

Scheda APENET Monitoraggio e ricerca in apicoltura

Titolo "Api e agrofarmaci"

Studio effettuato dal Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA), Università degli Studi di Bologna

Competenze dell'Unità Operativa in relazione al progetto

L'area di Entomologia dell'U.O. si è occupata del rapporto api agrofarmaci da molti anni. Tra il 1983 e il 1987 il prof. Giorgio Celli, dell'allora Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell'Università di Bologna, ha coordinato la linea di Ricerca "Condizioni di sopravvivenza degli insetti pronubi negli agroecosistemi a gestione chimica intensiva" del progetto IPRA-CNR, e dal 1988 ha partecipato, insieme al suo collaboratore, dr Claudio Porrini, al Gruppo di ricerca "L'ape come insetto test dell'inquinamento agricolo" del progetto finalizzato del Ministero Agricoltura e Foreste: "Lotta biologica e integrata alle colture agricole e alle piante forestali". Dal 1994 al 1996 l'Istituto, nella persona del dr Claudio Porrini, ha avuto la responsabilità scientifica del monitoraggio ambientale con api (agrofarmaci e metalli pesanti) nel progetto "Life" "Gestione ecologica delle aree turistiche della fascia costiera emiliano-romagnola" promosso dalla Comunità Europea e dalla Regione Emilia Romagna, mentre dal 1997 al 2002, lo stesso Porrini, è stato incaricato di coordinare a livello nazionale il sottoprogetto "Ambiente" del programma di ricerca del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali denominato AMA (Ape, Miele, Ambiente) dove le linee di indagine, oltre alle api, riguardano i pronubi selvatici e le loro interazioni con l'ambiente agrario e naturale (censimento delle specie presenti, impollinazione delle piante coltivate, tossicità e pericolosità dei pesticidi, ecc.). Nell'ambito di tutti questi progetti, e di numerosi altri a livello locale, l'U.O. ha ricoperto un ruolo primario nella messa a punto di protocolli e sperimentazioni, in particolare per quanto riguarda l'interpretazione e l'elaborazione dei dati ottenuti con il monitoraggio degli agrofarmaci tramite le api, la standardizzazione di metodologie (in particolare di campo) per la valutazione degli effetti degli agrofarmaci nei confronti delle api. Nel 2003 l'U.O. (dr Porrini) ha svolto una consulenza scientifica in Argentina, per conto dell'IAEA (International Atomic Energy Agency) di Vienna, presso il Centro atomico di Ezeiza (Buenos Aires) per organizzare una rete di biomonitoraggio dei radionuclidi tramite le api. L'U.O. (dr Burgio), ha esperienza nel campo dell'analisi spaziale su insetti di importanza economica, metodi e tecniche di campionamento e interpretazione dei dati entomologici di tipo geostatistico.

Collaborazioni esterne

CRA-API: l'Istituto collaborerà con l'U.O. in tutte le linee di ricerca proposte, in particolare per quanto riguarda le prove di ordine etologico.

Centro Agricoltura e Ambiente "Giorgio Nicoli", Crevalcore, Bologna: il Centro collaborerà con l'U.O. in particolare per quanto riguarda la procedura del PER (*Proboscis Extension Reflex*) e la realizzazione delle mappe di rischio per gli insetti ipogei.

DiVAPRA – Università di Torino: collaborerà in prove ecotossicologiche ed etologiche e per l'elaborazione delle mappe di rischio.

Stato dell'arte

I fenomeni di mortalità o di spopolamento di famiglie di api vengono segnalati da diversi anni in numerosi Paesi, tra cui l'Italia. Più recentemente tali episodi hanno assunto aspetti particolarmente preoccupanti. Le ricerche svolte fino ad ora nel nostro Paese hanno messo in evidenza che esistono diversi fattori di rischio, sia interni che esterni all'alveare. Tra i fattori esterni all'alveare, sono particolarmente critici e rilevanti i trattamenti fitosanitari, soprattutto quelli effettuati in primavera-estate nelle aree a coltivazione intensiva. La maggior parte delle sostanze attive utilizzate in agricoltura sono tossiche per le api, pertanto quando queste vengono colpite direttamente durante il trattamento l'effetto più evidente è una ingente mortalità delle api adulte. Tuttavia vi sono diversi principi attivi che esplicano un'azione sulle api più subdola, in quanto non hanno una elevata tossicità sulle api adulte o, per diversi motivi, non vengono considerati pericolosi nei confronti dell'ape. Tra questi i più interessanti appartengono alle classi degli IGR, dei neonicotinoidi e dei microincapsulati. Gli IGR (*Insect Growth Regulators*) sono principi attivi che agiscono sugli insetti interferendo a livello ormonale con i loro stessi meccanismi fisiologici; alcuni mimano l'azione dell'ormone giovanile degli insetti, bloccando lo sviluppo da larva ad adulto (*Juvenile Hormone Analogues*); altri interferiscono con il meccanismo della muta, in particolare inibendo la sintesi di nuova chitina e uccidendo l'insetto durante lo stadio preimmaginale (*chitin synthesis inhibitors*). Questi principi attivi non sono tossici nei confronti delle api adulte e pertanto il loro utilizzo non

viene considerato dannoso. Tuttavia possono avere un impatto negativo sulla covata e quindi se vengono riportati all'alveare attraverso il nettare o il polline possono risultare estremamente dannosi. Analogo discorso vale per i microincapsulati. Questi prodotti, costituiti da microcapsule della dimensione di qualche decina di μm , sono studiati per rilasciare lentamente nell'ambiente, quando la pellicola d'acqua che le avvolge si asciuga, il principio attivo in esse contenuto al fine di effettuare meno interventi fitoiatrici; ma se l'idea è buona non lo è altrettanto la sua applicazione in campo. Infatti le microcapsule, portate insieme al polline dalle api in alveare, possono provocare una lenta ma inesorabile mortalità della covata e delle api di casa. Negli ultimi anni molti altri prodotti, con microcapsule di nuova generazione (di dimensione inferiore e costruite con nuovi materiali), sono apparsi sul mercato. La dimensione delle capsule, la tecnica di microincapsulazione e il materiale impiegato giocano un ruolo fondamentale per la salvaguardia del nostro prezioso pronubo. I prodotti neonicotinoidi hanno normalmente una tossicità molto spiccata nei confronti delle api. I formulati di queste sostanze attive usati nella concia delle sementi, vengono considerati non pericolosi in quanto si ritiene che non entrino in contatto con le api. Studi recenti hanno invece evidenziato che durante la semina di mais conciato vi è una dispersione delle sostanze attive, impiegate per la concia, che possono danneggiare le api (Greati *et al.*, 2003, 2006). Non bisogna tra l'altro trascurare che gli stessi principi attivi si utilizzano in altri settori agricoli in diverse formulazioni (es. spray in frutticoltura). E' stato dimostrato come tali molecole anche a dosi subletali possano provocare anomalie di comportamento delle api che possono condurre a uno spopolamento degli alveari (Bortolotti *et al.*, 2003; Medrzycki *et al.*, 2003). Nella primavera del 2005 e 2006, il CRA – API, il DiSTA dell'Università di Bologna e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie hanno svolto un'indagine sperimentale sulla mortalità e spopolamento degli alveari (nel periodo inizio marzo – fine maggio), con il contributo finanziario della Bayer Crop Science, in diverse aree, con presenza o meno di mais, delle regioni Emilia-Romagna e Veneto. L'elaborazione statistica dei dati ha evidenziato che la mortalità delle api era correlata positivamente con la presenza di mais, barbabietola e soia (quest'ultime due colture sono risultate positive, nonostante le limitate estensioni, perché, dove c'è il mais, sono spesso presenti), mentre era correlata negativamente con gli appezzamenti di vite, la corretta gestione degli alveari e la presenza di polline con alto valore proteico. Negli ultimi anni, fino al 2007, sono giunti al CRA-API un centinaio di questionari compilati da singoli apicoltori o dai Servizi Veterinari delle ASL. La maggior parte delle morie denunciate erano avvenute nel periodo corrispondente alle semine primaverili e i residui maggiormente riscontrati nei campioni di api morte pervenuti e analizzati presso il CRA-API appartenevano alla classe dei neonicotinoidi. Nella primavera del 2008, a seguito delle segnalazioni di mortalità di api in concomitanza con la semina di mais, in diverse aree dell'Italia settentrionale, sono stati raccolti campioni ufficiali di api, da parte delle ASL. In particolare, la Direzione Generale Sanità della Regione Lombardia ha invitato gli apicoltori a segnalare casi di spopolamento e/o morie e i Servizi Veterinari dell'ASL a effettuare i sopralluoghi, le visite agli alveari ed i campionamenti di api, compilando un apposito verbale/questionario. I campioni dovevano essere successivamente inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia per l'accertamento di patogeni con particolare riferimento alle infezioni virali, e al CRA-Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura di Bologna (CRA-API) per l'analisi di residui di imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin e fipronil. In base alle medesime motivazioni, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ha provveduto a effettuare analoghi campionamenti nel territorio di sua competenza. Anche questi campioni sono stati successivamente analizzati per la presenza di virus presso l'IZSLER di Brescia. In totale sono stati effettuati 105 campionamenti di api (65 nella Lombardia e 40 nelle Venezie), e 4 di polline nella Lombardia. La presenza di residui di Imidacloprid, Thiamethoxam e Clothianidin, utilizzati nella concia delle sementi di mais, in 52 campioni di api (tra cui 5 con presenza contemporanea di 2 pp.aa.) su 105 analizzati (49,5%) e in 3 campioni di polline (tra cui 1 con presenza contemporanea di 2 pp.aa.) su 4 analizzati (75%), è significativa della causa del danno provocato alle api, identificata con l'esposizione diretta delle api ai pp.aa. citati e/o il bottinamento su vegetali a loro volta esposti ai prodotti stessi.

Obiettivi specifici

Obiettivo della ricerca è la valutazione degli effetti sub-letali nei confronti delle api degli agrofarmaci di impiego più diffuso, in particolare gli IGR, i neonicotinoidi ed i microincapsulati, mediante l'utilizzo di test etologici di laboratorio, semicampo e campo. La scelta di questa tipologia di prove rispetto ad altre, è dettata dall'esigenza di individuare eventuali comportamenti anomali verso le api adulte o danni alla covata indotti dagli agrofarmaci, che in natura possono avere una ripercussione sullo sviluppo o la sopravvivenza della famiglia. Infatti, le sperimentazioni di tipo classico, impiegate essenzialmente per stabilire la DL_{50} e il rischio di un principio attivo nei confronti delle api, sono normalmente adottate nei Centri di saggio degli agrofarmaci nelle indagini di routine per l'omologazione dei prodotti fitosanitari.

Le mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei del mais e le valutazioni dell'utilità produttiva ed agronomica della concia delle sementi di questa coltura, servirà a capire la reale necessità del massiccio ricorso alla concia delle sementi di mais che si è praticato in questi anni.

Piano di attività

Prove di laboratorio

- *Proboscis Extension Reflex* (PER): il PER è un esame utilizzato per valutare la capacità associativa dell'ape adulta e consiste nel presentare all'ape, immobilizzata e con il solo capo libero, stimoli visivi od olfattivi associati o meno ad una ricompensa (goccia di soluzione zuccherina). Le api addestrate ad estroflettere la ligula in risposta allo stimolo odoroso ricompensato vengono trattate con l'agrofarmaco da studiare e quindi sottoposte nuovamente al test, per valutare se il principio attivo influisce negativamente sulla risposta. Questo test viene utilizzato per valutare gli effetti sub-letali delle sostanze farmacologiche sulle capacità cognitive e sulla memoria delle api (Decourtye e Pham-Delègue, 2002).

- Test del labirinto (*maze test*): la prova consiste nell'addestrare le api a volare attraverso un labirinto formato da circa 20 scatole cubiche di 30 cm di lato, munite di fori di 4 cm al centro di ogni lato. I fori possono essere aperti o chiusi, in modo da creare diversi percorsi, dei quali solo uno conduce ad un alimentatore con soluzione zuccherina. Gli altri percorsi portano a vicoli ciechi da cui l'ape è costretta a tornare indietro. La posizione dei cubi può essere modificata in modo da creare percorsi sempre nuovi e ogni foro può essere segnato con un colore o un simbolo che indica il percorso corretto. Le api vengono addestrate a seguire il percorso fino all'alimentatore, quindi dopo la somministrazione dell'agrofarmaco da studiare, gli viene sottoposto nuovamente il test. Questo test serve a valutare eventuali effetti dei prodotti sulle capacità di orientamento e sulla memoria delle api (Zhang *et al.*, 1996).

Prove di semicampo

Si prevedono saggi all'interno di tunnel (minimo due per ogni prova), uno dei quali verrà posto sulla coltura non trattata, mentre l'altro (o gli altri) sulla medesima coltura trattata con l'agrofarmaco da studiare. Nel periodo di fioritura nei tunnel saranno collocati nuclei di api, il più possibile omogenei tra loro, che verranno lasciati bottinare sulla coltura. Oltre alla mortalità giornaliera e all'attività di bottinamento in precisi momenti della giornata, saranno anche rilevati parametri relativi al comportamento delle bottinatrici, come la manifestazione di spasmi, problemi di mobilità, paralisi degli arti o altri comportamenti anomali da definire sulla base dell'agrofarmaco in studio. Le condizioni generali di salute e la forza della famiglia verranno valutate all'inizio e al termine della prova. Questo protocollo è stato recentemente inserito nelle procedure di registrazione degli agrofarmaci in Francia e si presta allo studio degli effetti di prodotti usati nella concia dei semi o trattamenti nel suolo (Giffard e Dupont, 2008).

Prove di campo

Prove di disorientamento delle api. La sperimentazione sarà in grado di individuare anomalie comportamentali, quali disorientamento e incapacità di ritorno all'alveare delle api. Tali saggi consistono nell'addestrare le api bottinatrici a visitare un alimentatore posto a distanza elevata dall'alveare, marcarle singolarmente con targhette numerate e quindi somministrargli il principio attivo per via orale o topica. Successivamente viene valutata la presenza di ogni singola ape sia all'alveare che all'alimentatore, per verificarne la capacità di orientamento in seguito all'assunzione del prodotto (Bortolotti *et al.*, 2003). Altri tipi di saggio potranno essere messi a punto sulla base dell'agrofarmaco da studiare e degli specifici effetti comportamentali che si sospetta esso induca sulle api.

Elaborazione di mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei (mais). I rilievi di campo, con specifiche trappole e altri eventuali metodi di campionamento integrativi per i fitofagi ipogei, nelle principali regioni maidicole e la successiva elaborazione dei dati (Burgio *et al.* 2005; Ramilli *et al.*, 2006), avranno una durata di almeno due anni. Ogni trappola verrà installata e controllata in funzione delle caratteristiche biologiche e della fenologia dell'insetto target. In particolare i campionamenti con le trappole a feromone potranno essere integrati con altre tecniche, come l'osservazione visiva o la raccolta mensile di larve, utili anche all'eventuale quantificazione del danno economico. Si prevede che la rete di campionamento, dimensionata rispetto a diversi fattori (estensione coltivazione mais, caratteristiche e conduzione agronomica, ecc.), comporterà un numero minimo di 30 punti per regione ed un massimo di 40. Le postazioni andranno controllate una o due volte al mese da aprile a settembre.

Articolazione temporale delle attività

1° anno di attività

- Scelta delle sostanze attive da sottoporre a studio in collaborazione con i Servizi Fitosanitari.
- Messa a punto dei saggi etologici attraverso prove preliminari ed attuazione degli stessi (*PER test*, *Maze test*).
- Allestimento delle sperimentazioni di campo e semicampo.
- Creazione della rete di campionamento degli insetti ipogei nelle aree maidicole, dimensionata, rispetto a diversi fattori, con un numero minimo di 30 punti per regione ed un massimo di 40, e prelievo dei campioni.

2° anno di attività

- Scelta delle sostanze attive da valutare nel secondo anno in collaborazione con i Servizi Fitosanitari.
- Proseguimento dei saggi etologici *PER test* e *Maze test*.
- Proseguimento delle sperimentazioni di campo e semicampo.
- Campionamento degli insetti ipogei nei punti individuati nelle aree maidicole.

Ostacoli prevedibili ed azioni correttive

In generale l'attività di ricerca proposta dall'U.O. non prevede grossi ostacoli per il raggiungimento degli obiettivi previsti. I test etologici possono però presentare diverse difficoltà, sia relativamente all'esecuzione, più o meno complessa a seconda del test, che all'interpretazione dei risultati. Nei test individuali di laboratorio (*PER* e *Maze*) può capitare che le api che non rispondano all'addestramento o che durante i saggi si comportino in modo molto differente l'una dall'altra. Per questo si rende spesso necessario compiere diverse prove preliminari o replicare più volte le sperimentazioni. Per le prove di semicampo (tunnel) e di campo, le principali difficoltà sono legate alle condizioni climatiche presenti al momento dell'esecuzione del test. Per le sperimentazioni che devono essere effettuate durante la fioritura della coltura, una stagione sfavorevole può addirittura cancellare l'intera prova. Di conseguenza, due stagioni successive rappresentano il tempo minimo necessario per garantire lo svolgimento della sperimentazione. In caso di impossibilità nell'esecuzione di una o più prove, si procederà all'elaborazione di protocolli alternativi, ad esempio utilizzando piante in vaso, oppure eseguendo test non strettamente legati ad un preciso periodo dell'anno. In ogni caso si prevede che i protocolli delle prove vengano adattati o modificati sulla base del tipo di agrofarmaco in studio.

Per la rete di campionamento degli insetti ipogei nelle aree maidicole non vi prevedono difficoltà insormontabili che potrebbero essere legate alla logistica dei campionamenti e alla disponibilità degli agricoltori.

Risultati attesi

Risultato delle sperimentazioni descritte sarà la valutazione degli effetti subletali indotti dagli agrofarmaci sulle api e la loro possibile ripercussione sullo stato di salute della colonia. Gli effetti di molti principi attivi sul comportamento delle api, per quanto già osservati in campo anche dagli stessi apicoltori, in pochi casi sono stati studiati in modo approfondito. Attraverso l'esecuzione di prove di laboratorio e di campo si intendono analizzare gli effetti sia singolarmente nelle api adulte, che sullo sviluppo e sullo stato generale della colonia. Ciò permetterà di valutare il reale impatto degli agrofarmaci sulle api, al di là della loro intrinseca tossicità che, comunque, dovrà essere considerata analizzando la bibliografia esistente (Porrini *et al.* 2000; Porrini *et al.*, 2008) e, soprattutto, la banca dati sui fitofarmaci del CRA-PAV.

Le mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei (mais), serviranno ad utilizzare il seme conciato solo nei casi in cui vi siano fattori di rischio o dove si riscontrino elevate infestazioni.

Ricadute e benefici

Alla luce dei recenti avvenimenti sugli estesi fenomeni di mortalità delle api, la valutazione del rischio dovuto ai prodotti usati in agricoltura assume oggi una estrema rilevanza. I protocolli di valutazione del rischio previsti dalle procedure di registrazione degli agrofarmaci si rivolgono perlopiù agli effetti letali di tossicità acuta. Vengono invece perlopiù trascurati gli effetti sub-letali che si manifestano in particolare sul comportamento o sulle capacità cognitive delle api; tuttavia questi effetti, quando sono di una certa entità o prolungati nel tempo, possono provocare alla famiglia danni ancora più gravi della perdita delle bottinatrici (Thompson e Maus, 2007).

Le sperimentazioni descritte aiuteranno a far luce sugli effetti meno evidenti, eppure di grande rilevanza, relativi all'azione degli agrofarmaci verso api. Ciò permetterà di meglio comprendere l'origine e lo sviluppo di alcune delle cause dei recenti fenomeni di mortalità delle api.

Bibliografia

- Bortolotti L., Montanari R., Marcelino J., Medrzycki P., Maini S., Porrini C., 2003. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 63-67.
- Burgio G., Ferrari R., Ragolini G., Petacchi R., Pozzati M., Reggiani A., Furlan L. Galassi T., 2005 - Analisi spaziale delle popolazioni di *Agriotes sordidus* Illiger e *Agriotes litigiosus* Rossi (Coleoptera Elateridae) mediante geostatistica e GIS: primi risultati di un'indagine eseguita in Emilia-Romagna. *Inf.tore Fitopat.*, 55 (4): 45-50.
- 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.
- Giffard H., Dupont T., 2008. Behaviour of honeybees: a guideline to assess troubles in bee foraging activity under insect-proof tunnels. 10th International Symposium “Hazard of pesticides to bees”, October 8-10 2008, Bucharest, Romania.
- Greatti M., Barbattini R., Stravisi A., Sabatini A. G., Rossi S., 2006. Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho® dressed seeds. *Bulletin of Insectology* 59 (2): 99-103.
- Greatti M., Sabatini A. G., Barbattini R., Rossi S., Stravisi A., 2003. Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 69-72.
- Medrzycki P., Montanari R., Bortolotti L., Sabatini A. G., Maini S., Porrini C., 2003. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 59-62.
- Porrini C., Celli G., Radeghieri P., Brokmeier K., 2000 - Pericolosità e tossicità dei pesticidi nei confronti delle api. In “Gli ausiliari nell'agricoltura sostenibile”, a cura di Giorgio Nicoli e Paolo Radeghieri, Calderini-Edagricole, Bologna, 371-382.
- Porrini C., Sabatini A.G., Sgolastra F., Maccagnani B., Tesoriero D., Medrzycki P., Venier F., Mencarelli M., Renzi T., Colombo R., Capelli M., Mattarozzi A.R., 2008 - Tossicità verso le api – (II). *Prontuario degli Agrofarmaci* (a cura di Mario Muccinelli), Edagricole, Milano (XII Ed.): 916-919.
- Ramilli F., Burgio G., Fabbri R., Tosio B., Vignudelli M., Rossi Pisa P., 2006.- Can geostatistics improve the understanding of spatio-temporal dynamics of soil arthropods within ecological infrastructures at farm-scale level? Proceedings of the 2nd WG Meeting “Landscape management for functional biodiversity”, Zurich-Reckenholz, Switzerland, 16-19 May 2006, *IOBC wprs Bull.*, 29 (6): 105-108.
- Thompson H. M., Maus C., 2007. The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest Management Science* 63: 1058–1061.
- Zhang S. W., Bartsch K., Srinivasan M. V. , 1996. Maze learning by honeybees. *Neurobiology of learning and memory* 66: 267–282.