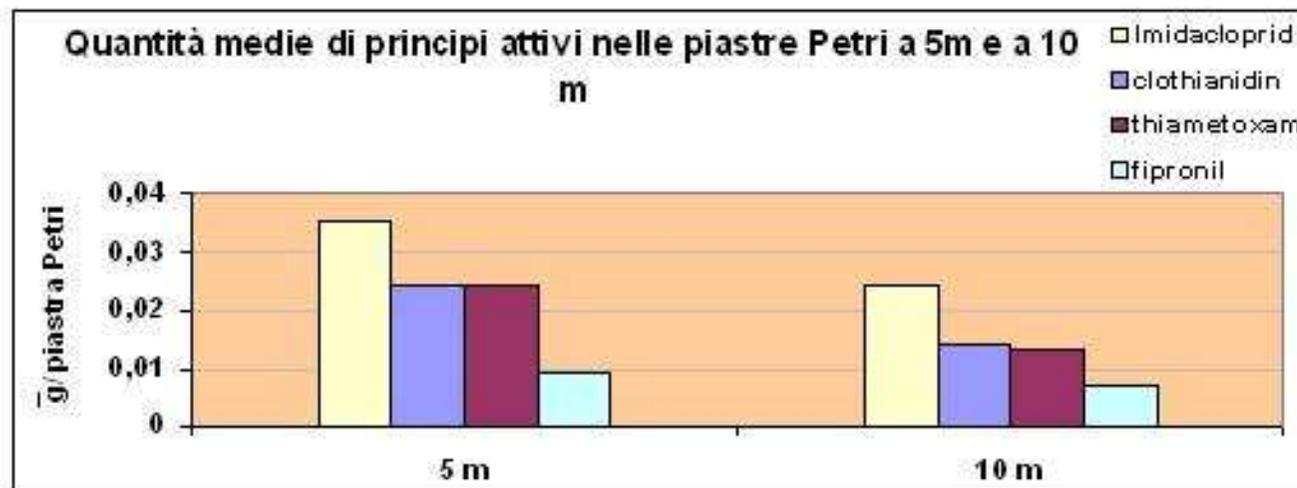
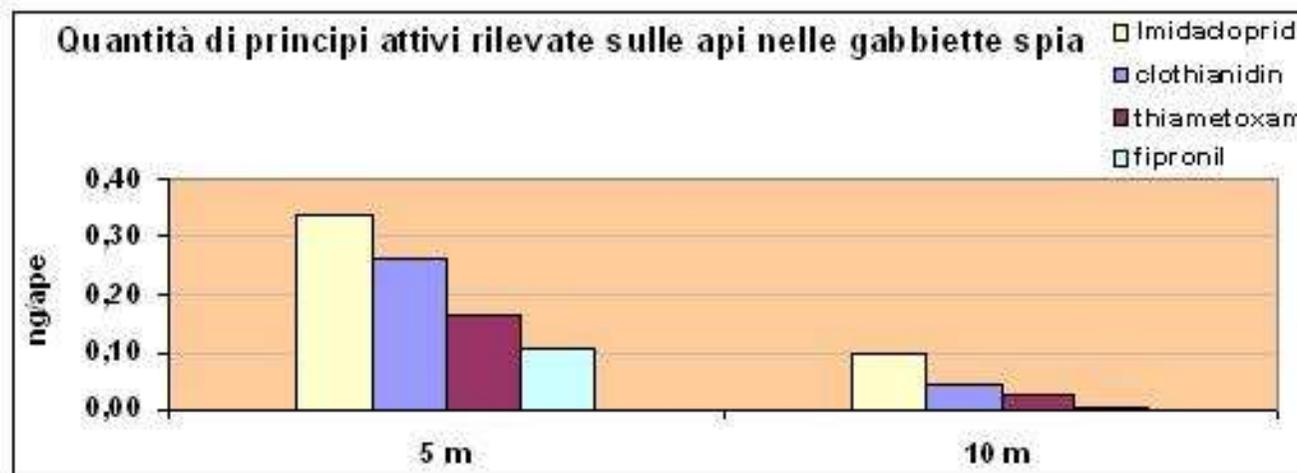
Quadro riassuntivo delle analisi effettuate sulle api in gabbiette spia (5m, 10m, controllo) e nelle underbasket

p.a.	CAMPIONE	N° API TOT	ng/ape	ng totali	µg /gabbietta	µg /piastra	% p.a. contatto
Imidacloprid	5 m	224	0,34	75,6	0,008	0,035	24,01
	10 m	181	0,10	18,1	0,002	0,024	8,39
	controllo	236	<lod	<lod	-	-	-
	Underbasket	176	0,035	-	-	-	-
clothianidin	5 m	616	0,26	161,8	0,018	0,024	74,93
	10 m	241	0,04	9,8	0,001	0,014	7,79
	controllo	263	0,01	3,6	-	-	-
	Underbasket	179	<lod	<lod	-	-	-
thiametoxam	5 Metri	322	0,16	52,6	0,006	0,024	24,36
	10 Metri	121	0,02	2,9	0,0003	0,013	2,48
	controllo	293	<lod	-	-	-	-
	Underbasket	135	<lod	0	0	0	0
fipronil	5 Metri	134	0,105	14,1	0,0016	0,009	17,42
	10 Metri	205	0,004	0,9	0,00010	0,007	1,40
	controllo	125	-	-	-	-	-
	Underbasket	130	<lod	-	-	-	-

Dati relativi alle prove con seminatrice modificata

**Confronto fra
l'andamento del
contenuto di
principi attivi
rilevati sulle api
nelle gabbiette e
nelle relative
gabbiette spia
(5m, 10m)**

***Dati relativi alle
sole prove con
seminatrice
modificata***



Stima della popolazione di api e covata Metodo dei sestii

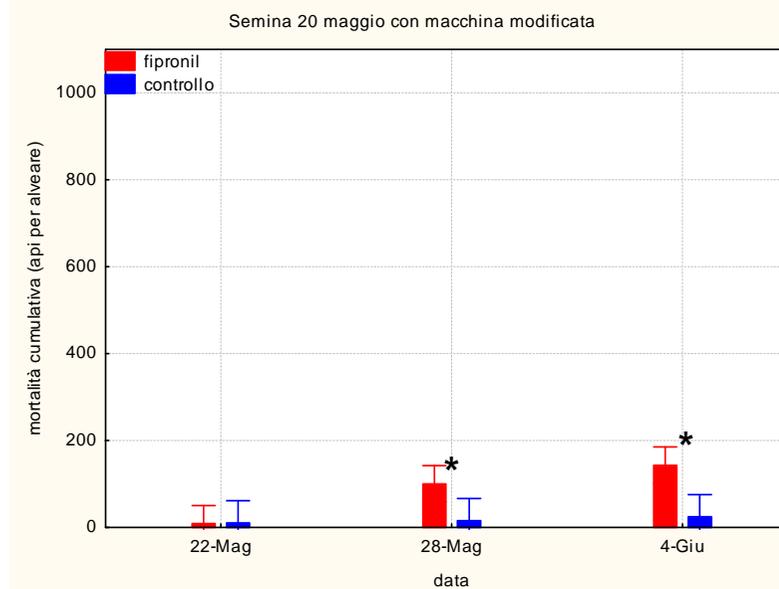
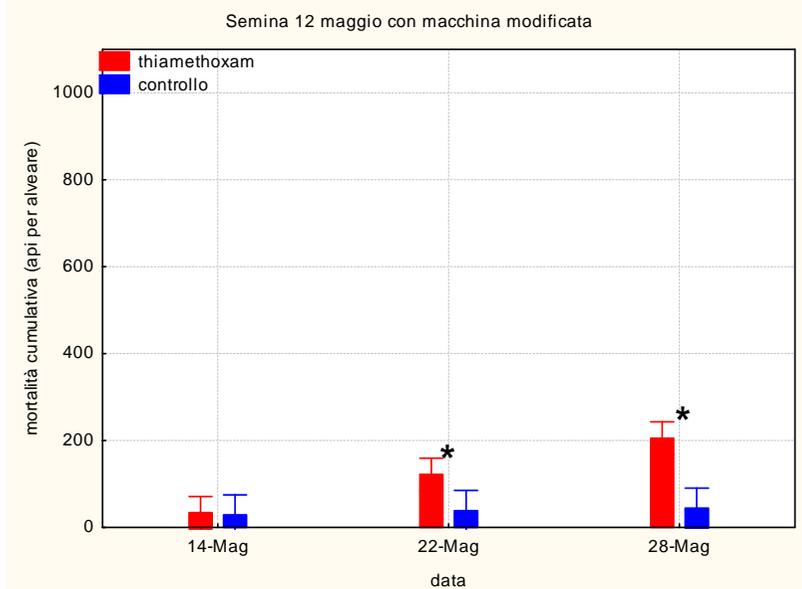
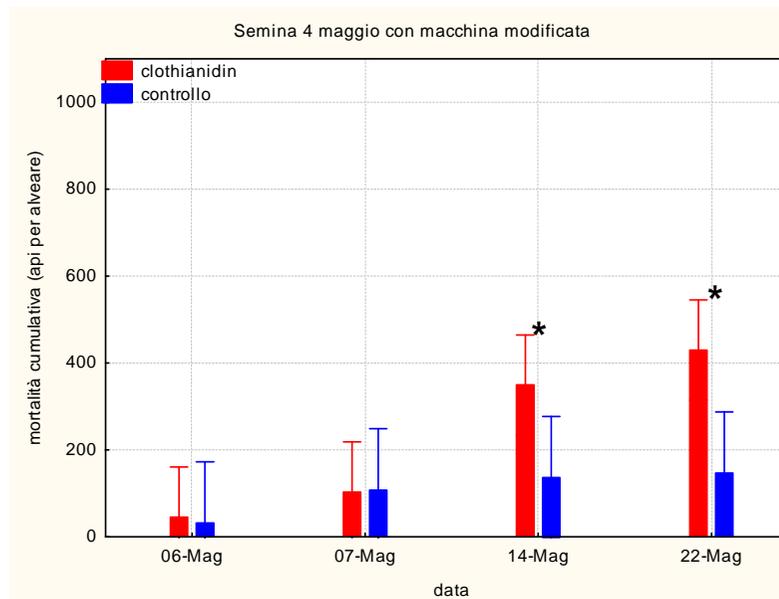
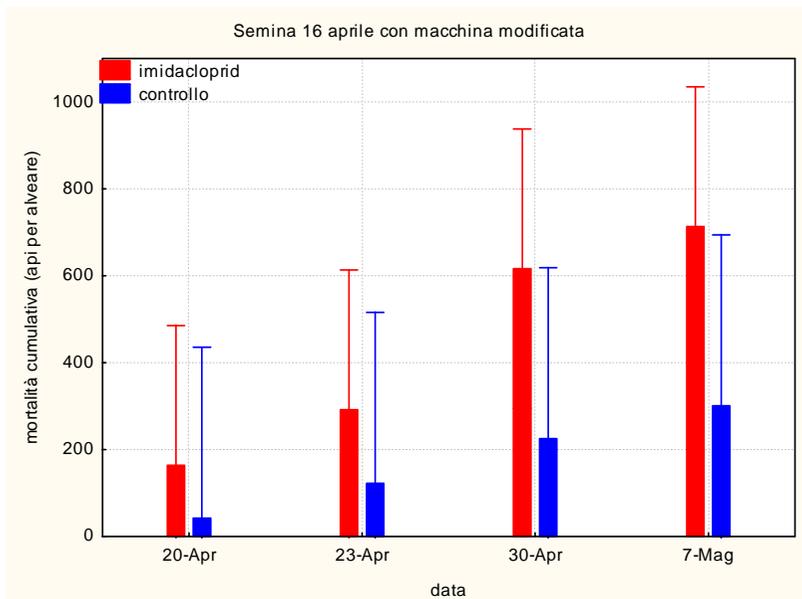


Seminatrice con modifica

	Migliaia di api			Migliaia di celle di covata		
	Prima della semina	7 g dopo la semina	Variazione percentuale	Prima della semina	7 g dopo la semina	Variazione percentuale
Imidacloprid	14,63±0,63	15,33±0,69	4,78	40,53±3,54	42,00±1,33	3,63
Controllo	15,94±0,30	16,75±0,31	5,08	39,20±1,03	41,40±2,45	5,61
			p=0,276			p=0,961
Clothianidin	19,96±1,43	18,17±1,06	-8,97	42,67±4,10	48,93±3,55	14,67
Controllo	16,56±0,60	18,56±0,19	12,08	45,00±2,52	40,00±2,83	-11,11
			p=0,085			p=0,290
Thiamethoxam	16,06±1,84	18,21±1,49	13,39	33,47±3,09	33,00±3,28	-1,4
Controllo	18,56±0,19	23,13±1,20	24,62	40,00±2,83	58,00±3,83	45
			p=0,052			p=0,008*
Fipronil	22,46±1,37	22,71±1,39	1,11	51,47±2,15	56,67±2,17	10,1
Controllo	23,13±2,15	25,13±2,17	8,65	58,00±3,83	58,00±1,15	0
			p=0,483			p=0,372

*differenza significativa tra trattato e controllo (ANOVA per misure ripetute, valori di p in tabella)

Seminatrice con modifica



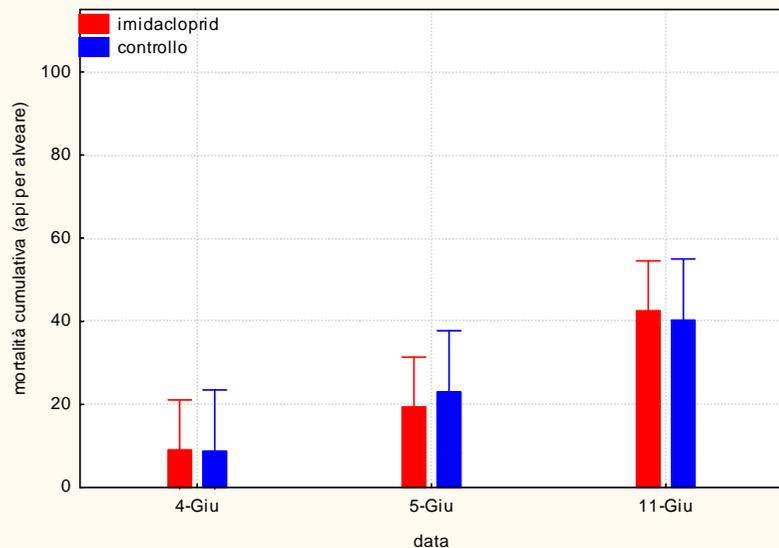
* differenza statisticamente significativa (test U di Mann-Whitney, $p=0,05$).

Seminatrice senza modifica

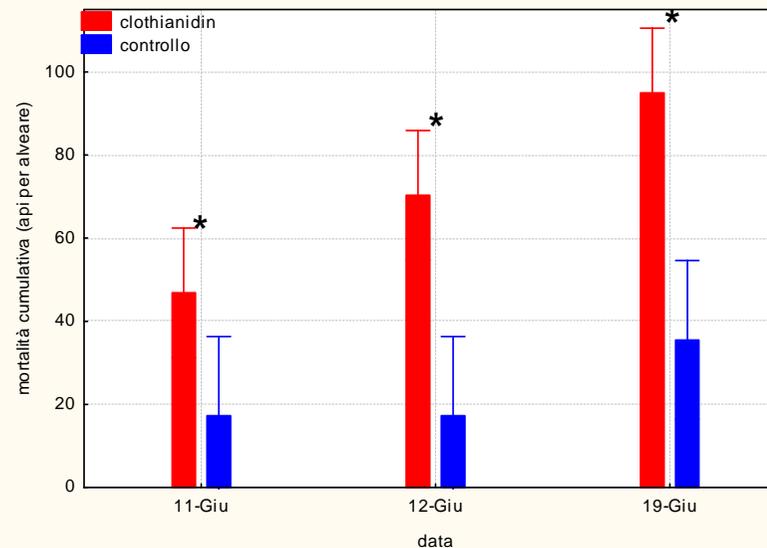
	Migliaia di api			Migliaia di celle di covata		
	Prima della semina	7 g dopo la semina	Variazione percentuale	Prima della semina	7 g dopo la semina	Variazione percentuale
Imidacloprid	18,5±0,8	18,1±1,18	-2,16	63,6±3,54	66,87±3,70	5,15
Controllo	22,3±1,05	21,5±0,53	-3,91	63,13±3,48	70,15±4,13	11,11
			p=0,65			p=0,82
Clothianidin	18,25±1,15	18,87±1,05	3,42	64,53±2,58	67,34±3,85	4,34
Controllo	21,5±0,53	20,00±0,84	-6,97	70,15±4,13	67,34±4,99	-4
			p=0,075			p=0,16
Thiamethoxam	20,12±0,96	19,79±0,64	-1,65	69,21±3,23	64,77±2,88	-6,41
Controllo	20,00±0,84	19,93±1,31	-0,31	67,34±2,88	71,90±4,02	6,77
			p=0,34			p=0,36
Fipronil	16,62±0,86	14,40±0,89	-13,38	54,99±2,55	61,87±4,64	12,5
Controllo	20,37±1,42	19,93±1,10	-2,14	69,79±2,82	64,18±5,19	-8,04
			p=0,41			p=0,71

Seminatrice senza modifica

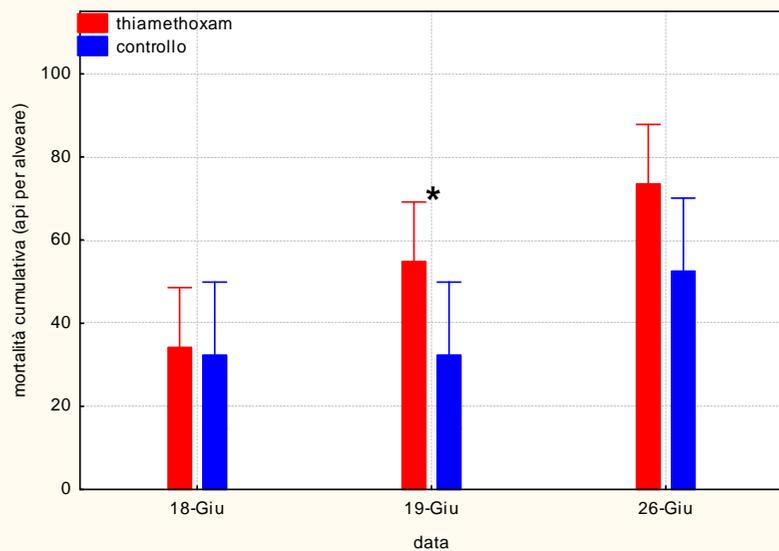
Semina 4 giugno con macchina non modificata



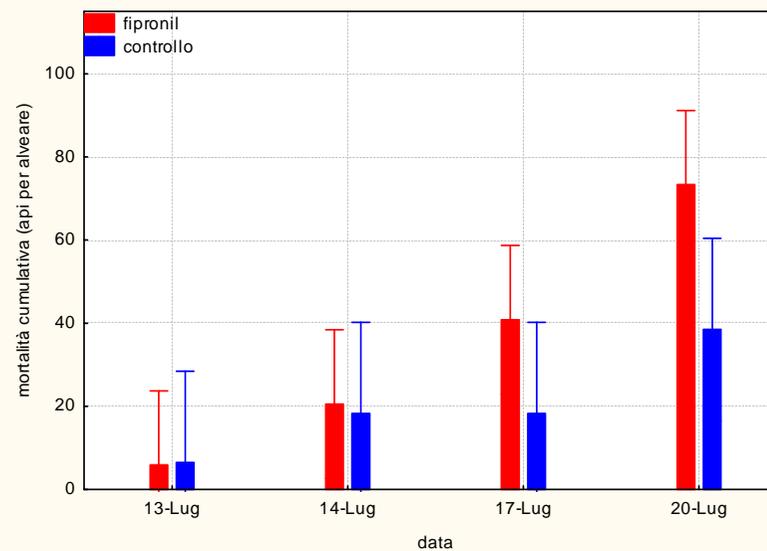
Semina 11 giugno con macchina non modificata



Semina 18 giugno con macchina non modificata



Semina 13 luglio con macchina non modificata



* differenza statisticamente significativa (test U di Mann-Whitney, $p=0,05$).

Colonie di api - risultati

- Nei riguardi del fitness delle colonie in prova riferito alla consistenza numerica di api e covata prima e dopo le semine solo nel thiametoxam con macchina modificata si è avuta una differenza statisticamente significativa nello sviluppo della covata tra colonie trattate e controllo.
- In nessun caso dopo le semine si è assistito ad apicidi consistenti
- La mortalità giornaliera media è risultata sempre piuttosto contenuta e solo in alcune occasioni il confronto tra trattato e controllo ha presentato una significatività statistica (mai con imidacloprid e fipronil con seminatrice modificata), c'è però da rilevare come le deviazioni standard nelle colonie trattate si siano assestate su livelli superiori rispetto al controllo come a testimoniare un qualche stress legato alla semina ed alla contaminazione delle api con le polveri di semina
- Le variabili ambientali, non uniformabili nei diversi periodi di semina, non consentono il confronto statistico tra i valori assoluti di mortalità rilevati nelle due modalità di semina (macchina con o senza modifica).