



**CRA-API**

UNITÀ DI RICERCA  
DI APICOLTURA E BACHICOLTURA

**Relazione sull'attività svolta e sui risultati ottenuti  
nell'ambito del progetto APENET  
per la tematica “Effetti del mais conciato sulle api”  
Anno 2010**



Relazione aggiornata al 25 agosto 2010, con inserimento dei dati delle analisi e delle elaborazioni statistiche pervenute al CRA-API dalla data di presentazione della precedente versione (5 luglio 2010).

<b>1. La rete di monitoraggio .....</b>	<b>4</b>
1.1 Il sistema delle segnalazioni .....	5
<b>2. Dispersione di polveri durante la semina del mais conciato e stima degli effetti sulle api .....</b>	<b>7</b>
2.1 Test di polverosità del seme.....	7
2.2 Prove a punto fisso .....	8
2.2.1 <i>Obiettivi</i> .....	8
2.2.2 <i>Materiali</i> .....	9
2.2.3 <i>Metodi</i> .....	11
2.2.4 <i>Risultati</i> .....	12
2.3 Prove di semina in campo.....	20
2.3.1 <i>Obiettivi</i> .....	20
2.3.2 <i>Materiali e metodi</i> .....	20
2.3.3 <i>Risultati</i> .....	22
2.4 Rilevamento dei residui di principi attivi nel terreno e nelle piante di mais nei diversi stadi fenologici .....	30
2.5 Conclusioni .....	30
<b>3. Effetti dell'impolveramento delle api durante il sorvolo di un campo seminato con mais conciato.....</b>	<b>33</b>
3.1 Premessa .....	33
3.2 Materiali e metodi .....	33
3.3 Risultati.....	34
3.4 Conclusioni .....	35
<b>4. 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>37</b>
4.1 Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais.....	37
4.1.1 <i>Materiali</i> .....	37
4.1.2 <i>Schema sperimentale</i> .....	37
4.1.3 <i>Risultati prove agronomiche 2009</i> .....	38
4.2 Monitoraggio degli insetti ipogei 2009 .....	39
4.3 Sperimentazioni on-farm e monitoraggio degli insetti ipogei 2010 .....	40
4.3.1 <i>Materiali e metodi</i> .....	40
4.3.2 <i>Risultati</i> .....	41
4.4. Studio della persistenza nella pianta dei principi attivi usati per la concia.....	42
4.4.1 <i>Materiali</i> .....	42
4.4.2 <i>Metodi</i> .....	42
4.4.3 <i>Risultati</i> .....	42

<b>5. Effetti della guttazione del mais sulle api.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Neonicotinoidi nelle guttazioni fogliari delle piante di mais coltivate in campo e provenienti da semi conciatati con thiamethoxam, clothianidin ed imidacloprid.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Concentrazione di insetticida nelle gocce di guttazione provenienti da piante seminate e cresciute in tunnel a diversi regimi idrici.....</b>	<b>46</b>
<b>5.3 Concentrazione di insetticida nelle gocce di guttazione provenienti da piante seminate e cresciute su terreni a tessitura diversa.....</b>	<b>48</b>
<b>6. Effetti letali e subletali sulle api dei principi attivi usati nella concia delle sementi .....</b>	<b>53</b>
<b>6.1 Effetti verso le api della polvere proveniente dai semi di mais conciatati con clothianidin: valutazione della mortalità in laboratorio .....</b>	<b>53</b>
<b>6.2 Effetti verso le api della polvere proveniente dai semi di mais conciatati con clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil: valutazione della mortalità per contatto indiretto in laboratorio .....</b>	<b>54</b>
<b>6.3 Effetti verso le api della polvere proveniente dai semi di mais conciatati con clothianidin: valutazione della mortalità e di altri parametri in semicampo.....</b>	<b>57</b>
<b>6.4. Effetti subletali di clothianidin sul comportamento di bottinamento e di la capacità di homing delle api in campo.....</b>	<b>61</b>
<i>6.4.1 Effetti di clothianidin sul bottinamento e la danza delle api.....</i>	<i>61</i>
<i>6.4.2 Effetti della polvere proveniente dai semi di mais conciatati con clothianidin sulla capacità di homing delle api .....</i>	<i>62</i>
<b>6.5 Effetti verso le api delle polveri provenienti da semi conciatati con clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil: valutazione degli effetti su apprendimento e memoria di odori e colori ed orientamento spaziale.....</b>	<b>64</b>
<i>6.5.1 PER-test: valutazione degli effetti di clothianidin (polveri contaminate) sulla capacità di riconoscimento del linalolo, componente della ghiandola di Nasonov .....</i>	<i>64</i>
<i>6.5.2 PER-test: valutazione degli effetti di clothianidin (polveri contaminate) sulla capacità di riconoscimento del feromone della regina .....</i>	<i>69</i>
<i>6.5.3 Apprendimento e memoria dei colori ed orientamento spaziale in labirinto ad Y .....</i>	<i>71</i>
<i>6.5.4 Conclusioni.....</i>	<i>76</i>
<b>Responsabili delle ricerche descritte nei singoli capitoli .....</b>	<b>77</b>

## 1. La rete di monitoraggio

Negli ultimi anni in Europa ed in altri paesi del mondo sono stati segnalati numerosi fenomeni di mortalità di api o di spopolamento di alveari che, in alcuni casi, hanno assunto aspetti particolarmente preoccupanti. Le ricerche svolte fino ad ora hanno messo in evidenza che i fattori di rischio più probabili sono le malattie che colpiscono le api, i trattamenti fitosanitari, le pratiche apistiche e l'andamento climatico. Tra questi fattori sono particolarmente critici e rilevanti i trattamenti fitosanitari, soprattutto quelli effettuati in primavera-estate nelle aree a coltivazione intensiva. La maggior parte dei principi attivi utilizzati sono più o meno tossici per le api e gli effetti possono essere immediati e vistosi se queste vengono colpite direttamente, più subdoli e difficili da collegare alla causa quando si tratta, ad esempio, di prodotti usati nella concia delle sementi (es. neonicotinoidi), microincapsulati e regolatori di crescita (IGR).

Azioni dirette al monitoraggio dei fenomeni di spopolamento degli alveari e di moria delle api sono state attivate o sono in corso in diversi stati europei. In Italia, dopo le segnalazioni più o meno isolate che si sono succedute a partire dal 2000, la necessità di un sistema di monitoraggio e di segnalazione degli episodi di morie si è manifestata con forza nel 2008, portando alla ribalta la gravità degli eventi verificatisi nella primavera di quell'anno. La creazione di una rete di monitoraggio nazionale è importante per conoscere lo stato di salute degli alveari e rilevare, attraverso le opportune segnalazioni, la consistenza e le possibili cause del fenomeno.

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 quella di raccogliere informazioni sullo stato di salute delle famiglie di api che compongono i moduli - posizionati in ambienti rappresentativi per le regioni italiane -, 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).

Periodicamente (4 volte all'anno: dopo l'inverno; in primavera inoltrata; durante l'estate; prima dell'inverno) gli alveari di ogni postazione dovranno essere accuratamente controllati da un operatore e, in particolare, saranno raccolti tutti i dati relativi allo stato sanitario (presenza di parassiti e patogeni), allo stato nutrizionale (abbondanza di polline e miele) e allo stato della famiglia (numero di api e di covata, età della regina, ecc.).

Per la raccolta dei dati, gli operatori hanno a disposizione appropriati moduli cartacei da compilare. Successivamente, i dati dei rilievi effettuati sono inseriti in un sito web ([www.izsvenezie.it/apenet](http://www.izsvenezie.it/apenet)), in cui è stato predisposto un software dedicato per la raccolta e la gestione dei dati della rete di monitoraggio, accessibile ai referenti dei moduli di rilevamento, al fine di conoscere in tempo reale lo stato degli alveari sotto osservazione.

Durante i controlli periodici dovranno essere prelevati dei campioni di varie matrici apistiche (api morte, api vive, covata, miele, cera o polline) da sottoporre ad analisi di laboratorio (chimiche, patologiche e palinologiche).

Al fine di poter confrontare i dati provenienti dai vari moduli e ovviare alla soggettività delle rilevazioni, i responsabili dei moduli sono stati formati attraverso un corso d'addestramento per il corretto rilievo dei dati, la compilazione dei moduli, l'utilizzo della piattaforma informatica, il prelievo dei campioni e la loro gestione (catalogazione, conservazione e spedizione).

Nell'attività della rete nazionale sono state coinvolte anche altre iniziative di monitoraggio locale già attive o in fase di attivazione, tra cui:

- la rete di monitoraggio delle aree naturali protette, finanziata dal Ministero dell'Ambiente e gestita dall'ISPRA, attivata in 4 aree (Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Lazio);

- le reti di monitoraggio regionali attive in Lombardia, Toscana, Friuli Venezia Giulia e Piemonte, a cui si aggiungeranno moduli regionali ad integrazione di quelli già esistenti (ad esempio, Umbria, Calabria). La regione Veneto provvede con un finanziamento diretto al proprio modulo.

Nel corso del primo anno è stato attivato un modulo (composto da 5 apiari di 10 alveari ciascuno) per ogni regione, ad eccezione di alcune regioni che hanno attivato un loro programma di monitoraggio: Lombardia (50 apiari), Friuli Venezia Giulia (10 apiari) e Piemonte (10 apiari).

Nel 2009 non sono stati segnalati casi di moria o spopolamento, ad eccezione della stazione CLB 2 di Rossano Calabro, limitrofa all'area agrumicola della Piana di Sibari, dove si è verificata un'elevata moria di api in concomitanza con la fioritura degli agrumi.

Sulla base della rete di monitoraggio APENET, la mortalità invernale 2009-2010 si è attestata al 17,6% (113 alveari morti su 753). Il dato non si discosta molto da quello nazionale ottenuto attraverso l'utilizzo di specifici questionari, in base ai quali la mortalità per lo stesso periodo si è attestata al 19,5% (2.437 alveari morti su 12.933).

Le analisi dirette alla ricerca di agenti di malattia si sono concentrate su *Nosema apis*, *Nosema ceranae* e sui virus. I risultati ottenuti indicano una diffusione endemica in tutte le regioni italiane del fungo (Microsporidia) *Nosema ceranae*, che ha quasi completamente sostituito la specie presente precedentemente (*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.

Per quanto riguarda i virus, è 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 è stata riscontrata la presenza del virus iridescente delle api (AIV), del virus Kashmir (KBV) e del virus israeliano della paralisi acuta (IAPV).

Questo riscontro ha evidenziato 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.

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, oltre ad essere limitati solo ad alcune regioni, si basavano anche 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.

Le analisi chimiche eseguite su campioni d'api e di cera dirette al rilievo di residui di pesticidi organofosforati, organoclorurati, carbammati e neonicotinoidi non hanno rilevato presenze significative di dette sostanze. Questi risultati sono indicativi di una situazione favorevole per il settore dell'apicoltura, ad eccezione ovviamente degli eventi di moria acuta registrata in specifiche situazioni, anche al di fuori della rete di monitoraggio e rilevati attraverso il sistema delle segnalazioni.

## **1.1 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.

In passato, e in particolare nella primavera del 2008, le segnalazioni spopolamento o di mortalità degli alveari da parte degli apicoltori sono stati di fondamentale importanza per l'individuazione e la quantificazione delle morie causate dalla semina di mais conciato. 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.

Nel corso della primavera del 2009, altri 7 campioni collegati a segnalazioni non associate alla semina del mais sono pervenuti ai servizi veterinari. Di questi, 5 sono risultati positivi ai neonicotinoidi, ma, a differenza degli altri casi, l'evento è risultato essere causato dall'utilizzo non corretto di prodotti spray a base di neonicotinoidi nei frutteti. Per gli altri 2 campioni le analisi non hanno rilevato presenza di residui.

Relativamente alla primavera 2010, le segnalazioni (Tabella 1) non hanno riguardato aree maidicole. Inoltre si evidenzia come in 16 dei 21 casi segnalati ci sia stato anche il coinvolgimento dei servizi veterinari delle AASSLL competenti per territorio.

**Tabella 1** - Numero di segnalazioni pervenute ai servizi veterinari nelle primavere 2008, 2009 e 2010 in aree maidicole e non (Fonte IZS delle Venezie).

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

\* Segnalazioni non ufficiale

\*\* Una delle 2 segnalazioni riguarda una postazione della rete Apenet

\*\*\* In due casi si è rilevata la presenza di: 1. Api: Thiametoxan, Penconazolo; 2. Api: Acetamiprid; Foglie: Acetamiprid, Iprodione, Tebuconazolo; 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

## 1.2 Conclusioni

Da quanto esposto, e soprattutto per il raddoppio delle segnalazioni pervenute quest'anno rispetto allo scorso, si ritiene che il sistema integrato monitoraggio-segnalazioni, così come configurato, sia in grado di fornire adeguate informazioni sullo stato di salute degli alveari presenti sul territorio nazionale con particolare riferimento a specifici agenti di malattia e ai residui di pesticidi possibili cause di mortalità degli alveari. Ad oggi i rilevamenti effettuati hanno evidenziato che la presenza di nosema e di virus delle api, in assenza di residui di pesticidi, non sono stati causa di spopolamenti o morie di api e alveari. Al contrario, le segnalazioni di morie di api in forma acuta sono state associate alla presenza rilevante di residui di pesticidi.

## 2. Dispersione di polveri durante la semina del mais conciato e stima degli effetti sulle api

La linea di ricerca prevede:

- la misura della polverosità del seme di mais conciato con i 4 principi attivi oggetto dell'indagine;
- la quantificazione delle polveri e del principio attivo emessi a terra e nell'aria durante la semina con seminatrice pneumatica modificata e non;
- la valutazione degli effetti sulle api delle polveri rilasciate durante la semina;
- la valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia del mais;
- la valutazione della persistenza nel suolo e della traslocazione dei principi attivi in diverse parti della pianta.

Per quanto riguarda la polverosità del seme, essa è stata valutata sottoponendo dei campioni di seme al test di Heubach.

La quantificazione delle polveri da abrasione disperse durante la semina è stata effettuata sia in prove a punto fisso che in prove di campo, utilizzando una seminatrice pneumatica munita di un sistema di tubi deflettori.

Le osservazioni sulle api sono state effettuate nel corso delle prove di semina in campo disponendo delle gabbiette spia intorno a ciascun campo di prova.

Tali attività sono di seguito descritte in dettaglio.

Per quanto riguarda la valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia e la valutazione della persistenza nel suolo e della traslocazione dei principi attivi nei tessuti della pianta, i risultati non sono al momento disponibili in quanto, al momento della redazione della presente relazione, la coltura si trova ancora in una fase fenologica precoce. Pertanto, i dati relativi a tali attività potranno essere disponibili a fine ciclo (settembre-ottobre).

### 2.1 Test di polverosità del seme

In base al Protocollo per il test di Heubach (*Description of the Heubach method for the determination of the fine dust quantity of corn seeds treated with insecticides, Author: JKI Institute for Plant Protection in Agriculture and Grassland, Braunschweig, December 2008*), il seme conciato deve essere campionato alla fonte, dal flusso diretto al confezionamento e, successivamente condizionato per almeno 48 h a temperatura e umidità relativa costanti.

La finalità del test non è verificare la rispondenza dei dati dichiarati dall'industria, ma fornire dati relativi all'evoluzione del prodotto nel suo normale cammino dallo stabilimento all'azienda, dato questo che torna utile all'industria stessa.

In questo contesto il test è stato ripetuto in modo analogo a quanto fatto nel 2009 su seme ibrido di mais PR32G44, fornito da Pioneer Hi-Breed, sottoposto allo stesso trattamento conciante con i quattro principi attivi utilizzato nel 2009. Il seme è stato conferito al CRA-ING il giorno 3 Marzo 2010. I campioni di seme da sottoporre al test di Heubach sono stati immediatamente prelevati e conservati secondo quanto indicato nel suddetto protocollo. Il test è stato eseguito il giorno 17 Marzo 2010. I risultati sono riportati nella Tabella 2, dove vengono anche confrontati con i dati forniti dal produttore.

Le quantità di polvere fine (Tabella 2, colonne in grassetto), quella cioè trattenuta dal filtro del cilindro di Heubach e sulla quale viene fatta la valutazione, è risultata più bassa di quella dichiarata dal produttore.

Oltre alle polveri fini, è stata quantificata anche la frazione di polvere grossa, non intercettata dal filtro dello strumento, che si deposita sul fondo del recipiente di vetro dello strumento, la quale rappresenta circa il 90% della polvere totale estratta.

A titolo indicativo, associando quantità di polvere fine e dosi/seme (moltiplicando i relativi valori in Tabella 2) si ottiene una graduatoria secondo la quale la maggiore quantità di p.a. dispersa con la polvere da abrasione si ha per il clothianidin (per il quale si produce più polvere e si applica una

dose maggiore), seguito nell'ordine da imidacloprid, thiamethoxam e fipronil. Sebbene tali osservazioni siano riferite a condizioni di laboratorio, differenti da quelle operative, esse sono risultate utili nella successiva valutazione dei risultati delle prove di semina.

**Tabella 2** - Polverosità del seme conciato con i 4 p.a., misurata con il cilindro di Heubach.

Nome prodotto commerciale (principio attivo)	dati forniti dal produttore		dati rilevati CRA-ING		
	<b>Polvere fine (filtro Heubach) g/q</b>	Dose p.a., mg/seme	<b>Polvere fine, (filtro Heubach) g/q</b>	Polvere grossolana, g/q	Polvere totale, g/q
Gaucho (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

Infine, il test di Heubach è stato effettuato anche su un campione del seme delle prove del 2009, conciato con clothianidin, prelevato da una confezione integra. Il test ha fornito un valore di polverosità di 1,248 g/q, analogo a quello ottenuto nel test condotto al CRA-ING in occasione delle prove del 2009 (Maggio 2009). Ciò testimonia la stabilità del trattamento nel tempo, come si era detto anche nelle conclusioni della relazione dell'attività 2009. Lo stesso seme da cui è stato prelevato il suddetto campione, è stato sottoposto ad una "semina" a punto fisso, che ha consentito di raccogliarlo in recipienti collocati sotto gli elementi di semina e quindi è stato provato nuovamente al cilindro di Heubach. In questo caso il risultato è stato di 3,998 g/q. Nella remota prospettiva di poter effettuare uno studio sull'argomento, la differenza fra i due valori potrebbe costituire un parametro per stimare il tipo di "maltrattamento" che il seme subisce nel passaggio nella seminatrice e la capacità del processo di concia di resistere ad esso.

## 2.2 Prove 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. Nel corso primo anno di progetto tale attività non ha potuto avere l'attenzione necessaria a causa dell'emergenza in cui si è dovuto operare, tuttavia è stato possibile sviluppare alcuni dispositivi da utilizzare nel corso del secondo anno.

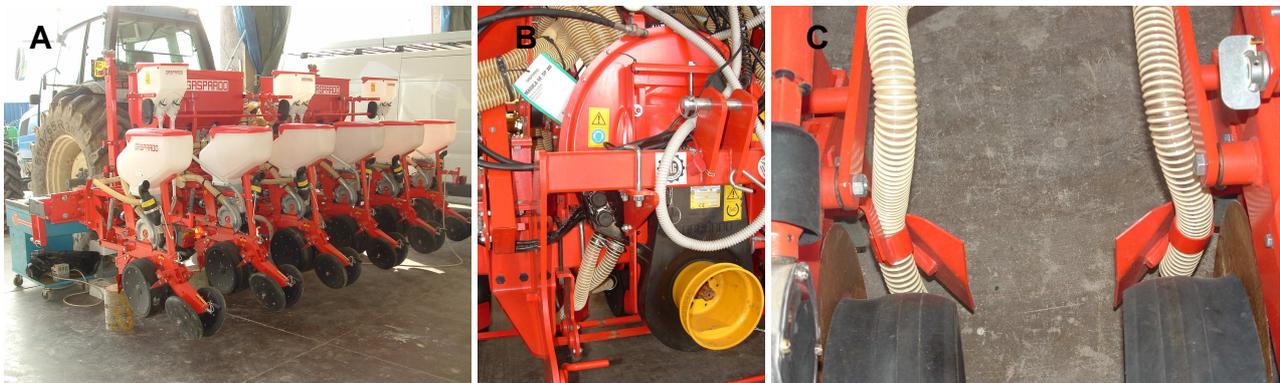
### 2.2.1 Obiettivi

Obiettivo principale è 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.

### 2.2.2 Materiali

E' stata utilizzata una seminatrice di precisione pneumatica a sei file (sesto di semina: 0,75m x 0,18m, 75000 semi /ha) Gaspardo Magica (Figura 1-A), dotata di un sistema di 4 tubi deflettori che, a due a due, convogliano l'aria espulsa dal ventilatore posteriormente ai due assolcatori centrali (Figura 1-B e C). Qui la polvere, schermata dai due versoi degli assolcatori, viene indirizzata nel solco e parzialmente ricoperta dal terreno dopo il passaggio. Il sistema è stato fornito con la macchina dal costruttore. Non è di tipo universale, ma dedicato. Un'osservazione importante è che sulla seminatrice Gaspardo Magica, a causa della sua struttura e conformazione, non è possibile montare il dual pipe deflector fornito da Syngenta nel 2009, molto ingombrante. La seminatrice è stata posta nella zona di prova, sollevata da terra e collegata ad un trattore per l'azionamento del depressore mediante presa di potenza. Il regime della p.d.p. è stato regolato in modo da ottenere una depressione di 45 mbar.



**Figura 1** - 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.

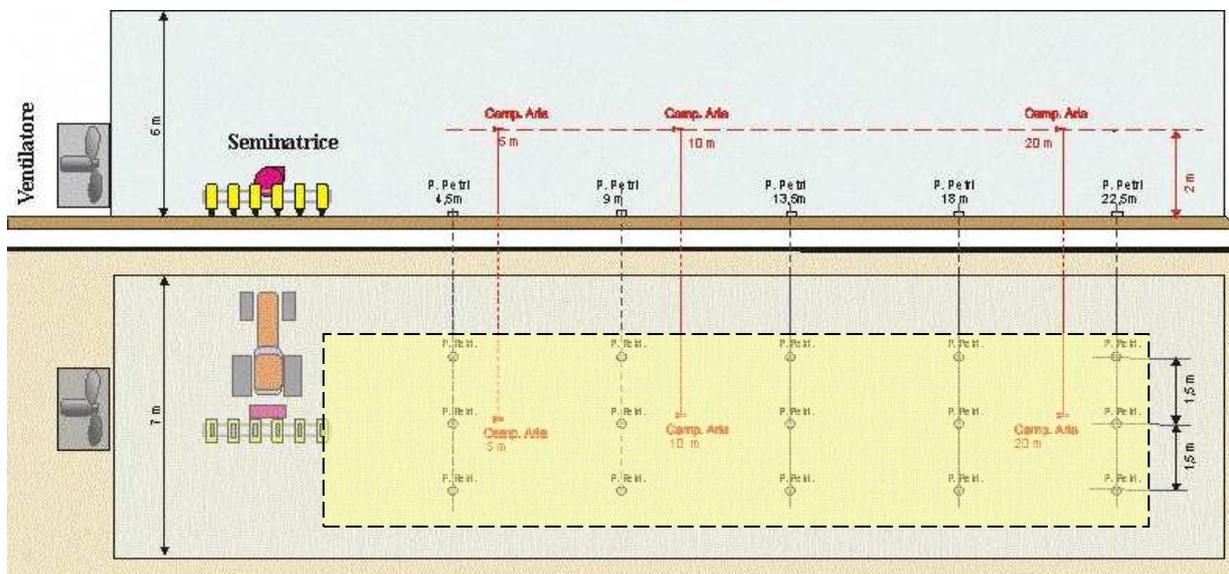
E' stato impiegato seme di mais conciato di cui si è detto al punto 1, preventivamente sottoposto a test di Heubach per la determinazione della polverosità.

Per l'azionamento del sistema di distribuzione del seme da fermo, simulando la velocità di semina in campo, è stato utilizzato un motore elettrico collegato all'albero di trasmissione del moto dalla ruota motrice agli organi di distribuzione (Figura 2-A). Mediante un inverter è possibile regolare a piacimento la velocità di rotazione della ruota motrice in modo da ottenere la velocità periferica (corrispondente alla velocità di lavoro) desiderata. E' stata adottata la velocità di 6 km/h. La superficie di prova è in cemento. Nel caso delle prove con la modifica, allo scopo di simulare l'effetto schermante dell'assolcatore e del terreno in condizioni di campo, immediatamente sotto ai due assolcatori centrali sono stati posti dei recipienti in plastica rivestiti con sacchetti di juta bagnati per trattenere la polvere nei confronti di possibili turbolenze (Figura 2-B).

La zona nella quale la prova è stata effettuata doveva essere necessariamente protetta. Essa è schematizzata nella Figura 3 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. La Figura 4 mostra un atomizzatore modificato (nell'angolo in basso a sinistra) allo scopo creare condizioni controllate di velocità dell'aria, la seminatrice sotto vento e successivamente la zona monitorata con piastre Petri e campionatori d'aria a varie distanze. Le condizioni di vento, temperatura e umidità sono state rilevate in continuo da appositi strumenti collocati nella zona di prova.



**Figura 2** – A) motore elettrico per l’azionamento del dispositivo di semina da fermo con macchina sollevata da terra; B) sotto l’assolcatore è stato posizionato un recipiente rivestito con un sacchetto di juta bagnato per proteggere la polvere dalle turbolenze, simulando la situazione reale di campo.



**Figura 3** – Schema dell’organizzazione delle prove a punto fisso. Le piastre Petri sono state poste, rispetto al lato destro della seminatrice, a 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. I tre campionatori d’aria sono stati posizionati lungo la fila centrale a 5 m, 10 m e 20 m. L’area in giallo rappresenta la zona di campionamento. La sua larghezza, pari a 4,5 m è determinata dalla distanza di 1,5m fra le tre file e risulta importante per l’elaborazione dei dati.



**Figura 4** – Zona di prova a punto fisso. A) è visibile la seminatrice sollevata da terra e nell’angolo in basso a sinistra l’atomizzatore utilizzato per generare il vento; B) nella vista dal fondo sono visibili le piastre Petri e i campionatori d’aria alle varie distanze.

### 2.2.3 Metodi

Sono state condotte prove preliminari allo scopo di :

- 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.
- definire le più opportune distanze di campionamento dalla seminatrice .
- effettuare una mappatura della velocità dell'aria (gradiente) nell'ambiente di prova.
- verificare la ripetibilità delle condizioni di prova.

Prove effettuate

*Seminatrice con e senza modifica* – Per l'osservazione della deriva della polvere da abrasione nelle due condizioni, in ambiente controllato è stato adottato uno schema che 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 3. 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 37 mm. Il campionamento è stato effettuato impostando i tre strumenti su una portata d'aria di 5 l/min.

Le prove hanno riguardato i quattro principi attivi imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam e fipronil. La seminatrice è stata provata con e senza la modifica descritta in precedenza. Riguardo al suo posizionamento, come già detto 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 una dose (25000 semi) per ogni ripetizione, corrispondenti a 3333 m<sup>2</sup>. Il campionamento aveva inizio all'avvio della semina e proseguiva, dopo la fine della semina, per altri 5 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.

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 l'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.

Elaborazione dei risultati delle analisi – Innanzitutto occorre ricordare che i risultati delle analisi forniscono dati relativi ad una superficie teorica seminata di un terzo di ettaro, concentrati su una zona di campionamento larga 4,5 m e lunga 22,5. 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 ( $\mu\text{g}/\text{piastra}$ ). In primo luogo, tale quantità è stata riferita all'unità di superficie ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ). 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 (area gialla tratteggiata in Figura 3) e alla durata della prova, è possibile calcolare il numero teorico di passaggi effettuati dalla seminatrice davanti alla zona di campionamento. Dividendo per tale valore la concentrazione per unità di superficie si ottiene la quantità di p.a. per metro quadrato e per passaggio ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$  passaggio), alle varie distanze multiple di 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). 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  $3600 \text{ m}^2$  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.

I valori forniti da questo tipo di elaborazione sono stati confrontati con quelli di prove di campo del 2009 nei quali si sono avute condizioni di vento (direzione e velocità) assimilabili a quelle delle prove a punto fisso.

Per quanto riguarda i filtri dei campionatori d'aria, le analisi forniscono la quantità di p.a. intercettata dal filtro ( $\mu\text{g}/\text{filtro}$ ). 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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (= 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 stata ritenuta possibile.

#### **2.2.4 Risultati**

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 dell'atomizzatore modificato in modo da

indirizzare tutta l'aria verso il lato destro 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. La direzione è risultata sempre perpendicolare alla direzione di semina. Nella Tabella 3 sono riportati i valori della velocità del vento rilevati a varie altezze in vari punti del tunnel.

A valle della seminatrice, è stato osservato che la velocità del vento a 2 m da terra, dopo un valore di 2,5 m più vicino alla seminatrice, si attesta su valori di circa 1,7 m/s lungo tutta la zona di campionamento. In corrispondenza delle piastre Petri, vicino al suolo, si osserva una maggiore variabilità dovuta alla presenza della stessa seminatrice e, soprattutto, delle ruote posteriori del trattore, che schermano in particolare le piastre poste a 4,5 m 9 m e 13,5 m della fila n. 3. La velocità del vento a livello del terreno è di circa 1,5 m/s. Tuttavia il valore indicato risulta ricorrente in numerose delle prove di campo svolte nel 2009.

**Tabella 3** - Andamento della velocità del vento in varia punti del tunnel e a varie altezze.

Posizione del rilievo (lato destro della seminatrice assunto come origine (=0) (m)	velocità del vento a 1 m da terra (m/s)	note	velocità del vento a terra (m/s)			note			
			fila 1	fila 2	fila 3				
-4,5	3,75	sul lato sinistro della seminatrice verso il ventilatore	-						
0	2,9	sul lato destro della seminatrice verso la zona di prova	1			vicino estremità tubo deflettore di destra			
Posizione del rilievo (lato destro della seminatrice assunto come origine (=0) (m)	velocità del vento a 2 m da terra (m/s)	note	velocità del vento a terra vicino piastre petri (m/s)			note			
			fila 1	fila 2	fila 3				
			4,5	2,5	2,6		1,5	0	La fila 2 è centrale in corrispondenza degli organi di semina. La fila 3 è in corrispondenza delle ruote posteriori del trattore ed è schermata da queste: alle distanze minori il vento è assente e questo si ripercuote sulle quantità di principi attivi rilevati
			9	1,75	2,1		1,65	0	
			13,5	1,75	1,6		1,65	0,4	
18	1,55	1,5	1,7	1,2					
22,5	1,7	1,5	1,65	1,2					

*Risultati delle analisi* – Le analisi del contenuto delle piastre Petri hanno fornito i valori in termini di µg/piastra Petri riportati nella Tabella 4, con le percentuali di abbattimento della concentrazione in seguito all'impiego della modifica. Per quanto riguarda la concentrazione nell'aria, è stata fatta una elaborazione analoga alla precedente. Le quantità di principi attivi nell'aria sono in media decisamente inferiori nel caso di utilizzo di modifica, in tutti i casi tranne per il fipronil in cui a distanza di 20 m dalla linea di semina si è riscontrato un aumento.

**Tabella 4** - Confronto delle quantità dei diversi principi attivi intercettate dalle piastre Petri con seminatrice modificata e non modificata (media  $\pm$  errore standard, n = 9).

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>imidacloprid</b> a terra ( $\mu\text{g}/\text{piastra Petri}$ ) (media $\pm$ errore standard)		Riduzione concentrazione a terra (%)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
4,5	2,82 $\pm$ 0,56	0,99 $\pm$ 0,15	65%
9	1,88 $\pm$ 0,34	0,35 $\pm$ 0,05	82%
13,5	1,06 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,06	76%
18	0,85 $\pm$ 0,15	0,31 $\pm$ 0,07	63%
22,5	0,72 $\pm$ 0,12	0,09 $\pm$ 0,01	87%

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>clothianidin</b> a terra ( $\mu\text{g}/\text{piastra Petri}$ ) (media $\pm$ errore standard)		Riduzione concentrazione a terra (%)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
4,5	5,74 $\pm$ 1,00	2,74 $\pm$ 0,63	52%
9	3,20 $\pm$ 0,30	1,10 $\pm$ 0,15	66%
13,5	2,19 $\pm$ 0,22	0,96 $\pm$ 0,16	56%
18	1,45 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,08	41%
22,5	1,00 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,06	20%

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>thiamethoxam</b> a terra ( $\mu\text{g}/\text{piastra Petri}$ ) (media $\pm$ errore standard)		Riduzione concentrazione a terra (%)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
4,5	2,75 $\pm$ 0,57	1,95 $\pm$ 0,55	29%
9	2,27 $\pm$ 0,26	1,28 $\pm$ 0,12	44%
13,5	1,20 $\pm$ 0,26	0,53 $\pm$ 0,10	56%
18	1,56 $\pm$ 0,14	0,52 $\pm$ 0,04	66%
22,5	0,41 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,03	39%

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>fipronil</b> a terra ( $\mu\text{g}/\text{Piastra Petri}$ ) (media $\pm$ errore standard)		Riduzione concentrazione a terra (%)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
4,5	4,30 $\pm$ 0,68	1,54 $\pm$ 0,32	64%
9	2,56 $\pm$ 0,25	0,99 $\pm$ 0,12	61%
13,5	1,28 $\pm$ 0,11	0,67 $\pm$ 0,05	48%
18	0,48 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,04	44%
22,5	0,28 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,02	50%

I dati che hanno originato la Tabella 4 sono stati sottoposti ad analisi statistica della varianza a schemi fattoriali per ogni distanza di campionamento. Oltre alle ripetizioni, sono stati considerati come fattori di variazione le posizioni (fila 1, 2, 3) delle piastre Petri su ogni distanza (Tabella 3), la presenza o meno di modifica sulla seminatrice e l'interazione fra questi due fattori. I risultati dell'analisi sono riportati nella Tabella 5.

**Tabella 5** - Risultati dell'analisi della varianza sui dati osservati a terra nelle prove a punto fisso.

cause variazione		Analisi della varianza - Grado di significatività alle varie distanze																			
		4,5 m				9 m				13,5 m				18 m				22,5 m			
		F calc		F tavole		Ris.	F calc		F tavole		Ris.	F calc		F tavole		Ris.	F calc		F tavole		Ris.
			p = 0,05	p = 0,01			p = 0,05	p = 0,01		p = 0,05		p = 0,01		p = 0,05	p = 0,01			p = 0,05	p = 0,01		
Clothianidin	Ripetizioni (3)	0,24	19,39	99,40		2,76	19,39	99,40		2,46	19,39	99,40		2,93	19,39	99,40		1,19	19,39	99,40	
	Posizioni (3)	9,64	4,10	7,56		22,09	4,10	7,56		9,03	4,10	7,56		0,96	4,10	7,56		0,83	4,10	7,56	
	Sem M - Sem NM	13,82	4,96	9,65		171,59	4,96	9,65		59,92	4,96	9,65		36,63	4,96	9,65		4,51	4,96	9,65	
	Interaz. Sem. / Pos.	2,19	4,10	7,56		6,39	4,10	7,56		7,15	4,10	7,56		0,20	4,10	7,56		0,14	4,10	7,56	
imidacloprid	ripetizioni	0,24	19,39	99,40		2,76	19,39	99,40		2,46	19,39	99,40		2,93	19,39	99,40		1,19	19,39	99,40	
	posizioni	9,64	4,10	7,56		22,09	4,10	7,56		9,03	4,10	7,56		0,96	4,10	7,56		0,83	4,10	7,56	
	MM / MNM	13,82	4,96	9,65		171,59	4,96	9,65		59,92	4,96	9,65		36,63	4,96	9,65		4,51	4,96	9,65	
	int. Macch./Pos.	2,19	4,10	7,56		6,39	4,10	7,56		7,15	4,10	7,56		0,20	4,10	7,56		0,14	4,10	7,56	
thiametoxam	ripetizioni	1,18	19,39	99,40		1,31	19,39	99,40		0,87	19,39	99,40		0,20	19,39	99,40		2,48	19,39	99,40	
	posizioni	8,14	4,10	7,56		7,85	4,10	7,56		17,28	4,10	7,56		1,78	4,10	7,56		0,26	4,10	7,56	
	MM / MNM	2,88	4,96	9,65		27,26	4,96	9,65		15,43	4,96	9,65		50,68	4,96	9,65		6,37	4,96	9,65	
	int. Macch./Pos.	0,56	4,10	7,56		4,76	4,10	7,56		5,69	4,10	7,56		0,85	4,10	7,56		0,09	4,10	7,56	
fipronil	ripetizioni	2,14	19,39	99,40		1,17	19,39	99,40		0,88	19,39	99,40		0,42	19,39	99,40		0,92	19,39	99,40	
	posizioni	12,90	4,10	7,56		6,86	4,10	7,56		3,97	4,10	7,56		0,55	4,10	7,56		0,25	4,10	7,56	
	MM / MNM	44,04	4,96	9,65		56,01	4,96	9,65		34,96	4,96	9,65		14,31	4,96	9,65		11,65	4,96	9,65	
	int. Macch./Pos.	2,10	4,10	7,56		0,67	4,10	7,56		0,16	4,10	7,56		0,22	4,10	7,56		0,72	4,10	7,56	

Legenda	
	non significativo
	significativo per p=0,05
	significativo per p=0,01

Dai risultati in Tabella 5 si possono trarre le seguenti indicazioni:

- la variabilità legata alle ripetizioni non è mai significativa, a conferma della bontà del sistema di prova relativamente al controllo delle condizioni di prova;
- la posizione delle piastre Petri è un fattore importante di variabilità (responsabile spesso di differenze significative al 99%) il cui peso tende a diminuire al crescere della distanza, a conferma di quanto descritto in precedenza, sull'azione schermante della stessa seminatrice e soprattutto del trattore.
- Le differenze dovuta alla presenza della modifica è quasi sempre altamente significativa. Fa eccezione il caso del thiametoxam a 4,5 m (nel quale si è rilevata una elevatissima variabilità legata alla posizione, relativamente alla quale la modifica ha un effetto poco evidente); all'aumentare della distanza di campionamento, le differenze sembrano stemperarsi risultando non significative per il clothianidin a 22,5 ma e significativo al 95% per il thiametoxam, sempre a 22,5 m.

Si può quindi concludere che anche dal punto di vista statistico, la presenza della modifica alla seminatrice risulta essere un fattore significativo nel determinare il livello di concentrazione di principio attivo sulla superficie del terreno.

Per quanto riguarda le concentrazioni nell'aria, i dati sono stati trattati analogamente a quanto fatto in precedenza per le concentrazioni a terra. I risultati sono riportati nelle Tabelle 6 e 7.

Le quantità di principi attivi nell'aria appaiono in media decisamente inferiori nel caso di utilizzo di modifica in tutti i casi tranne che per il fipronil per il quale, a distanza di 20 m dalla linea di semina si è riscontrato un aumento (Tabella 6). Dal punto di vista statistico, le differenze sono risultate significative (analisi della varianza, Tabella 7) solo nel caso del clothianidin (5 m e 10 m) e del thiamethoxam (10 m), probabilmente per effetto dello basso numero di valori a disposizione.

**Tabella 6** - Confronto delle quantità dei diversi principi attivi intercettate dai campionatori d'aria con seminatrice modificata e non modificata (media  $\pm$  errore standard, n = 3).

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>imidacloprid</b> nell'aria (ppb) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
5	2,31 $\pm$ 0,65	1,58 $\pm$ 0,28	32%
10	1,39 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,35	28%
20	1,25 $\pm$ 0,30	0,99 $\pm$ 0,30	21%

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>clothianidin</b> nell'aria (ppb) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
5	5,17 $\pm$ 0,27	1,16 $\pm$ 0,44	78%
10	3,18 $\pm$ 0,39	1,03 $\pm$ 0,05	68%
20	1,63 $\pm$ 0,12	1,12 $\pm$ 0,27	32%

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>thiamethoxam</b> nell'aria (ppb) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
5	2,94 $\pm$ 0,45	2,12 $\pm$ 0,29	28%
10	2,67 $\pm$ 0,55	1,80 $\pm$ 0,57	33%
20	1,92 $\pm$ 0,29	1,35 $\pm$ 0,20	30%

Distanza dalla linea di semina (m)	Concentrazione <b>fipronil</b> nell'aria (ppb) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata	
5	6,80 $\pm$ 0,40	5,96 $\pm$ 0,08	12%
10	6,45 $\pm$ 0,12	6,34 $\pm$ 0,87	2%
20	5,03 $\pm$ 0,33	5,88 $\pm$ 1,10	-17%

**Tabella 7** - Risultati dell'analisi della varianza sui dati relativi ai filtri dei campionatori d'aria nelle prove a punto fisso.

Analisi della varianza - Grado di significatività alle varie distanze													
cause variazione		5 m			10 m			20 m					
		F calc	F tavole		Ris.	F calc	F tavole		Ris.	F calc	F tavole		Ris.
			p = 0,05	p = 0,01			p = 0,05	p = 0,01			p = 0,05	p = 0,01	
Clothianidin	ripetizioni	17,56	200,00	4999,00		1,52	200,00	4999,00		1,11	200,00	4999,00	
	MM / MNM	554,30	18,51	98,49		38,29	18,51	98,49		3,22	18,51	98,49	
Imidacloprid	ripetizioni	0,18	200,00	4999,00		1,82	200,00	4999,00		1,00	200,00	4999,00	
	MM / MNM	0,63	18,51	98,49		1,61	18,51	98,49		10,65	18,51	98,49	
Thiametoxam	ripetizioni	0,05	200,00	4999,00		27,33	200,00	4999,00		3,32	200,00	4999,00	
	MM / MNM	1,23	18,51	98,49		39,51	18,51	98,49		16,71	18,51	98,49	
Fipronil	ripetizioni	0,70	200,00	4999,00		0,57	200,00	4999,00		1,75	200,00	4999,00	
	MM / MNM	3,71	18,51	98,49		0,01	18,51	98,49		0,74	18,51	98,49	

Legenda	
	non significativo
	significativo per p=0,05
	significativo per p=0,01

I valori riportati nelle Tabelle 4 e 6 sono stati elaborati allo scopo di tracciare i diagrammi che descrivono l'andamento delle concentrazioni a terra e nell'aria nelle diverse condizioni di prova.

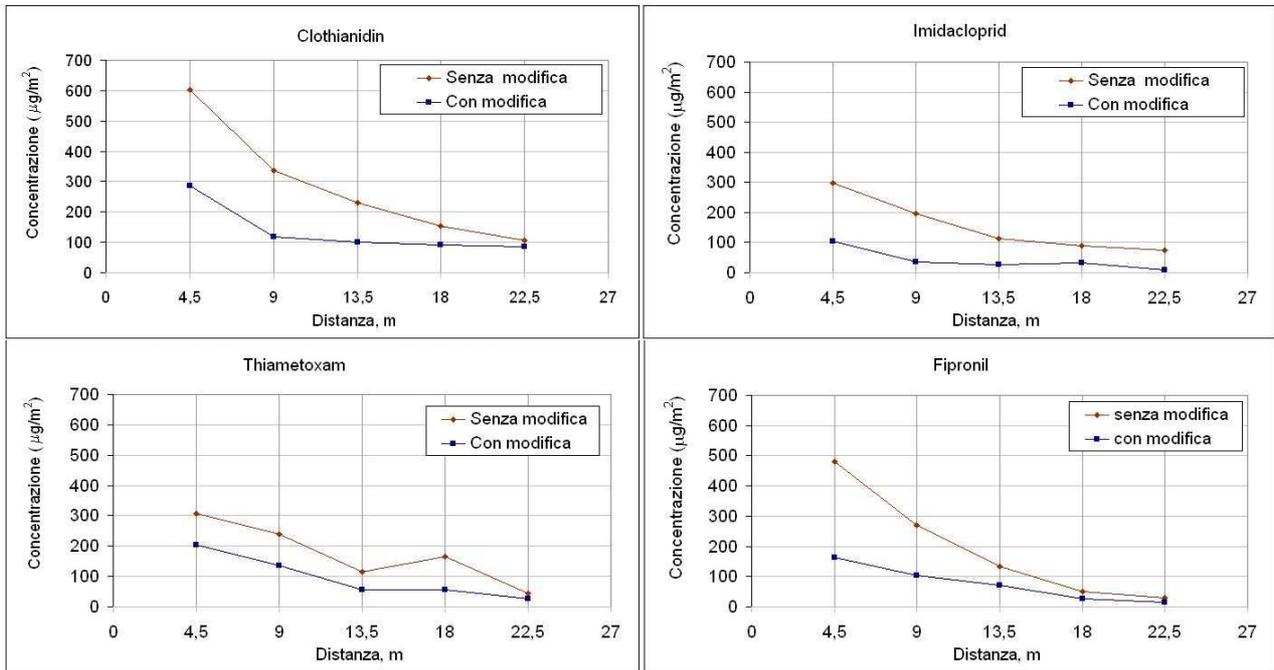
In Figura 5, per tutti i principi attivi, con e senza modifica, il contenuto delle piastre Petri è stato riferito all'unità di superficie ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ). Come indicato in precedenza, i valori si riferiscono ad una quantità di seme corrispondente ad 1/3 di ettaro, concentrata nella zona di campionamento. Di conseguenza sono molto elevati e servono ad evidenziare cosa avviene, nella zona sottovento rispetto alla seminatrice, nelle condizioni di prova. In particolare si osservano chiaramente le differenze fra le quantità riscontrate con e senza modifica applicata alla seminatrice. La riduzione % di concentrazione di p.a. osservabile lungo tutta la distanza di campionamento è mediamente del 50% (>50 % per imidacloprid e fipronil; <50% per il thiametoxam). I valori nel dettaglio sono gli stessi riportati nella Tabella 4.

Sulla base dei dati di Figura 5, e anche in seguito ai risultati dell'analisi della varianza, in base a quanto descritto al paragrafo precedente, sono state ricavate le curve di previsione della distribuzione dei principi attivi a terra in condizioni di campo. Secondo tale elaborazione, la distribuzione che si sarebbe avuta su parcelle analoghe a quelle delle prove descritte da Agrofarma (superficie:  $3600 \text{ m}^2$ ; lato: 36 m; numero di passaggi: 8) alla stessa velocità del vento e di avanzamento avrebbe avuto l'andamento riportato nei diagrammi di Figura 6.

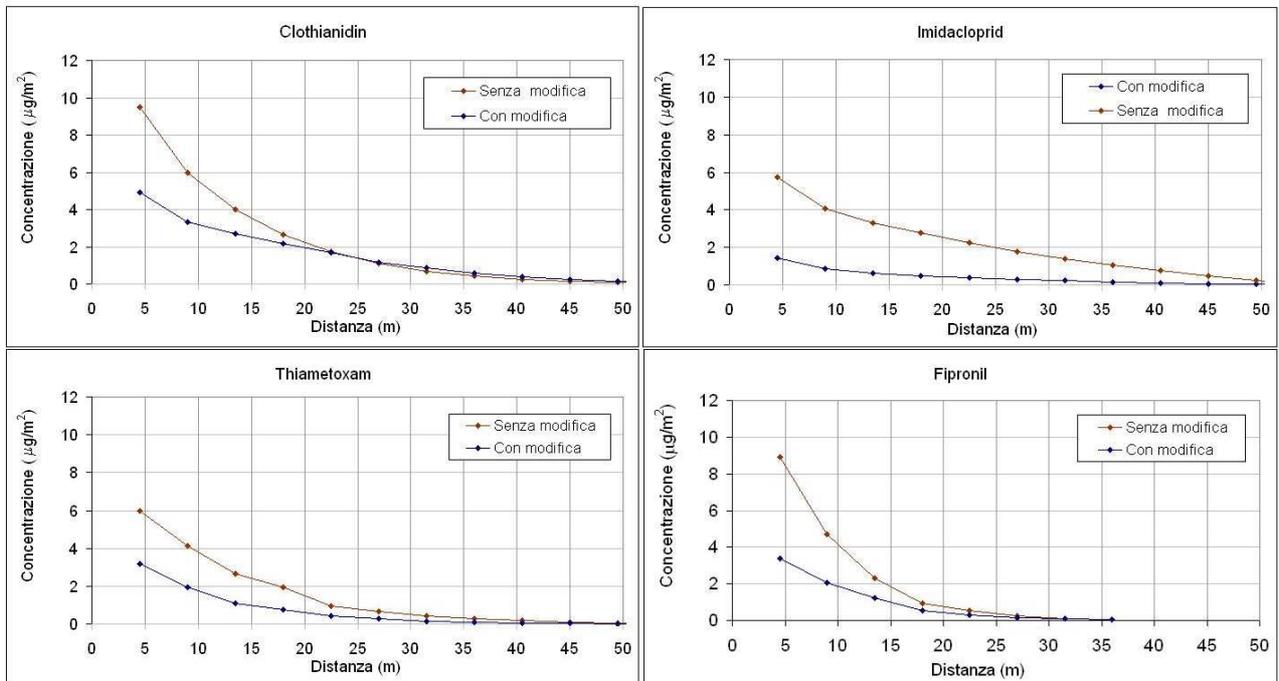
In tutti i casi, l'andamento della concentrazione calcolata risulta chiaramente più regolare di quello visibile in Figura 5 per effetto della sovrapposizione dei vari passaggi. La riduzione della concentrazione in seguito all'impiego della modifica sulla seminatrice è chiara e si mantiene nelle stesse proporzioni indicate in precedenza. Confrontando i valori osservati per ciascun p.a., essi rispecchiano quanto riportato in Tabella 2 relativamente alla dose/semi e alla polverosità: questi due parametri sono maggiori per il clothianidin, seguito dall'imidacloprid e dagli altri due con valori simili; per i valori delle concentrazioni calcolate si ha la stessa graduatoria (Figura 6).

Quanto all'attendibilità dei valori delle concentrazioni previste, essi sono chiaramente dello stesso ordine di grandezza dei valori del 2009, anche se generalmente superiori soprattutto per

imidacloprid ( $5,8 \mu\text{g}/\text{m}^2$  contro  $4,2 \mu\text{g}/\text{m}^2$  nel 2009 a 5 m) e clothianidin ( $9,2 \mu\text{g}/\text{m}^2$  contro  $4,5 \mu\text{g}/\text{m}^2$  a 5 m nel 2009).



**Figura 5** – Risultati delle prove a punto fisso: quantità di principi attivi rilevate all’analisi nelle piastre Petri alle varie distanze dalla seminatrice riferite all’unità di superficie ( $\text{m}^2$ ).



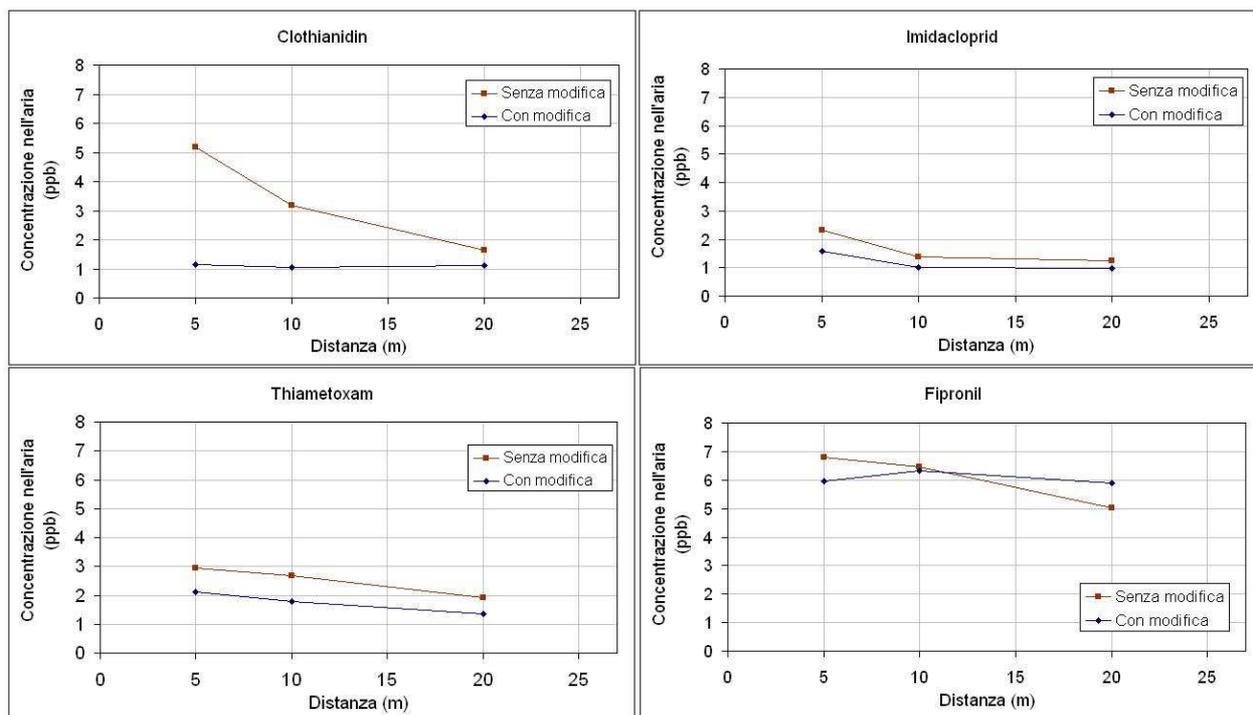
**Figura 6** – Risultati delle prove a punto fisso: previsione della concentrazione a terra in condizioni di campo effettuata in base ai dati riportati in Figura 5 fino ad una distanza teorica di 50 m dal campo di semina. Le curve sono riferite a 8 passaggi della seminatrice (corrispondenti 36 m di larghezza di semina) alla velocità di semina di 6 km/h, con una velocità media del vento di 1,5 m/s al suolo e di 1,85 m/s a 2 m da terra.

A tale proposito, è ragionevole pensare che le concentrazioni osservate in condizioni di campo secondo gli schemi degli anni scorsi, ottenute in condizioni sicuramente meno favorevoli di quelle a punto fisso relativamente a velocità e direzione del vento, possano essere sottostimate, rispetto alla realtà, soprattutto se, nel corso della prova in campo, le condizioni di vento mutano: in tal caso, l'unico lato sottoposto a campionamento può risultare non essere quello maggiormente investito dalla polvere.

La possibilità di controllare e ripetere le condizioni di prova a punto fisso, oltre a consentire una stima attendibile delle concentrazioni a terra, consente sicuramente una più obiettiva valutazione del fenomeno soprattutto dal punto di vista del confronto. E anche da questo punto di vista i risultati ottenuti nel 2009, relativamente ad un abbattimento di circa il 50 % della quantità di principi attivi dispersi sono in linea di massima confermati.

In Figura 7 è infine riportato l'andamento della concentrazione dei principi attivi nell'aria.

In concomitanza con l'impiego della modifica si osserva la riduzione della concentrazione. L'entità di tale riduzione è variabile, risultando molto marcata per il clothianidin (80% a 5 m) e intorno al 30 % per imidacloprid e thiamethoxam. Per il fipronil si ha un andamento variabile. I diversi andamenti osservati potrebbero essere attribuiti a fattori come il diverso contenuto di ciascun p.a. nella polvere e la possibile diversa granulometria delle polveri generate (es.: una diversa interazione fra i quattro p.a. con il trattamento conciante potrebbe favorire la formazione di polvere più o meno sottile che si deposita più o meno in ritardo e più o meno lontano) la quale farebbe variare il comportamento delle polveri soggette a deriva. Si tratta comunque di un aspetto che andrebbe approfondito con uno studio specifico. I valori in Figura 7 sono mediamente 10 volte più elevati delle concentrazioni nell'aria rilevate nelle prove di campo nel 2009 a 5 m e 10 m. In questo caso non è stata effettuata un'elaborazione analoga a quella descritta per le concentrazioni a terra di Figura 6 per risalire alle concentrazioni nell'aria in condizioni di campo, poiché i presupposti sono diversi. Il sistema di prova a punto fisso costituisce, anche sotto questo aspetto, una sorta di amplificatore degli effetti e delle differenze fra macchina modificata e non modificata e come tale risulta utile.



**Figura 7** – Risultati delle prove a punto fisso: andamento delle concentrazioni dei principi attivi nell'aria nella zona di campionamento a diverse distanze dalla zona di semina.

## 2.3 Prove di semina in campo

Lo schema di prova ricalca quello applicato nelle prove effettuate dall'industria nelle proprie prove di campo a sua volta mutuato da una metodologia per lo studio della deriva di fitofarmaci allo stato liquido (*BBA Drift Guideline, Part VII, 2-1.1, 1992, "Measuring direct drift when applying liquid plant protection products outdoors"*). Le modifiche al modello sono dettate da motivi quali la necessità di minimizzare l'influenza di fattori ambientali, di completare le prove nel più breve tempo possibile, nel contenere il numero di analisi da effettuare senza compromettere la significatività dei risultati, in modo da fornire le indicazioni richieste al progetto nei tempi indicati dai Ministeri competenti (MiPAAF, Ministero della Salute)

In seguito alle esperienze effettuate nel 2009, possono essere fatte le seguenti considerazioni:

- Rigidità del sistema di prove in soluzione unica (alveari + piastre Petri) nei confronti delle variabili meteorologiche. Con gli alveari posti attorno alle parcelle di prova, non si possono orientare le stesse e la direzione di semina in base alla direzione del vento e non sempre è possibile rimandare le prove.
- Lo studio della deriva senza alveari si svincola dalla necessità di seminare in periodi e zone significativi per la presenza di fiori, e può essere effettuato teoricamente in qualsiasi momento, purché le condizioni di temperatura siano compatibili con la biologia delle api nelle gabbiette, opportunamente alimentate.
- Tutte le prove sulla deriva della polvere da abrasione sono state eseguite su parcelle di piccole dimensioni (1600 m<sup>2</sup>). Si ritiene che queste non siano sufficienti allo studio degli effetti sulle api (sia in gabbiette sia in colonie), per i quali dovrebbero essere incrementate in modo significativo. Di tale incremento di superficie potrà beneficiare lo stesso studio della deriva (migliore qualità dei dati di concentrazione di p.a. a terra e nell'aria), svolto in condizioni più vicine a quelle reali di semina.

### 2.3.1 Obiettivi

- valutazione del livello di abbattimento delle polveri emesse in presenza di modifiche alle macchine, in condizioni di campo (validazione del sistema di prova a punto fisso);
- determinazione della distribuzione a terra dei p.a. a diverse distanze dal campo di semina;
- determinazione delle quantità di principio attivo captata da api contenute in gabbiette spia posizionate accanto alle piastre Petri e relazione fra questa e concentrazione di p.a. in quel punto;
- individuazione delle corrispondenti concentrazioni di principi attivi nell'aria

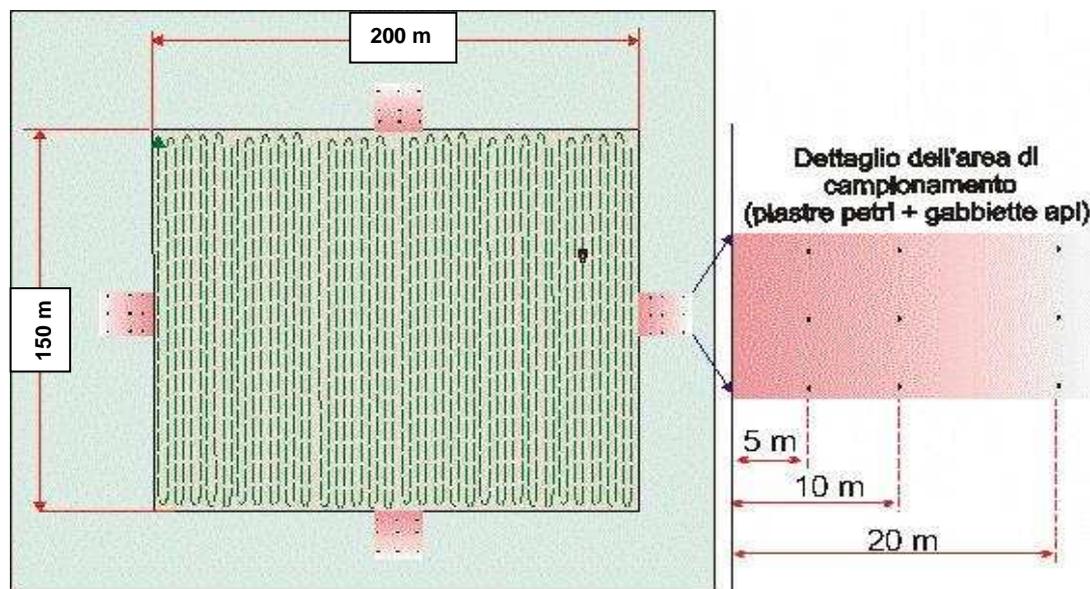
### 2.3.2 Materiali e metodi

Per la seminatrice e il seme si rimanda a quanto già detto per le prove a punto fisso (75 cm tra le file e 18 cm sulla fila: 75000 semi /ha).

La valutazione degli effetti delle modifiche alla seminatrice è stata fatta in prove di campo nelle quali è stata studiata la deposizione di polvere da abrasione (con il relativo contenuto di principio attivo), a livello del terreno, in seguito alla semina di campi di prova. Contemporaneamente si è osservato l'effetto dell'esposizione alle stesse sostanze di api contenute in gabbiette spia.

Poiché l'effetto di deriva è influenzato dalla presenza di vento (velocità e direzione), allo scopo di contenerne gli effetti è stato adottato lo schema riportato in Figura 8, che prevede, per ciascun principio attivo, la semina di un unico campo con superficie di 3-4 ha, che si reputa più significativa delle parcelle delle precedenti esperienze nella determinare la eventuale contaminazione della zona circostante. La zona di campionamento per la determinazione della concentrazione di principi attivi al suolo era rappresentata da una fascia di 20 m che circonda il parcellone. Riguardo invece alla concentrazione nell'aria, disponendo di soli tre campionatori d'aria, essi sono stati posizionati alle stesse distanze delle piastre Petri, sul lato che al momento della prova risultava sottovento. Essi erano regolati su una portata d'aria di 4,5 l/min. Le prove si sono svolte in parte (4 su 8) su terreni

messi a disposizione dal CRA-PCM, limitrofi al CRA-ING di Monterotondo. La coltura di mais su tali appezzamenti è stata portata avanti normalmente dall'azienda del CRA-PCM, che ha provveduto ad effettuare l'irrigazione e le normali cure colturali.



**Figura 8** – Esempio di parcella di prova. La zona di campionamento è estesa a tutti i lati della parcella seminata la cui superficie è estesa allo scopo di osservare livelli di concentrazioni derivanti da semine reali.

Ciascun campo prova aveva una superficie di 3 ha e dimensioni di 200 m di lunghezza per 150 m di larghezza.

La velocità di semina era di 6 km/h. L'acquisizione dei dati e il campionamento iniziavano con l'avvio della semina che richiedeva mediamente 80 min. L'acquisizione proseguiva per ulteriori 20 min dopo la fine della semina per consentire la deposizione/dispersione delle polveri. Durante questo tempo complessivo di circa 100 minuti, i campionatori filtravano mediamente 450 l di aria; il risultante valore di portata d'aria, pari a 4,5 l/min è lo stesso applicato nelle prove del 2009, in cui venivano campionati circa 100 l di aria in un intervallo di tempo intorno a 22 minuti.

Le piastre Petri sono state posizionate su tutti e quattro i lati in numero di tre per ognuna delle tre distanze (5 m, 10 m, 20 m) dal campo di semina. Due ulteriori piastre Petri, contenenti soluzioni note di p.a. e mantenute a distanza di sicurezza dal campo di semina, hanno costituito il controllo. Da ciò è risultato un numero complessivo di 38 piastre Petri. La loro gestione e l'analisi dei campioni sono state a cura del CRA-PAV di Roma, analogamente a quanto indicato per le prove a punto fisso. Nel corso di ogni prova, tenendo conto, delle temperature, della presenza di vento e della notevole durata della prova, si è avuta cura di rabboccare le piastre Petri con la soluzione di acetonitrile, onde evitare che restassero a secco a causa dell'evaporazione.

Per quanto riguarda l'analisi del contenuto delle piastre Petri si rimanda a quanto detto in precedenza per le prove a punto fisso.

Per quanto riguarda le osservazioni sulle api, sono state effettuate posizionando ai quattro lati del cantiere di semina delle gabbiette contenenti api adulte campionate e disposte in campo secondo le seguenti modalità:

- scelta di una colonia in buono stato sanitario e di sviluppo;
- inserimento di 30-40 api coetanee adulte bottinatrici raccolte dai favi del melario per ogni gabbietta;
- posizionamento delle gabbiette nei 4 lati del cantiere di semina alle distanze prefissate di 5-10-20 metri accanto a ciascuna piastra Petri. Per ogni lato sono state posizionate 3 gabbiette ad ogni

distanza (totale 9 gabbiette per lato); le api all'interno di ogni gabbietta, durante l'intero periodo di osservazione, sono state alimentate tramite uno sciroppo zuccherino 1:1 contenuto all'interno di un piccolo nutritore (Figura 9);

- predisposizione di 9 gabbiette di controllo poste in condizioni analoghe a quelle a cui sono state sottoposte le api nel cantiere di semina, ma sufficientemente distanti e protette dal contatto con le polveri della semina;
- circa 20' dopo il termine della semina le gabbiette sono state raccolte e posizionate in un ambiente condizionato con temperatura di 25°C e adeguata umidità relativa;
- la mortalità delle api all'interno delle gabbiette è stata valutata fino a 48 ore dopo la semina; è stata quindi calcolata la percentuale di mortalità e questa è stata sottoposta al test non parametrico di Mann-Whitney e, dopo la trasformazione angolare, all'analisi della varianza, utilizzando il software Statistica<sup>®</sup>.



**Figura 9** – Da sinistra: gabbietta con alimentatore, contenente circa 30 api; gabbietta a terra accanto ad una piastra Petri nel corso di una delle prove di semina; anemometro che rileva direzione e velocità del vento e capsula del campionatore d'aria contenente il filtro.

Dopo le 48 ore di controllo le api sono state poste in congelatore in attesa di essere analizzate per la ricerca delle sostanze attive.

Per ciascuna condizione di prova (macchina con e senza modifica; quattro principi attivi) è stato rilevato l'andamento della deposizione di principio attivo intorno al campo seminato anche in relazione alla velocità e alla direzione del vento. E' possibile contenere gli effetti negativi di queste ultime grazie alla disponibilità dei dati relativi a tutti e quattro i lati del campo di semina, tenendo in particolare considerazione il lato posto sottovento.

Riguardo alla quantità di p.a., la concentrazione a terra è stata espressa in microgrammi di p.a. per metro quadrato di terreno ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ).

L'inizio delle prove era previsto per la metà di marzo. L'andamento meteorologico sfavorevole ha consentito i primi accessi ai campi solo il 18, 19 e 20 aprile. Successivamente, le piogge continue hanno determinato la sospensione dell'attività fino all'8 giugno. La fase di campo è terminata il 16 giugno.

### **2.3.3 Risultati**

#### *Concentrazioni di principi attivi rilevate a terra e nell'aria*

In Tabella 8 sono riportati i valori medi dei principali parametri ambientali rilevati durante le prove di campo. Analogamente al 2009, il vento è risultato il fattore maggiormente variabile, sia per la direzione che per la velocità. In tale contesto si è rivelato utile effettuare il campionamento a terra su tutti i lati dei campi di prova.

**Tabella 8** - Principali dati ambientali medi durante le prove di semina con i 4 p.a. I dati sono stati rilevati dalla centrale meteorologica del CRA-ING integrata con misurazioni anemometrie di campo. Sono tutti e si riferiscono alle condizioni effettive nei campi di prova.

Principio attivo	Modifica (si/no)	Data di semina	Temp. media (°C)	U.R. (%)	Velocità vento (m/s)	Direz. vento	Note
clothianidin	si	19-apr-10	20,8	85	1,4	da N e NO	direz. e vel. abbastanza costanti
	no	20-apr-10	21,7	75	1,6	da N e NNO	direz. e vel. abbastanza costanti
thiamethoxam	no	21-apr-10	21,4	65	2,24	da S e SSE	direz. e vel. abbastanza costanti
	si	07-giu-10	24,3	67	1,03	da S ed E	direz. abbastanza costante, vento scarso
imidacloprid	si	08-giu-10	27,9	63	1,47	da S, SO, NE e NO	Direzione vento estremamente variabile
	no	14-giu-10	29,67	56	2,05	da SSE, S, SSO	direz. e vel. abbastanza costanti
fipronil	no	15-giu-10	25,31	80	2,5	da S e SO	direz. e vel. costanti
	si	16-giu-10	28,4	60	2	da S e SO	direz. e vel. costanti

I risultati delle analisi del contenuto delle piastre Petri, in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , sono riportati nella Tabella 9 in termini di media  $\pm$  errore standard dei valori osservati su ciascun lato e come media generale  $\pm$  errore standard, per ciascuna distanza di campionamento. Le colonne in carattere blu corrispondono ai lati sottovento più esposti a deriva. I risultati sono parziali in quanto alcune analisi sono in corso. La prima osservazione è che non sempre i lati sotto vento hanno ricevuto più principio attivo. Ad es. in entrambe le prove con il clothianidin il lato Nord, sopravvento ha ricevuto le concentrazioni maggiori. Probabilmente, in relazione alle modalità di semina (conformazione del campo, tipo di manovre da eseguire, semina del bordo campo, ecc.) nei casi in cui il vento ha velocità contenuta, è possibile che esso non riesca a disperdere la polvere sollevata in prossimità della zona di campionamento.

Nel caso dell'imidacloprid, l'andamento si è rivelato più rispondente alle attese. Non ritenendo possibile effettuare delle generalizzazioni sulla distribuzione in relazione alla direzione del vento, il quale, presenta una quota di variabilità che sfugge al monitoraggio, si ritiene più utile ragionare sulle medie generali derivanti dalle osservazioni sui quattro lati. I valori riportati in Tabella 9 sono anche stati usati per tracciare i diagrammi relativi a ciascun p.a., per dare una idea immediata dell'andamento delle concentrazioni in relazione all'impiego del deflettore.

I dati al momento disponibili mostrano differenze percentuali, legate all'uso o meno della modifica, analoghe a quelle rilevate nelle prove a punto fisso per gli stessi principi attivi. Tutto ciò conferma quindi le indicazioni avute dalle prove di campo del 2009 e dalle prove a punto fisso sopra descritte, circa l'efficacia delle modifiche basate sui tubi deflettori, in grado di abbattere le quantità di principi attivi dispersi in media del 50% facendo riferimento specifico alla qualità del seme adottato dal punto di vista del trattamento conciante cui esso è stato sottoposto.

**Tabella 9 - Risultati delle prove di campo: valori medi e relativi errori standard delle concentrazioni sui quattro lati, alle tre distanze di semina, e media generale ed errore standard per ogni distanza. I diagrammi mostrano l'andamento delle medie. Le colonne in carattere blu sono relative ai lati sottovento del campo di prova. Nei campi relativi a thiamethoxam e fipronil sono presenti valori medi in carattere rosso: tenendo conto che i risultati di alcune analisi erano inferiori al LOQ (pari a 0,015 e 0,001 µg/piastra rispettivamente per thiamethoxam e fipronil) e non ritenendo corretto eliminarli, allo scopo di calcolare le medie generali, a tali valori è stato attribuito il valore del LOQ stesso.**

direzione vento velocità (m/s)		da NO 1-1,5		clothianidin con modifica						
Distanza da bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Sud (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Est (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Ovest (µg/m <sup>3</sup> )		media generale (µg/m <sup>3</sup> )	
	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.
5	8,979	± 1,828	4,875	± 0,564	6,770	± 0,879	4,384	± 0,672	6,252	± 0,832
10	7,752	± 1,246	5,121	± 0,624	7,313	± 0,215	5,437	± 0,246	6,323	± 0,547
20	4,490	± 0,414	3,788	± 0,438	5,858	± 1,094	4,735	± 0,425	4,718	± 0,416

direzione vento velocità (m/s)		da N e NE 1-1,5		clothianidin senza modifica							
Distanza dal bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Sud (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Est (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Ovest (µg/m <sup>3</sup> )		media generale (µg/m <sup>3</sup> )		differenza con /senza modifica (%)
	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	
5	15,223	± 1,875	9,085	± 3,962	10,558	± 0,843	11,435	± 0,335	11,575	± 1,355	45,98
10	7,050	± 1,264	7,752	± 1,281	10,523	± 1,125	7,226	± 0,702	8,138	± 0,735	22,30
20	8,348	± 1,621	6,068	± 0,371	4,490	± 0,351	6,349	± 0,699	6,314	± 0,658	25,28

direzione vento velocità (m/s)		da N e NO 1-1,5		imidacloprid con modifica						
Distanza da bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Sud (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Est (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Ovest (µg/m <sup>3</sup> )		media generale (µg/m <sup>3</sup> )	
	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.
5	3,367	± 0,530	3,613	± 0,405	3,122	± 0,609	4,525	± 2,648	3,657	± 0,713
10	2,596	± 0,928	2,385	± 0,448	3,788	± 0,701	2,192	± 1,011	2,740	± 0,450
20	1,999	± 0,379	1,894	± 0,182	0,526	± 0,263	1,333	± 1,070	1,438	± 0,355

direzione vento velocità (m/s)		da S e SO 2		imidacloprid senza modifica							
Distanza dal bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Sud (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Est (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Ovest (µg/m <sup>3</sup> )		media generale (µg/m <sup>3</sup> )		differenza con /senza modifica (%)
	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	
5	<b>46,685</b>	± 19,767	5,402	± 0,405	3,788	± 1,918	8,173	± 1,231	16,012	± 7,894	77,16
10	11,961	± 5,025	10,277	± 5,473	3,928	± 0,195	4,262	± 2,001	7,607	± 2,265	63,98
20	4,490	± 1,367	6,489	± 1,984	3,964	± 0,456	1,368	± 1,105	4,078	± 0,918	64,73

direzione vento velocità (m/s)		da S e SW 1		Thiametoxam con modifica						
Distanza da bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Sud (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Est (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Ovest (µg/m <sup>3</sup> )		media generale (µg/m <sup>3</sup> )	
	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.
5	7,541	± 3,593	1,824	± 0,153	1,684	± 0,105	1,613	± 0,035	3,166	± 1,249
10	2,701	± 0,873	1,824	± 0,246	1,578	± 0,000	1,578	± 0,000	1,920	± 0,275
20	3,858	± 1,666	1,578	± 0,000	1,578	± 0,000	1,613	± 0,000	2,157	± 0,534

direzione vento velocità (m/s)		da S e SE 2,4		Thiametoxam senza modifica							
Distanza dal bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Sud (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Est (µg/m <sup>3</sup> )		concentrazione lato Ovest (µg/m <sup>3</sup> )		media generale (µg/m <sup>3</sup> )		differenza con /senza modifica (%)
	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	media	± Err. St.	
5	10,768	± 4,224	5,577	± 1,318	5,016	± 1,703	6,173	± 2,131	6,884	± 1,506	54,01
10	5,472	± 2,137	1,929	± 0,969	1,578	± 0,000	2,385	± 0,153	2,841	± 0,790	32,41
20	3,016	± 0,827	3,087	± 1,508	1,578	± 0,000	1,578	± 0,000	2,315	± 0,495	6,82

direzione vento velocità (m/s)		Fipronil con modifica									
Distanza da bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m³)		concentrazione lato Sud (µg/m³)		concentrazione lato Est (µg/m³)			concentrazione lato Ovest (µg/m³)		media generale (µg/m³)	
	media	± errore standard	media	± errore standard	media	± errore standard		media	± errore standard	media	± errore standard
5	0,105	± 0,000	0,351	± 0,246	0,105	± 0,000	0,544	± 0,167	0,276	± 0,097	
10	0,386	± 0,035	0,140	± 0,035	0,281	± 0,126	0,281	± 0,126	0,272	± 0,055	
20	0,105	± 0,000	0,105	± 0,000	0,140	± 0,000	0,105	± 0,000	0,114	± 0,010	

direzione vento velocità (m/s)		Fipronil senza modifica									
Distanza dal bordo campo (m)	concentrazione lato Nord (µg/m³)		concentrazione lato Sud (µg/m³)		concentrazione lato Est (µg/m³)		concentrazione lato Ovest (µg/m³)		media generale (µg/m³)		differenza con /senza modifica (%)
	media	± errore standard	media	± errore standard	media	± errore standard	media	± errore standard	media	± errore standard	
5	2,140	± 2,034	0,246	± 0,035	0,456	± 0,300	1,789	± 0,895	1,157	± 0,622	84,35
10	0,421	± 0,316	0,316	± 0,105	0,421	± 0,161	0,737	± 0,316	0,474	± 0,132	-
20	0,105	± 0,000	0,105	± 0,000	0,105	± 0,000	0,105	± 0,000	0,105	± 0,000	-

Per quanto riguarda i livelli delle concentrazioni osservate, indipendentemente dal lato, è interessante notare che esse risultano mediamente raddoppiate rispetto ai valori osservati nel 2009 su parcelle di piccole dimensioni (1600 m<sup>2</sup>). Ciò conferma quanto atteso nelle premesse al piano sperimentale del 2010 e cioè che all'aumentare della superficie seminata (3 ha nel 2010), aumenta, anche se in modo meno che proporzionale, l'entità della contaminazione della zona circostante.

Infine, osservando i dati dell'imidacloprid, si può notare, in rosso, il valore apparentemente anomalo di 46,685 µg/m<sup>2</sup>, media di tre valori osservati nelle piastre Petri, due dei quali pari rispettivamente a 71 µg/m<sup>2</sup> e 56 µg/m<sup>2</sup>. Questi ultimi sono stati determinati dalla presenza, nelle relative piastre Petri, di frammenti di polvere visibili ad occhio nudo. Ciò testimonia il fatto che, in assenza di deflettori, anche frammenti di polvere più grossolana si possono disperdere nella zona circostante al campo di semina. Non considerando i due valori "accidentali", la media finale anziché 16,012 µg/m<sup>2</sup>, risulterebbe pari 6,47 µg/m<sup>2</sup> e la riduzione sarebbe pari a 43,48%.

Quanto appena descritto trova una conferma statistica nell'analisi della varianza eseguita sui valori delle concentrazioni rilevate (Tabella 10). Ad eccezione del caso del fipronil, le differenze derivanti dall'impiego o meno della modifica sulla seminatrice sono quasi sempre significative, nonostante la variabilità determinata dal lato del campo che dipende, a sua volta, dall'azione del vento.

I diagrammi di Figura 10 mostrano le concentrazioni di principi attivi nell'aria alle varie distanze. Per l'esiguo numero di dati a disposizione, legato all'organizzazione delle prove e alla possibilità di impiegare solo tre campionatori d'aria, in questo caso non è stato possibile effettuare l'analisi statistica: i diagrammi hanno il solo scopo di mostrare una tendenza. Gli andamenti risultano differenti fra loro probabilmente per effetto delle diverse condizioni ambientali e delle caratteristiche delle polveri: per il clothianidin non si possono trarre indicazioni circa l'effetto del deflettore, mentre per gli altri due, sebbene con andamenti differenti, la riduzione è evidente. È interessante notare come per il fipronil la concentrazione senza modifica aumenta con la distanza.

In relazione ai livelli di concentrazione raggiunti, per il clothianidin essi risultano decisamente più elevati, rispetto agli altri due prodotti, rispecchiando la maggiore polverosità risultante dal test di Heubach e sono dello stesso ordine di grandezza delle prove del 2009. Questo è plausibile e spiegabile con il fatto che la maggiore contaminazione a terra non è necessariamente dovuta ad una maggiore concentrazione nell'aria, ma può anche essere determinata dalla contaminazione di una massa d'aria più grande nella quale la concentrazione, in ppb, può essere la stessa di prove che hanno investito superfici e masse d'aria più ridotte.

E infatti, se si osserva la Tabella 11 nella quale, in luogo delle concentrazioni, sono riportate le quantità di principi attivi trovate nei filtri (µg/filtro), si osserva che nelle prove del 2010 tali quantità sono molto più elevate rispetto al 2009. La spiegazione di ciò risiede nel fatto che come già detto in precedenza, nel 2010 i campionatori d'aria hanno funzionato per un tempo più lungo (100 minuti), legato alla maggiore durata della semina, filtrando un volume di aria di circa 450 l su

campi di 3 ha. Nelle prove 2009 i volumi d'aria campionati erano stati di circa 100 l in un tempo molto più breve per la semina di parcelle di superficie ridotta.

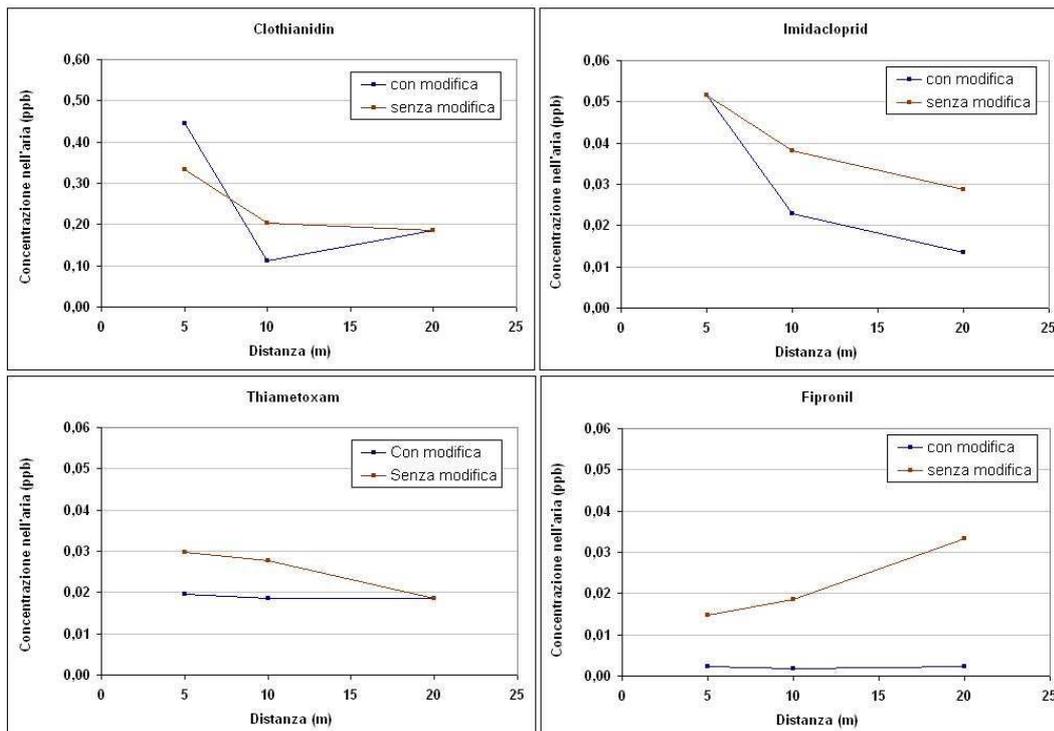
I valori riportati nelle ultime colonne a destra indicano che: 1) nel caso della macchina senza modifica i rapporti fra le concentrazioni rilevate nei due anni di prova a 5 m e a 10 m, rispettivamente di 6,43 e 5,24 sono vicini al valore 4,5 (rapporto fra i volumi 450 l e 100 l) a conferma di quanto detto in precedenza; 2) nel caso della macchina con la modifica, il rapporto a 5 m risulta molto elevato (14,12), mentre a 10m si riduce a 1,88. Ciò è probabilmente dovuto all'effetto del deflettore che, indirizzando verso il basso la polvere, la sottrae in larga parte all'azione del vento, per cui essa resta concentrata in prossimità del campo di semina

Un aspetto interessante collegato a quanto appena detto è la determinazione del tempo di permanenza dei principi attivi nell'aria successivamente alla semina. Anche questo è influenzato da fattori ambientali molto variabili e non controllabili. Un primo approccio in tal senso è stato tentato in occasione della semina con thiamethoxam, posizionando i tre campionatori d'aria a 20 m dal bordo del campo, dopo oltre due ore dalla fine della semina con seminatrice modificata, e campionando aria per ulteriori 100 minuti (450 l). All'analisi dei filtri è risultata in tutti i casi una quantità di principio attivo inferiore al LOQ. Tuttavia tale aspetto meriterebbe di essere approfondito, considerando, oltre alla variabilità ambientale, anche quella legata alle caratteristiche dei diversi principi attivi, che in relazione a polverosità e dosi applicate nella concia, raggiungono in ambiente diversi livelli di concentrazione.

**Tabella 10** - Analisi della varianza delle concentrazioni rilevate a terra nelle prove di campo alle varie distanze e sui quattro lati di ciascun appezzamento (i dati relativi al fipronil sono parziali).

Analisi della varianza - Significatività delle differenze alle varie distanze per i quattro principi attivi													
cause di variazione		5 m				10 m				20 m			
		F calc	F tavole		Ris.	F calc	F tavole		Ris.	F calc	F tavole		Ris.
			p = 0,05	p = 0,01			p = 0,05	p = 0,01			p = 0,05	p = 0,01	
Clothianidin	ripetizioni (3)	2,06	19,39	99,40		0,67	19,39	99,40		0,17	19,39	99,40	
	lato campo (4)	3,83	3,29	5,42		0,81	3,29	5,42		1,28	3,29	5,42	
	Sem M / Sem NM	21,75	4,54	8,68		7,29	4,54	8,68		7,63	4,54	8,68	
	int. Sem / Pos.	0,71	4,10	7,56		3,29	4,10	7,56		5,38	4,10	7,56	
imidacloprid	ripetizioni (3)	1,22	19,39	99,40		0,80	19,39	99,40		0,29	19,39	99,40	
	lato campo (4)	4,49	3,29	5,42		1,01	3,29	5,42		2,73	3,29	5,42	
	Sem M / Sem NM	6,59	4,54	8,68		6,36	4,54	8,68		12,59	4,54	8,68	
	int. Sem / Pos.	6,93	4,10	7,56		2,00	4,10	7,56		2,55	4,10	7,56	
thiametoxam	ripetizioni (3)	2,16	19,39	99,40		0,66	19,39	99,40		4,01	19,39	99,40	
	lato campo (4)	3,69	3,29	5,42		3,40	3,29	5,42		3,07	3,29	5,42	
	Sem M / Sem NM	6,68	4,54	8,68		2,18	4,54	8,68		0,10	4,54	8,68	
	int. Sem / Pos.	0,07	4,10	7,56		1,59	4,10	7,56		1,45	4,10	7,56	
fipronil	ripetizioni (3)	0,76	19,39	99,40		0,57	19,39	99,40		1,0714	19,39	99,40	
	lato campo (4)	0,79	3,29	5,42		0,81	3,29	5,42		1,0714	3,29	5,42	
	Sem M / Sem NM	2,51	4,54	8,68		2,43	4,54	8,68		1,0714	4,54	8,68	
	int. Sem / Pos.	1,10	4,10	7,56		0,72	4,10	7,56		1,6071	4,10	7,56	

Legenda	
	non significativo
	significativo per p=0,05
	significativo per p=0,01



**Figura 10** – Andamento delle concentrazioni dei p.a. nell'aria a 2 m da terra, a varie distanze dal campo di semina in corrispondenza del lato sottovento.

**Tabella 11** - Quantità di clothianidin intercettate dai filtri dei campionatori d'aria nelle prove del 2010 confrontate con quelle del 2009.

Distanza (m)	2009		2010		Rapporto 2010/2009	
	Con modifica	Senza modifica	Con modifica	Senza modifica	Con modifica	Senza modifica
	µg/filtro	µg/filtro	µg/filtro	µg/filtro		
5	0,017	0,028	0,24	0,18	14,12	6,43
10	0,032	0,021	0,06	0,11	1,88	5,24
20	-	-	0,10	0,10	-	-

### Osservazioni sulle api

Poiché durante le semine la velocità del vento è stata relativamente bassa (in media 1,8 m/sec) e la sua direzione spesso variabile, si è deciso di non considerare nelle elaborazioni il fattore orientamento e di trattare complessivamente tutte le gabbiette poste alla stessa distanza dal campo seminato.

Come già affermato al punto 2.3, le parcelle sperimentali di piccole dimensioni non sono adatte allo studio degli effetti tossici di tipo acuto sulle api e la presenza delle gabbiette attorno al campo seminato è servita essenzialmente a determinare la quantità di polveri captata dal corpo delle api poste al suolo a fianco delle piastre Petri (analisi in corso). Per le ragioni precedentemente esposte, e per il fatto che la prova è stata fermata alle 48h (a 72h nelle prove al punto 6.1 si è continuato ad avere mortalità con picchi proprio al 3° giorno con clothianidin, Figura 22), i dati non hanno messo in evidenza mortalità legate ad effetti di tossicità acuta.

Infatti analizzando le mortalità percentuali di tutte le 360 gabbiette impiegate nelle prove (4 pp.aa., due seminatrici, 4 orientamenti, 3 distanze e 3 repliche, oltre alle gabbiette di controllo) si nota come nella maggior parte dei casi non sia stato superato l'1% di mortalità (Tabella 12). Se non si

considerano i casi in cui la mortalità è risultata inferiore all'1%, la maggior parte delle gabbiette ha comunque mostrato una mortalità compresa tra il 2 e 5%.

**Tabella 12** – Numero di gabbiette per ciascuna classe di mortalità, in tutte le prove.

Classe di mortalità	Numero di gabbiette
$\geq 20\%$	1
10,00-19,99%	5
5,00-9,99%	9
2,00-4,99%	77
1,00-1,99%	9
$< 1,00\%$	259

Tuttavia, considerando complessivamente i 4 principi attivi e i due tipi di macchina (con e senza modifica) e confrontando la percentuale di mortalità a 48 ore nelle gabbiette poste alle diverse distanze con quella del controllo, si sono evidenziate differenze statisticamente significative (Tabella 13). In particolare, a 5 metri in 13 casi la media delle gabbiette è risultata significativamente maggiore rispetto al controllo, mentre in 6 casi è avvenuto il contrario; questa differenza si annulla alle distanze superiori. Se ne deduce che all'aumentare della distanza dal campo seminato, la differenza tra le gabbiette trattate e di controllo si attenua. Pertanto le successive elaborazioni hanno preso in considerazione solo le gabbiette poste a 5 metri.

**Tabella 13** – Numero di casi in cui la media delle repliche poste alle diverse distanze mostra una percentuale di mortalità significativamente maggiore o minore rispetto a quelle di controllo, complessivamente per tutti i 4 principi attivi e le due macchine seminatrici. ANOVA seguita dal test HSD Tukey, su dati sottoposti a trasformazione angolare.

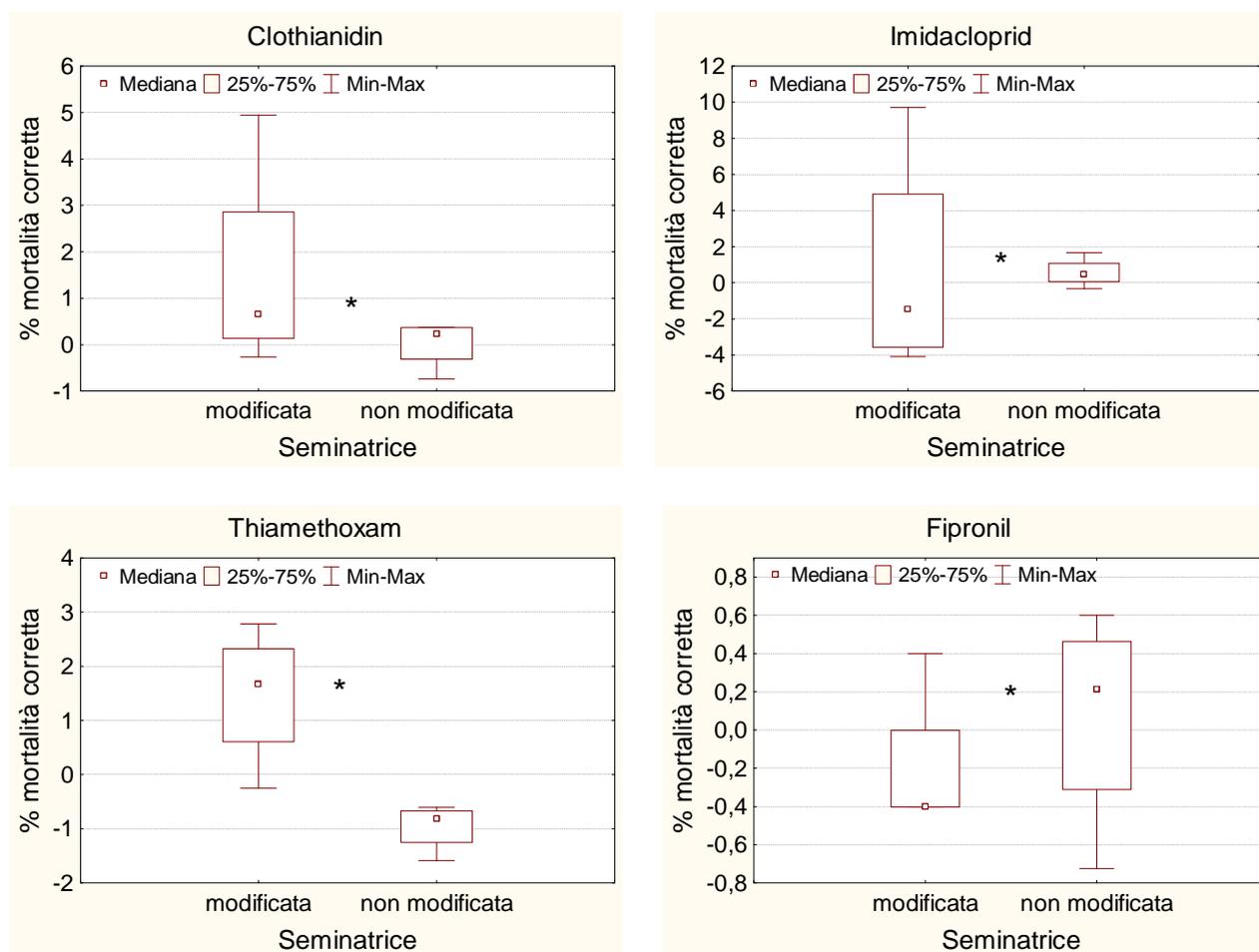
Confronto statistico	Distanza dal campo		
	5 m	10 m	20 m
trattato > controllo	13	11	12
trattato < controllo	6	8	11
No differenza significativa tratt. vs contr.	13	13	9

**Tabella 14** – Percentuale di mortalità delle api nelle gabbiette poste a 5 metri dal campo seminato, a confronto con quelle di controllo. I valori significativi di p sono indicati in rosso. Test *t* di Student su dati sottoposti a trasformazione angolare.

Principio attivo	Seminatrice	% mortalità		
		5 m	controllo	test <i>t</i>
Clothianidin	modificata	1,41	0,26	$p < 0,05$
	non modificata	0,75	0,73	n.s.
Imidacloprid	modificata	4,40	3,93	n.s.
	non modificata	0,87	0,33	$p < 0,05$
Thiamethoxam	modificata	1,74	0,25	$p < 0,05$
	non modificata	0,63	1,56	$p < 0,05$
Fipronil	modificata	0,26	0,40	n.s.
	non modificata	0,82	0,72	n.s.

In Tabella 14 vengono poste a confronto, separatamente per ciascun principio attivo e tipo di macchina seminatrice, le percentuali di mortalità rilevate (sempre a 48 ore) nelle gabbiette poste a 5 metri dal campo e in quelle di controllo. Dalla tabella appare evidente che in 3 casi la mortalità è significativamente maggiore nel trattato rispetto al controllo, mentre in un solo caso si verifica la situazione inversa.

Infine, dal confronto della mortalità delle api corretta con la formula di Shneider-Orelli<sup>1</sup> durante la semina con i due tipi di seminatrice (modificata e non) non si evince un andamento generalizzabile (Figura 11); infatti per due principi attivi (clothianidin e thiamethoxam) la mortalità è risultata maggiore con la seminatrice modificata, mentre il risultato opposto si è ottenuto per gli altri due principi attivi (imidacloprid e fipronil).



**Figura 11** - Percentuale di mortalità corretta con la formula Shneider-Orelli rilevata nelle gabbiette poste a 5 m dal campo e messa a confronto tra i due tipi di macchina seminatrice. Test U Mann-Whitney (p=0,05).

Queste osservazioni lasciano comunque irrisolte le problematiche legate agli effetti dei dosaggi sub-letali che i principi attivi in questione hanno già dimostrato di possedere nei confronti degli insetti non target come le api, effetti non valutabili attraverso questa tipologia di prove (si veda Capitolo 6).

<sup>1</sup> %mortalità corretta =  $[(\% \text{ mortalità trattato} - \% \text{ mortalità controllo}) / (100 - \% \text{ mortalità controllo})] * 100$ .

## **2.4 Rilievo dei residui di principi attivi nel terreno e nelle piante di mais nei diversi stadi fenologici**

L'attività 2010 prevede anche il secondo anno di sperimentazione per la valutazione dei residui di imidacloprid nel terreno e nei tessuti delle piante di mais. A tale scopo sono state destinate 3 parcelle di 1000 m<sup>2</sup>. Onde eliminare la variabilità dovuta alla diversa interazione fra il p.a. e il metabolismo dei differenti ibridi utilizzati nei due anni, è stato utilizzato lo stesso seme nel 2009, con seminatrice modificata (semina effettuata dal CRA-ING).

La sperimentazione prevede la valutazione della persistenza dell'imidacloprid nel terreno durante lo sviluppo della coltura. Si seguirà inoltre la traslocazione della sostanza attiva nei tessuti della piantana diversi stadi fenologici, in particolare verrà campionato il polline all'emergenza del pennacchio per verificare l'eventuale presenza dell'imidacloprid.

Attività prevista:

- caratterizzazione del terreno (granulometria, tessitura, pH, ecc.);
- quantificazione della presenza di p.a. all'interno del campo seminato;
- rilevazioni meteorologiche e climatiche;
- campionamento di terreno e di piante di mais conciato e testimone a diversi stadi fenologici della coltura, in triplo per ogni parcella;
- analisi delle piante campionate (il numero di campioni deve essere sufficiente a consentire l'analisi dei diversi tessuti: radici, stelo foglie, polline, granella) per verificare la presenza del prodotto ed eventualmente dei suoi metaboliti.
- determinazione del peso fresco e secco della pianta;

La sperimentazione è tutt'ora in corso. Le piantine di mais sono allo stadio iniziale di sviluppo anche in seguito al ritardo delle semina legato a fattori meteorologici e sono oggetto di campionamento periodico in attesa di essere analizzate.

## **2.5 Conclusioni**

La dispersione dei principi attivi è risultata dipendere da vari fattori. Il primo è il trattamento conciante. Se la qualità della concia è buona si hanno emissioni di polveri (e di p.a.) limitate. Con specifico riferimento alle seminatrici convenzionali (senza modifica), le prove descritte negli anni scorsi da vari produttori di queste sostanze, nelle quali è stato utilizzato seme trattato secondo processi meno recenti ed efficienti di quelli attuali, i valori delle concentrazioni erano molto più elevati (circa 10 volte) di quelli riscontrati nelle prove più recenti in ambito APENET. Da questo punto di vista i risultati del 2009 sono sostanzialmente confermati da quelli del 2010: a parità di polverosità del seme (test di Heubach), le concentrazioni ottenute nelle prove a punto fisso (previsione, Figura 6) e in campo (su superficie più estesa, Tabella 8), sebbene superiori di oltre due volte, sono dello stesso ordine di grandezza di quelle dello scorso anno, sia per la seminatrice convenzionale sia per quella con modifica.

Il secondo fattore è rappresentato dall'impiego della modifica (deflettore). Diverso per dimensioni e conformazione da quello utilizzato nel 2009, il deflettore utilizzato nel 2010 è basato su un principio simile e ha fornito risultati in linea con quanto osservato nel 2009, sia nelle prove a punto fisso che in quelle di campo, con una sensibile riduzione delle concentrazioni rispetto alla macchina convenzionale. Osservando i diagrammi dei risultati, sia a punto fisso (Figg. 5 e 6) che in campo (Tabella 8), tale riduzione può essere sinteticamente quantificata, per i quattro principi attivi, dal valore 50%.

Attualmente sono allo studio soluzioni maggiormente efficienti nell'abbattimento delle quantità di polveri da abrasione disperse. In prospettiva, si ritiene che l'obiettivo da raggiungere dovrebbe essere l'annullamento della dispersione di polveri da abrasione durante l'utilizzo delle seminatrici. Ciò è possibile trattenendole in qualche modo all'interno della seminatrice stessa, rinviando lo smaltimento ad una fase successiva alla semina, secondo procedure analoghe a quelle seguite per

tutti i residui di pesticidi. In tal modo, il problema delle polveri viene spostato da una situazione scarsamente controllabile (il campo con tutte le variabili operative e ambientali più volte sottolineate) ad una in cui la possibilità di controllo è massima (una zona circoscritta del centro aziendale), ovviamente osservando tutte le precauzioni a tutela della salute dell'operatore.

Il terzo fattore è rappresentato dai fattori meteorologici ed ambientali. Essi non sono controllabili e di conseguenza risulta difficile ottenere condizioni di prova perfettamente confrontabili. Si ritiene che l'esecuzione dei campionamenti su tutti i lati del campo di prova contribuisca ad aggirare tali difficoltà e sicuramente fornisce una migliore descrizione del fenomeno relativamente sia alla singola prova, che al confronto fra macchina modificata e convenzionale. Tuttavia, il confronto resta comunque condizionato dall'elevata variabilità ambientale testimoniata anche dall'analisi statistica dei risultati delle prove di campo (Tabella 9). Da questo punto di vista, il sistema a punto fisso, proposto allo scopo di normalizzare le condizioni di prova, è in grado di fornire indicazioni sicuramente più attendibili. Esso ha confermato le indicazioni delle prove di campo relativamente all'entità dell'abbattimento in termini percentuali.

Il metodo proposto per la previsione delle concentrazioni in campo da dati ottenuti in prove simulate, dopo ulteriori verifiche, messe a punto e validazioni, potrebbe consentire di evitare la fase di campo, rendendo le operazioni di valutazione di una macchina o di una modifica molto più pratiche, e veloci. In tal senso, nell'eventualità dell'introduzione generalizzata, sulle seminatrici pneumatiche, di dispositivi atti a ridurre la dispersione delle polveri, risulterà necessario predisporre un sistema di prova in grado di "certificarne" le prestazioni. Una tale attività potrà essere convenientemente condotta utilizzando un sistema analogo a quello descritto nella presente relazione. A tale riguardo, si ricorda che il CRA-ING è incaricato delle "prove di certificazione ENAMA delle prestazioni e delle caratteristiche di sicurezza delle macchine per la semina e il trapianto".

Tutte le prove sono state finora effettuate utilizzando seme normalmente conciato con i principi attivi oggetto di studio. Nel caso in cui l'attività di prova (di campo o a punto fisso) divenga sistematica, sarà di fondamentale importanza che le prove vengano condotte utilizzando seme che provenga dal normale processo di concia avendo però cura di sostituire ciascun principio attivo con sostanza avente caratteristiche ad esso comparabili dal punto di vista del comportamento (produzione di polvere, caratteristiche analitiche), ma totalmente innocua.

Nelle prove di campo su appezzamenti di 3 ha sono state rilevate concentrazioni, nelle zone di campionamento, mediamente doppie rispetto a quelle osservate nelle prove del 2009 su parcelle di 1600 m<sup>2</sup>. Questo conferma quanto si era ipotizzato nelle premesse all'attività del 2010 e cioè che l'estensione della superficie seminata influenza il livello di contaminazione delle zone limitrofe, per cui, per avere dati attendibili su questo ultimo, occorre avvicinarsi a condizioni operative reali.

Per altro, nelle suddette parcelle di 1600 m<sup>2</sup>, a causa delle caratteristiche della seminatrice a disposizione, si era adottata una densità di semina molto elevata: se si fosse adottata la normale densità di semina (75.000 semi/ha) la superficie corrispondente alla quantità di seme distribuito sarebbe stata di circa 2700 m<sup>2</sup>. Quindi, per un incremento della superficie seminata compreso fra 12 volte (rapporto fra 30.000 m<sup>2</sup> e 2700 m<sup>2</sup>) e 19 volte (rapporto fra 30.000 m<sup>2</sup> e 1600 m<sup>2</sup>) si è osservato un raddoppio delle concentrazioni a terra. Sulla base di questi dati è ragionevole pensare che l'ulteriore incremento della superficie seminata possa determinare un aumento delle concentrazioni di principi attivi nelle zone circostanti. Tuttavia, in assenza di ulteriori esperienze, non si ritiene possibile dare una stima attendibile dell'entità del fenomeno.

Parallelamente a quanto appena detto, si sviluppa il discorso delle osservazioni sulle api, le quali a parte alcune eccezioni, non hanno sostanzialmente risentito - a livello di effetti di tipo acuto - dell'esposizione alle concentrazioni rilevate accanto a ciascuna gabbietta, sebbene raddoppiate rispetto allo scorso anno. Tuttavia, poiché, come detto in precedenza, all'aumentare della superficie seminata si osserva un incremento (anche se meno che proporzionale) delle concentrazioni, non si hanno elementi per dire cosa si verificherebbe a carico delle api nel caso di una semina estesa ad un'area di dimensioni rilevanti, caso frequente nelle zone tipicamente maidicole. Ulteriori

esperienze in merito a questo punto sarebbero opportune e potrebbero fornire indicazioni importanti, tenendo conto del fatto che si proviene da due anni di sospensione dei principi attivi, nei quali si è osservata una sostanziale diminuzione delle segnalazioni di problemi a carico delle api in zone maidicole (Tabella 1). Resta in ogni caso aperto il discorso sugli effetti delle dosi sub-letali, non valutabili nelle gabbiette, che saranno oggetto del capitolo 6.

In conclusione, il trattamento conciante e la modifica alla seminatrice sono elementi fondamentali nell'abbattimento della deriva dei principi attivi. Si deve comunque rilevare che, nonostante tali mezzi ed accorgimenti, si rileva ugualmente una certa dispersione ambientale delle polveri insetticide concianti.

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

#### **3.1 Premessa**

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

Prove preliminari con api chiuse all'interno di gabbie di tulle e direttamente esposte alle polveri emesse dalla seminatrice, avevano dimostrato un effetto tossico di questo tipo di esposizione; 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 una sperimentazione in cui le api vengono addestrate a visitare un alimentatore e nel percorso tra questo e l'alveare si trova un campo seminato a mais.

Sono state condotte diverse sperimentazioni nel 2009 e nel 2010. La maggior parte di questi dati sono in corso di pubblicazione e si riportano pertanto solo i risultati relativi a due prove effettuate nella primavera-estate del 2010.

#### **3.2 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.

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 (Pioneer Hi-Bred Italy-Johnston, IA). Sono state effettuate due semine, una il 21/04/2010 utilizzando semi conciatori con fipronil e l'altra il 30/06/2010 con thiamethoxam.

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 stati 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 nella prova con fipronil (5 intervalli orari) e 72 api in quella con thiamethoxam.

Ciascuna prova è durata in tutto 60 minuti. In entrambe le prove, ad un ora dalla fine della semina, sono state contate le api morte davanti agli alveari e attorno all'alimentatore, e sono stati inoltre prelevati campioni di api per l'analisi chimica.

### 3.3 Risultati

La mortalità delle api catturate ai diversi intervalli di tempo dalla semina a mantenute in condizioni di umidità diverse in laboratorio sono riportate in Tabella 15 per la prova con fipronil e in Tabella 16 per quella con thiamethoxam.

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.

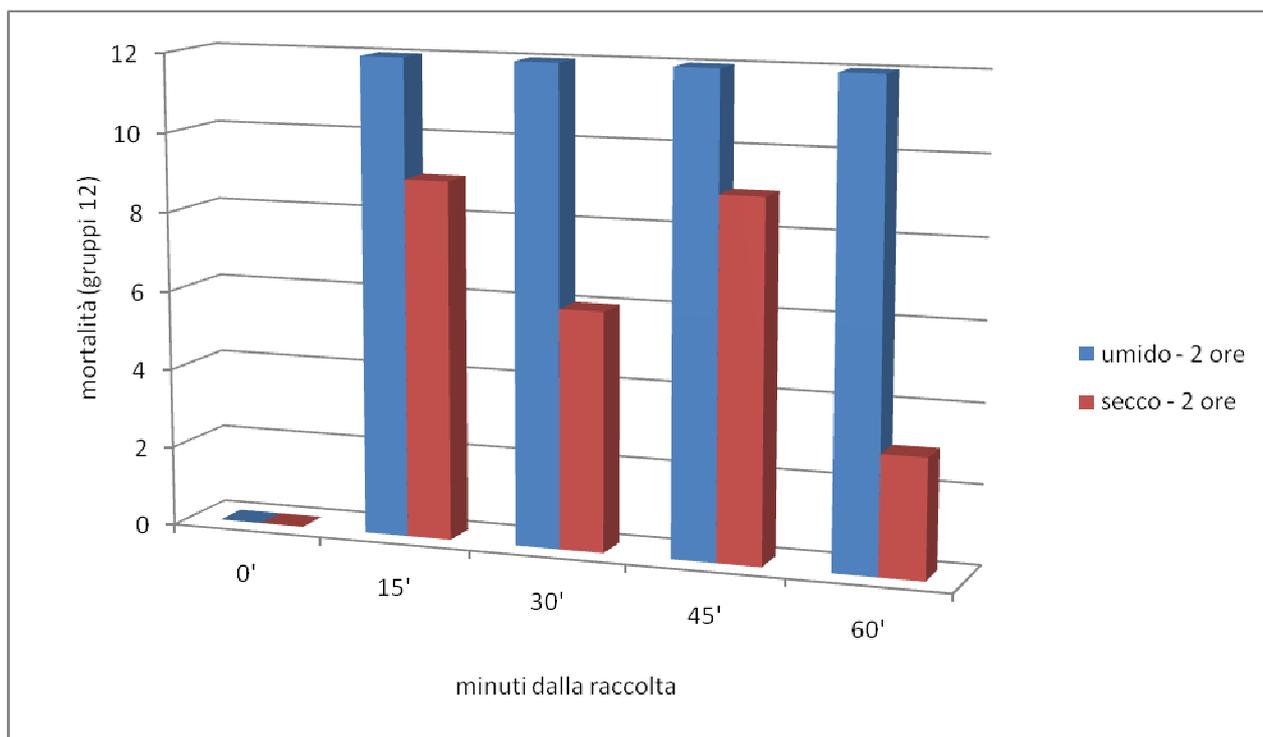
I risultati di mortalità a due ore per le api catturate durante la semina con fipronil sono anche rappresentati nel grafico di Figura 12. Già nel breve periodo è visibile la sinergia tra esposizione alle polveri ed elevata umidità, mentre nelle api catturate all'inizio della semina non si osserva alcuna mortalità.

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 15** - 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 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 16** - Mortalità delle api bottinatrici catturate in campo presso l'alimentatore dopo aver sorvolato la macchina seminatrice durante la semina di mais conciato con thiamethoxam.



**Figura 12** - Mortalità delle api che hanno sorvolato la seminatrice durante la semina di mais conciato con fipronil, a 2 ore dalla cattura presso l'alimentatore.

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..

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. Ciò è avvenuto in particolare quando le prove sono state effettuate in giornate di alta umidità relativa dell'aria. 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.

### 3.4 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. 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 è l'effetto dell'umidità sulla mortalità delle api; 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. Emergerebbe quindi che quantità anche di 500 ng/ape, non sarebbero necessariamente letali in condizioni di bassa U.R.

Lo scenario sarebbe quindi il seguente: quando le api incontrano la seminatrice, nel tentativo di evitarla 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 risulta 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 potrebbero a loro volta essere contaminate dalle polveri.

L'elevata tossicità della polvere emessa dalla seminatrice, rispetto a quella degli stessi principi attivi in formulazione spray, necessita di una spiegazione legata non solo alle variazioni di umidità. Se infatti si prende in considerazione la quantità di p.a. nei frammenti di polvere raccolti all'uscita della seminatrice, emerge che questa costituisce il 20% in peso del particolato. L'impiego dei neonicotinoidi in formulazione spray nei fruttiferi prevede una diluizione di p.a. in acqua per il clothianidin, attorno ai 75 ppm (Dantop® 50% clothianidin, impiegato a 15 g/hl) ovvero una concentrazione che rispetto al 20% è di almeno 2.600 volte minore. A questa elevatissima concentrazione di p.a. nelle polveri, si aggiunge la conformazione del tegumento delle api, atto a raccogliere polline e quindi ad impolverarsi. Si noti inoltre che anche la quantità di p.a. sul seme (1,25 mg di p.a. per seme dal peso di 0,3 g) è superiore a 3500 ppm, il che rappresenta di per sé un problema ecologico direttamente correlato al fenomeno delle guttazioni (Girolami *et al.* 2009).

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. Probabilmente è per questo motivo che anche in altri paesi (ad es. la Germania) le morie sono state riscontrate in aree frammiste (Nikolakis *et al.* 2009), mentre in presenza di monocultura, 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.

I risultati di questa sperimentazione contribuiscono pertanto a far luce sul problema della mortalità delle api, limitatamente alle zone investite a mais e nel periodo delle semine intercorrente tra marzo e metà maggio, in particolare in periodi di alta umidità.

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

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

La sperimentazione, effettuata 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 sotto studio, utilizzati contro insetti terricoli e fitomizi in genere (imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam e fipronil).

I dati definitivi della campagna 2010 saranno disponibili solo a fine autunno, al termine del ciclo produttivo della coltura, e pertanto non potranno entrare a far parte della presente relazione; verranno presentati solamente i primi risultati delle prove on-farm 2010 effettuate da veneto Agricoltura. Si riportano invece i risultati relativi alle prove agronomiche 2009, che, per gli stessi motivi, non erano stati presentati nella relazione dello scorso settembre 2009.

#### 4.1.1 Materiali

Per la sperimentazione 2009 erano stati utilizzati, come concordato nell'ambito del Progetto APENET, materiali forniti dall'Associazione Italiana Sementi-ASSOSEMENTI, preparati partendo da un lotto di semente omogenea di un 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.

#### 4.1.2 Schema sperimentale

Le 5 tesi sotto studio 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 mq nelle quali le tesi sono state seminate ad una densità di 7 piante/m<sup>2</sup>.

*Prove agronomiche* – Nel 2009 le prove agronomiche sono state allestite e raccolte in 17 località distribuite per lo più nelle regioni a vocazione maidicola (Lombardia, Piemonte Veneto, Emilia Romagna) e Toscana (Tabella 17). Nel 2010 le località erano 20, distribuite nelle regioni Lombardia, Piemonte Veneto, Emilia Romagna e Toscana. I risultati saranno disponibili a fine autunno 2010.

*Valutazioni agronomiche* - Nell'ambito di ciascuna prova agronomica, per ciascuna delle 5 tesi sotto studio, sono stati effettuati rilievi e valutazioni agronomiche standard 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 (%)

**Tabella 17** - Elenco delle 20 località nelle quali sono state allestite le prove agronomiche Apenet 2009.

<b>Regione</b>	<b>Località</b>	<b>data semina</b>	<b>data raccolta</b>
Lombardia	Bergamo	07/04/2009	18/09/2009
	S.Angelo Lodigiano (LO)	15/04/2009	28/09/2009
	Luignano (CR)	12/05/2009	28/09/2009
	Caleppio di Settala (MI)	9/05/2009	29/09/2009
	Castenedolo (BS)	24/04/2009	23/09/2009
	Pudiano (BS)	25/04/2009	24/09/2009
Piemonte	Vigone (TO)	15/04/2009	2/10/2009
	Chivasso (TO)	10/04/2009	28/09/2009
	Castelceriolo (AL)	07/05/2009	7/10/2009
	Cigliano (VC)	8/04/2009	24/09/2009
Veneto	Castelnovo Bariano (RO)	14/04/2009	2/09/2009
	Villadose (RO)	12/05/2009	12/09/2009
Emilia Romagna	Ambrogio (FE)	17/04/2009	10/09/2009
	Fognano (PR)	17/04/2009	24/09/2009
Friuli	Mortegliano (UD)	08/04/2009	11/09/2009
	Palazzolo della Stella (UD)	06/05/2009	9/10/2009
Toscana	Marciano della Chiana (AR)	12/05/2009	26/10/2009

#### 4.1.3 Risultati prove agronomiche 2009

A seguito della diffusione dell'infestazione da Diabrotica che ha interessato nel corso della campagna maidicola 2009 le coltivazioni di mais in diverse parti d'Italia, CRA-MAC ha svolto sopralluoghi nella suddetta Rete di Sperimentazione agronomica-varietale per raccogliere informazioni, al fine di accertare un eventuale nesso fra la mancata concia delle sementi con neonicotinoidi e l'attacco da Diabrotica.

L'esito dei sopralluoghi effettuati in tutte le 17 prove agronomiche 2009, è riportato in Tabella 18.

**Tabella 18** - Sopralluoghi per valutare l'attacco di Diabrotica nell'ambito delle prove agronomiche 2009.

<b>Regione</b>	<b>Località</b>	<b>data sopralluogo</b>	<b>Note distintive tra le tesi</b>	<b>% piante allettate</b>	<b>% spighe poco fecondate</b>
Lombardia	Bergamo	17/07/2009	nessuna	0	0
	S.Angelo Lodigiano (LO)	28/07/2009	nessuna	0	0
	Luignano (CR)	29/07/2009	nessuna	0	0
	Caleppio di Settala (MI)	28/08/2009	nessuna	0	0
	Castenedolo (BS)	20/07/2009	nessuna	0	0
	Pudiano (BS)	22/07/2009	nessuna	0	0
Piemonte	Vigone (TO)	23/07/2009	nessuna	0	0
	Chivasso (TO)	23/07/2009	nessuna	0	0
	Castelceriolo (AL)	30/07/2009	nessuna	0	0
	Cigliano (VC)	30/07/2009	nessuna	0	0
Veneto	Castelnovo Bariano (RO)	31/07/2009	nessuna	0	0
	Villadose (RO)	10/08/2009	nessuna	0	0
Emilia Romagna	Ambrogio (FE)	08/09/2009	nessuna	0	0
	Fognano (PR)	06/08/2009	nessuna	0	0
Friuli	Mortegliano (UD)	05/08/2009	nessuna	0	0
	Palazzolo della Stella (UD)	05/08/2009	nessuna	0	0
Toscana	Marciano della Chiana (AR)	11/09/2009	nessuna	0	0

Le informazioni raccolte, tramite rilievi sulla prova, non hanno evidenziato, in nessuna località e in nessuna delle 5 tesi sotto studio, i tipici attacchi da Diabrotica quali, ad esempio, piante allettate con portamento a “collo d’oca” (danno radicale dovuto alle larve) o spighe poco fecondate (danno dovuto ad adulti che hanno compromesso l’impollinazione della spiga, causa distruzione sete); in nessun caso, infatti, sono emerse note distintive tra le 5 tesi sotto studio.

La presenza di insetti adulti ha comportato segni visibili di attacco sulle sete (sete “a spazzola”), ma tale fenomeno non appare significativo sullo sviluppo della spiga. L’eventuale danno radicale ascrivibile alle larve non è stato misurato direttamente, in quanto le piante non presentavano allettamento. Le 5 tesi oggetto di studio non hanno dimostrato evidenti differenze per danni.

I risultati medi relativi ai parametri agronomici sopraindicati, rilevati per le 5 tesi sotto studio nelle prove agronomiche 2009, sono riportati in Tabella 19. L’analisi statistica per il confronto delle 5 tesi sotto studio, condotta tramite analisi della varianza, ha indicato che le medie relative ai parametri rilevati non differiscono in modo significativo.

**Tabella 19** - Dati medi dei parametri agronomici rilevati nelle 17 prove agronomiche 2009.

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	135,41	22,3	75	268	119	4,44	0,06
2 - Cruiser	thiamethoxam	132,45	22,1	75	269	121	3,80	0,08
3 - Gaucho	imidacloprid	133,73	22,1	75	267	121	5,25	0,19
4 - Poncho	clothianidin	136,67	22,1	75	271	121	5,28	0,06
5 - Regent	fipronil	133,79	22,3	75	268	123	4,19	0,06

#### 4.2 Monitoraggio degli insetti ipogei 2009

In alcune delle località ove sono state allestite le prove agronomiche, sono state elaborate mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei del mais (Elateridi), grazie alla collaborazione con il DiSTA dell’Università di Bologna, il DIVAPRA dell’Università di Torino e il Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali-Entomologia dell’Università di Padova.

I dati ottenuti nella campagna maidicola 2009 indicano variabilità tra le località, per quanto riguarda le catture di adulti (*Agriotes brevis*, *Agriotes sordidus*, *Agriotes litigiosus*) (Tabella 20).

**Tabella 20** - Dati relativi al monitoraggio di elateridi in 5 prove agronomiche Apenet 2009.

Regione	Località	Cattura adulti (totale/trappola per sito)			Cattura larve
		<i>Agriotes brevis</i>	<i>Agriotes sordidus</i>	<i>Agriotes litigiosus</i>	
Lombardia	Bergamo	54,5	1,5	0	0
Piemonte	Vigone (TO)	n.d.	512,5	524	n.d.
Veneto	Castelnovo Bariano (RO)	0	137	21	n.d.
	Villadose (RO)	120	1613	116	n.d.
Toscana	Marciano della Chiana (AR)	0	0,5	451	n.d.

n.d.: non determinato

I valori medi relativi alla produzione delle 5 tesi sotto studio, nelle prove agronomiche ove è stato effettuato il monitoraggio di Elateridi, sono riportati in Tabella 21. Non si osserva nessuna differenza statisticamente significativa tra le tesi sotto studio, all'interno di ciascuna prova sperimentale.

**Tabella 21** - Dati relativi alla produzione (q/ha-15.5% U.R.) nelle 5 prove agronomiche 2009 ove è stato effettuato il monitoraggio degli elateridi.

Regione	Località	Produzione (q/ha-15,5%U.R.)				
		1 - Testimone	2 - Cruiser thiamethoxam	3 - Gaucho imidacloprid	4 - Poncho clothianidin	5 - Regent fipronil
Lombardia	Bergamo	153,20	157,03	155,08	155,88	162,50
Piemonte	Vigone (TO)	168,45	170,55	171,03	173,80	172,10
Veneto	Castelnovo Bariano (RO)	152,83	153,70	146,48	146,13	151,05
	Villadose (RO)	100,85	100,55	104,23	100,68	102,38
Toscana	Marciano della Chiana (AR)	122,39	112,83	118,76	99,36	120,63

### 4.3 Sperimentazioni on-farm e monitoraggio degli insetti ipogei 2010

Nell'ambito della campagna maidicola 2010, le Regioni Lombardia, Piemonte e Veneto (Veneto Agricoltura) hanno programmato una sperimentazione in raccordo con il Progetto Apenet, volta a valutare gli effetti sulla produzione finale di granella dell'uso di un insetticida neonicotinoide applicato alle sementi di mais. In particolare è stato utilizzato seme ibrido PR32G44 trattato con CELEST (fungicida), a confronto con seme ibrido PR32G44 trattato con Celest (fungicida) e Poncho (principio attivo insetticida Clothianidin); le due tesi sono state inserite "side by side" in unità sperimentali (parcelloni) disposte all'interno degli schemi di semina dei campi della rete varietale "On Farm".

La sperimentazione a cura di Veneto Agricoltura ha riguardato i seguenti settori:

#### A) MONITORAGGIO FITOFAGI IPOGEI

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

#### B) VALUTAZIONE CONCIANTI

strip-test utilizzando stesso seme (G44 fornito da Pioneer) conciato con i diversi prodotti disponibili reso disponibile.

#### 4.3.1 Materiali e metodi

A1) i rilievi sono stati condotti su oltre 50 appezzamenti monitorati nel 2009 mantenendo non trattate con geoinsetticidi completamente le superfici oppure, ove possibile, eseguendo delle strisciate di confronto trattato – non trattato con microgranulare Force o il seme conciato Poncho; per oltre il 50% degli appezzamenti si è proceduto sia al campionamento della popolazione larvale con classificazione di tutti gli esemplari raccolti, sia al rilievo di investimenti e attacchi; negli altri appezzamenti almeno uno dei due elementi è disponibile.

A2) Sono state individuate oltre 50 stazioni in buona parte coincidenti con i siti 2009 per avere anche dati sulla evoluzione nel tempo delle popolazioni di elateridi; sono stati raccolti e sono in fase di classificazione gli adulti delle principali specie di elateridi (*Agriotes brevis*, *A. sordidus*, *A. litigiosus*, *A. ustulatus*) nonché di *Diabrotica virgifera virgifera*.

B) Sono stati realizzati, seguendo pari tecniche colturali aziendali di tipo convenzionale (aratura):

Confronto 4 concianti vs solo fungicida: 8 campi sperimentali (7 in Veneto, province VE, TV, RO, 1 in Lombardia, prov. BG) con parcelloni larghi 3 o 4,5 m e lunghezza superiore almeno ai 100 metri e 4 ripetizioni;

Confronto Poncho vs solo fungicida vs Force 12 kg/ha: sono stati realizzati 4 campi con le stesse caratteristiche sopra descritte.

#### **4.3.2 Risultati**

A1) Per quanto concerne quanto si è potuto rilevare fino ad oggi (catture larve con trappole, attacchi sulla coltura di mais, investimenti del mais) i risultati confermano quanto emerso nell'ultimo decennio di sperimentazioni sull'argomento (Furlan *et al.*, 2007, 2009), incluso il primo anno di sperimentazione Apenet:

- 1) l'attacco grave (in grado di influire sulla produzione) di fitofagi ipogei su mais è evento raro; inferiore all'1% della superficie seminata; 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); nessun danno radicale da diabrotica è stato evidenziato negli appezzamenti in monosuccessione di mais allo studio;
- 2) vi è una chiara correlazione tra specie di adulti catturate con le trappole a feromoni e popolazioni di larve e successivo attacco nonché tra fattori di rischio (particolarmente tipo di precessione colturale) e livello di popolazioni di adulti e larve;
- 3) modesta o trascurabile in tutti i campi osservati è risultata l'incidenza di altri fitofagi ipogei (scarabeidi, nottue,.....) ed epigei (afidi, ...) nelle prime fasi di sviluppo; l'incidenza di piante con anomalie di sviluppo (eventualmente attribuibile a virosi trasmesse da insetti) è stata molto bassa o assente in tutte le prove;
- 4) la popolazione di diabrotica è stata significativa solo nella prova dell'appezzamento in monosuccessione in Lombardia senza tuttavia differenze significative sui sintomi come l'allettamento e le ginocchiate delle piante.

A2) I livelli delle catture a parità di località e caratteristiche agronomiche sono in linea con i risultati del 2009;

B) Non vi sono differenze apprezzabili negli investimenti ed attacchi nella maggior parte dei casi tra parcelle trattate con soli fungicidi e i diversi concianti; un attacco apprezzabile (10 – 20 % piante attaccate) si è registrato in uno dei due campi a popolazione significativa di elateridi (*Agriotes sordidus* Illiger). Tali campi sono stati individuati con un oneroso processo di monitoraggio, per avere nell'ambito dei campi prova una incidenza di quelli con popolazioni in grado di causare danno visibile apprezzabile, superiore alle incidenze medie ordinarie cosicché il campione risultasse cautelativo. In ogni caso, in tutte le parcelle in prova, compresa quest'ultima segnalata, sono stati ottenuti investimenti finali ottimali.

I risultati definitivi delle sperimentazioni on-farm saranno disponibili a fine autunno 2010.

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

##### 4.4.1 Materiali

Per quanto riguarda lo studio della persistenza dei principi attivi usati per la concia a vari stadi di sviluppo della pianta di mais, nell'ambito della campagna maidicola 2009, 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, per le prove agronomiche 2009, ibrido commerciale di Mais (PR31N27- FAO 700) secondo le 5 tesi riportate al punto 4.1.1.

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.

##### 4.4.2 Metodi

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.

##### 4.4.3 Risultati

I risultati, riportati in Tabella 22, indicano una drastica riduzione dei quattro principi attivi insetticidi sotto studio nelle foglie a partire dallo stadio di 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.

**Tabella 22** - Persistenza del principio attivo conciante a vari stadi di sviluppo della pianta di mais.

<b>Codice del campione</b>	<b>Principio attivo insetticida</b>	<b>Tessuti fogliari/ stadio fenologico</b>	<b>Contenuto di principio attivo</b>
R_500_1-testimone	nessuno	2 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> foglia	n.d.
R_500_1-testimone	nessuno	7 <sup>a</sup> -8 <sup>a</sup> foglia	n.d.
R_500_1-testimone	nessuno	13 <sup>a</sup> -14 <sup>a</sup> foglia	n.d.
R_500_2	thiamethoxam	2 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> foglia	130 ± 13 µg/kg
R_500_2	thiamethoxam	7 <sup>a</sup> -8 <sup>a</sup> foglia	27 ± 2,7 µg/kg
R_500_2	thiamethoxam	13 <sup>a</sup> -14 <sup>a</sup> foglia	n.d.
R_500_3	imidacloprid	2 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> foglia	499 ± 49,9 µg/kg
R_500_3	imidacloprid	7 <sup>a</sup> -8 <sup>a</sup> foglia	23 ± 2,3 µg/kg
R_500_3	imidacloprid	13 <sup>a</sup> -14 <sup>a</sup> foglia	n.d.
R_500_4	clothianidin	2 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> foglia	809 ± 80,9 µg/kg
R_500_4	clothianidin	7 <sup>a</sup> -8 <sup>a</sup> foglia	62 ± 6,2 µg/kg
R_500_4	clothianidin	13 <sup>a</sup> -14 <sup>a</sup> foglia	n.d.
R_500_5	fipronil	2 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> foglia	19 ± 1,9 µg/kg
R_500_5	fipronil	7 <sup>a</sup> -8 <sup>a</sup> foglia	11 ± 1,1 µg/kg
R_500_5	fipronil	13 <sup>a</sup> -14 <sup>a</sup> foglia	n.d.

n.d.: not detected, lower than L.O.D. (< 0.5 µg/kg)

## 5. Effetti della guttazione del mais sulle api

Le scarse conoscenze sui fattori che incidono sulla presenza dei neonicotinoidi nelle guttazioni del mais, la cui concentrazione può variare nell'ordine di decine di volte senza un'apparente spiegazione, esigono un approccio che tenga conto che diversi fattori possono interagire in maniera sinergica o contrastante.

Tenuto conto che nelle precedenti sperimentazioni (2009) si è evidenziato che la semina su comune terreno agrario non comporta per sé differenze nella composizione delle guttazioni rispetto al vaso, nel 2010 si sono condotti studi su come le concentrazioni di p.a. nelle guttazioni di piante coltivate in serra e in pieno campo, potessero venire influenzate da diversi fattori quali: 1) diversa permanenza del seme e/o delle plantule a differenti regimi di irrigazione; 2) protezione dagli agenti atmosferici delle plantule; 3) ora del giorno di raccolta; 4) diversa tipologia di terreno.

### 5.1 Neonicotinoidi nelle guttazioni fogliari delle piante di mais coltivate in campo e provenienti da semi conciatati con thiamethoxam, clothianidin ed imidacloprid

Nel mese di aprile del 2010, in un'area situata nell'azienda sperimentale della Facoltà di Agraria dell'Università di Padova sita in Legnaro (PD), sono state seminate 8 file della lunghezza ciascuna di 80 m, utilizzando per le prime 4 file seme conciato del 2009 e nelle restanti 4 file seme del 2010. Ogni annata prevedeva seme conciato con i 3 neonicotinoidi, con l'aggiunta del seme conciato con solo fungicida (Celest XL). I sestri di semina sono stati quelli standard impiegati nella maiscoltura padana (75 cm tra le file e 19 cm sulla fila).

1. Una prima serie di campionamenti ha previsto tre tipi di prelievo:
  - per ogni fila sono state effettuate delle raccolte multiple di goccioline di guttazione da circa 40 piante tra le 7:30 e le 8:30, stoccate in una singola fiala per fila (per principio attivo di analoga concia);
  - per ogni fila, tranne le due contenenti solo Celest, sono state effettuate nuove raccolte multiple da circa 40 piante su un'ulteriore zona del campo tra le 10:00 e le 11:00 dello stesso giorno, anche queste poste in una fiala diversa per ogni principio attivo e concia differenti;
  - per ogni fila seminata con sementi, concia 2010, sono state scelte 4 piante non precedentemente interessate da prelievi, da ciascuna delle quali sono stati raccolti 10  $\mu$ L da una singola goccia di guttazione, posti ognuno in una fiala separata (in data 30 aprile 2010 ore 8:00).
2. Sono stati prelevati altri campioni (successivi alla data cui il punto 1), in date diverse.
3. Sono stati prelevati campioni da piante trattate con clothianidin e imidacloprid, su parte della stessa fila, ma riparata dalle intemperie mediante lastra di plexiglass posta ad un'altezza di 50 cm dal suolo.

L'emergenza delle plantule è avvenuta con regolarità ed in maniera omogenea il 29 aprile; la prima serie di gocce di cui al punto 1) è stata campionata il giorno successivo (30 aprile 2010). I campionamenti di cui al punto 2, a causa della frequente piovosità del periodo, sono stati effettuati nei giorni 7, 14, 17, 18 e 21 maggio ad orari variabili e sempre su circa 40 piante per tutti i tipi di concia tranne quelle contenenti solo Celest XL. I campionamenti di cui al punto 3 sono stati effettuati nei giorni 6 e 14 maggio e riguardavano gocce di guttazione fogliare prelevate da piante conciate con solo clothianidin concia 2010 e imidacloprid concia 2010. Le analisi dei campioni di guttazioni raccolte nello stesso giorno e analizzati presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Padova sono riportati nelle Tabelle 23 e 24 e rappresentate mediante i grafici di Figura 13 e 14.

**Tabella 23** - Concentrazioni di diversi p.a. nei campioni di guttazione fogliare raccolti da circa 40 piante il 30 aprile 2010.

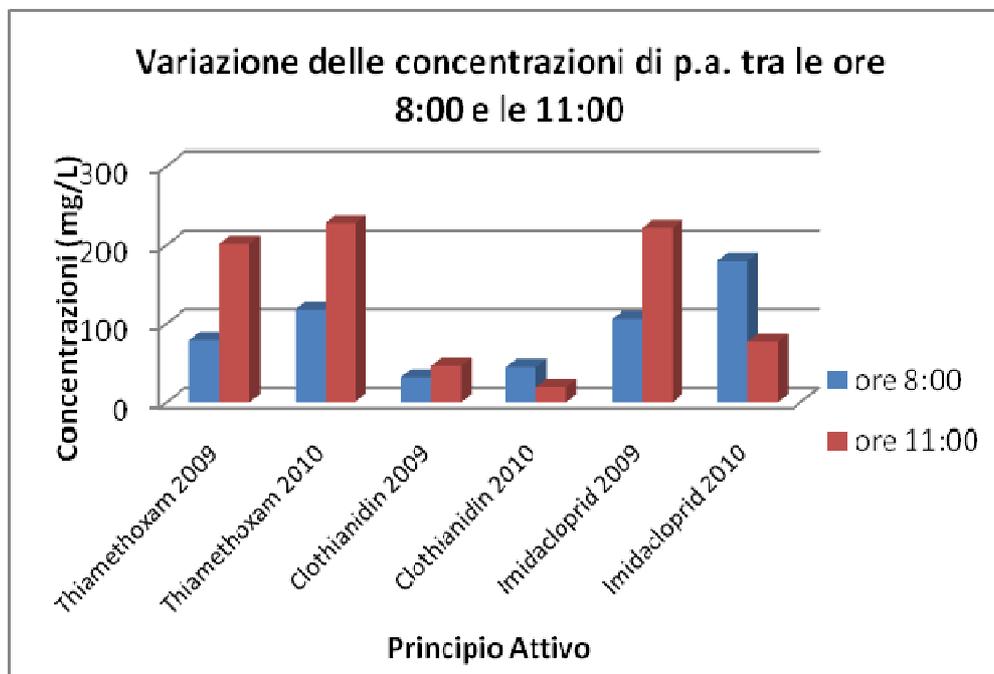
Ora di Campionamento	Thiamethoxam 2009 (mg/L)	Thiamethoxam 2010 (mg/L)	Clothianidin 2009 (mg/L)	Clothianidin 2010 (mg/L)	Imidacloprid 2009 (mg/L)	Imidacloprid 2010 (mg/L)
8:00	79,1	117,3	31,9	44,7	105,7	179,8
11:00	201,3	227,3	46,3	19,2	221,7	76,9

**Tabella 24** - Concentrazioni di principi attivi riscontrate nei campioni raccogliendo una singola goccia da 4 piante diverse, concia 2010, raccolta del 30/04/10, ore 8:00.

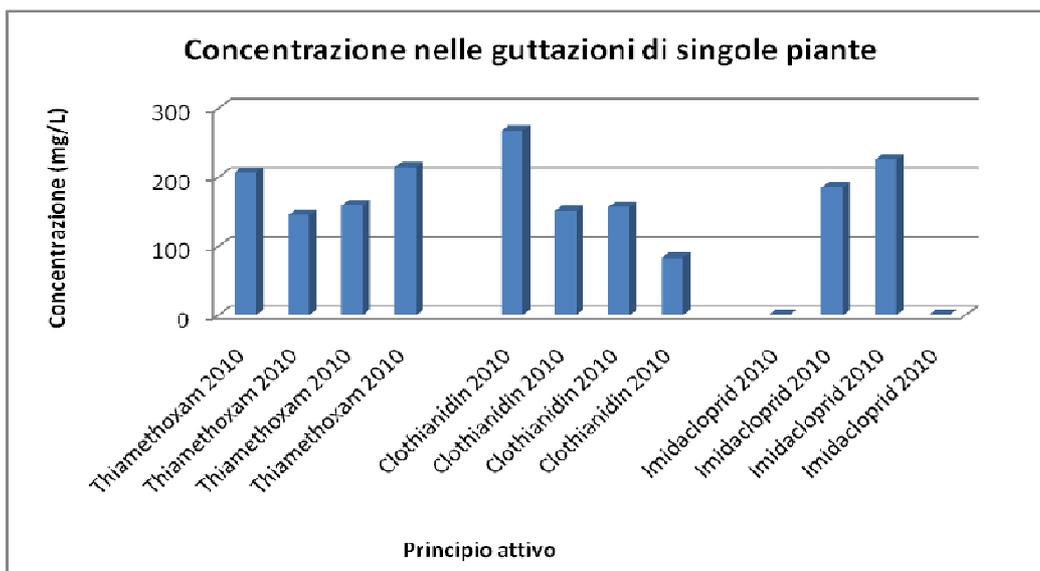
Pianta	Principio attivo (mg/L)		
	Thiamethoxam*	Clothianidin	Imidacloprid
1	206,6	267,6	nr**
2	145,1	150,7	185,280
3	158,9	156,4	225,480
4	214,3	82,9	nr**

\*Nei campioni contenenti Thiamethoxam si è notata la presenza di Clothianidin presente in concentrazioni variabili tra 10 e 16 mg/L.

\*\*Non rivelato.



**Figura 13** - Variazione delle concentrazioni dei p.a. in esame tra le ore 8.00 e le ore 11.00.



**Figura 14** - Distribuzione delle concentrazioni nella guttazione prelevata da singole piante.

Dai risultati ottenuti per le guttazioni “multiple” alle ore 8:00 (Tabella 23) si può notare un comportamento analogo per le due annate di conce: l’imidacloprid si disperde in maniera maggiore nelle piante attraverso il flusso linfatico rispetto al thiamethoxam che a sua volta si distribuisce meglio del clothianidin. Questo andamento risulta sommariamente concorde con la idrofilicità di questi principi attivi (il clothianidin è il più idrofobico) essendo la linfa un mezzo fondamentalmente acquoso.

Per quanto riguarda le guttazioni prelevate alle ore 11:00 si osserva un comportamento simile per le conce 2009 e 2010 ad eccezione del thiamethoxam la cui concentrazione raddoppia rispetto a quella rilevata alle ore 8:00. Gli altri due principi attivi mostrano un comportamento opposto, ossia un calo di circa il 50% per le conce 2010 e un aumento dal 30 al 100% per le conce 2009.

Poiché tra i due tipi di concia non si nota una sostanziale differenza fisica, al momento attuale è difficile dare un’interpretazione a questi risultati poiché l’andamento atteso, un aumento nelle concentrazioni dovuto all’evaporazione della parte acquosa causata dal maggior irraggiamento solare passando dalle ore 8 alle 11, è riscontrabile solo nelle guttazioni delle piante da semi con la concia 2009.

Per quanto riguarda le analisi di singola goccia (Tabella 24) non è possibile trarre conclusioni poiché i risultati sono stati molto variabili tra pianta e pianta e in particolare nel caso del clothianidin estremamente diversi se confrontati con quelli delle guttazioni “multiple”. Non si può escludere che la variabilità sia dovuta ad una banale caduta della goccia prima della raccolta e che quindi non vi sia stata evaporazione. Sotto questo profilo, le sperimentazioni in campo presentano notevoli difficoltà.

Per quanto riguarda i campioni di guttazione raccolti in pieno campo in date diverse, i valori sono riportati in Tabella 25 e i risultati evidenziano come subito dopo l’emergenza i valori siano elevati mentre successivamente, probabilmente a causa delle importanti e continue precipitazioni (che non hanno permesso la raccolta per una settimana), si sia evidenziato andamento decrescente nelle concentrazioni dei principi attivi col passare dei giorni.

Confrontando infine le concentrazioni di clothianidin e imidacloprid presenti nelle piante poste sotto alla copertura in plexiglass con quelle di analoghe piante (con gli stessi principi attivi) poste in campo aperto (Tabella 26) si osserva una presenza maggiore di principio attivo in quelle protette dalla pioggia, dovuta probabilmente sia ad un minor dilavamento del principio attivo, sia alla maggior concentrazione delle gocce di guttazione per il diverso microclima presente.

**Tabella 25** - Variazione della concentrazione dei principi attivi nelle gocce di guttazione nel tempo.

Giorno	Thiamethoxam 2009 (mg/L)	Thiamethoxam 2010 (mg/L)	Clothianidin 2009 (mg/L)	Clothianidin 2010 (mg/L)	Imidacloprid 2009 (mg/L)	Imidacloprid 2010 (mg/L)
30 aprile	140,2	172,3	39,1	31,9	163,7	128,4
7 maggio	1,3	2,4	1,3	1,0	2,2	1,0
14 maggio	0,3	0,4	2,4	1,0	0,8	0,8
17 maggio	0,1	0,2	0,8	1,1	0,4	0,5
18 maggio	0,2	0,3	1,2	0,8	0,6	0,4
21 maggio	0,1	0,1	0,7	0,6	0,4	0,2

**Tabella 26** - Concentrazione di due diversi principi attivi al variare delle condizioni ambientali.

Giorno	Situazione piante	Clothianidin 2010 (mg/L)	Imidacloprid 2010 (mg/L)
14 maggio	Campo aperto	1,021	0,825
14 maggio	Sotto copertura	2,376	1,172

## 5.2 Concentrazione di insetticida nelle gocce di guttazione provenienti da piante seminate e cresciute in tunnel a diversi regimi idrici

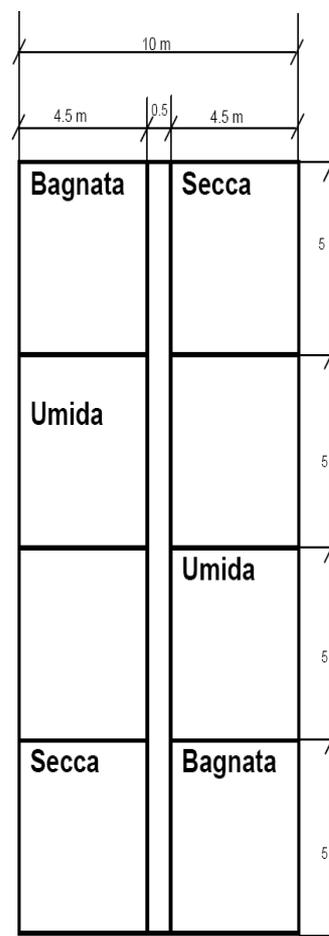
Al fine di verificare l'effetto di diversi apporti idrici sulla concentrazione di p.a. nelle guttazioni, si è seminato il mais in tunnel (per escludere le piogge), su terreno agrario. Il tunnel è stato diviso in 8 parcelle (4,5 x 4 m); in ogni parcella è stato seminato mais conciato con i 3 neonicotinoidi ed il fipronil e sono stati apportati diversi quantitativi d'acqua: 50 litri/22,5 m<sup>2</sup> (secco), 1.100 litri/22,5 m<sup>2</sup> (umido) e 2.500 bagnato litri/22,5 m<sup>2</sup> irrorando nelle tre giornate successive alla semina sino a raggiungere i volumi sopra indicati. Le distanze di semina sono state: nel lato sx, 60 x 20 cm e nel lato dx del tunnel 30 x 20 cm, questo per verificare se la diversa densità delle piantine emerse comportasse una diversa concentrazione di insetticidi nelle guttazioni.

Sono stati raccolti campioni di guttazione dal giorno dell'emergenza sino al ventisettesimo giorno dall'emergenza delle piante.

Sono stati analizzati prima i campioni provenienti da piante seminate con interfila di 60 cm, per i tre regimi di irrigazione per ciascuno dei 4 p.a. e per ciascun giorno di raccolta. Successivamente sono stati analizzati i corrispondenti campioni provenienti dalla semina con interfila di 30 cm.

Le analisi dei campioni di guttazioni raccolte sono stati analizzati presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Padova.

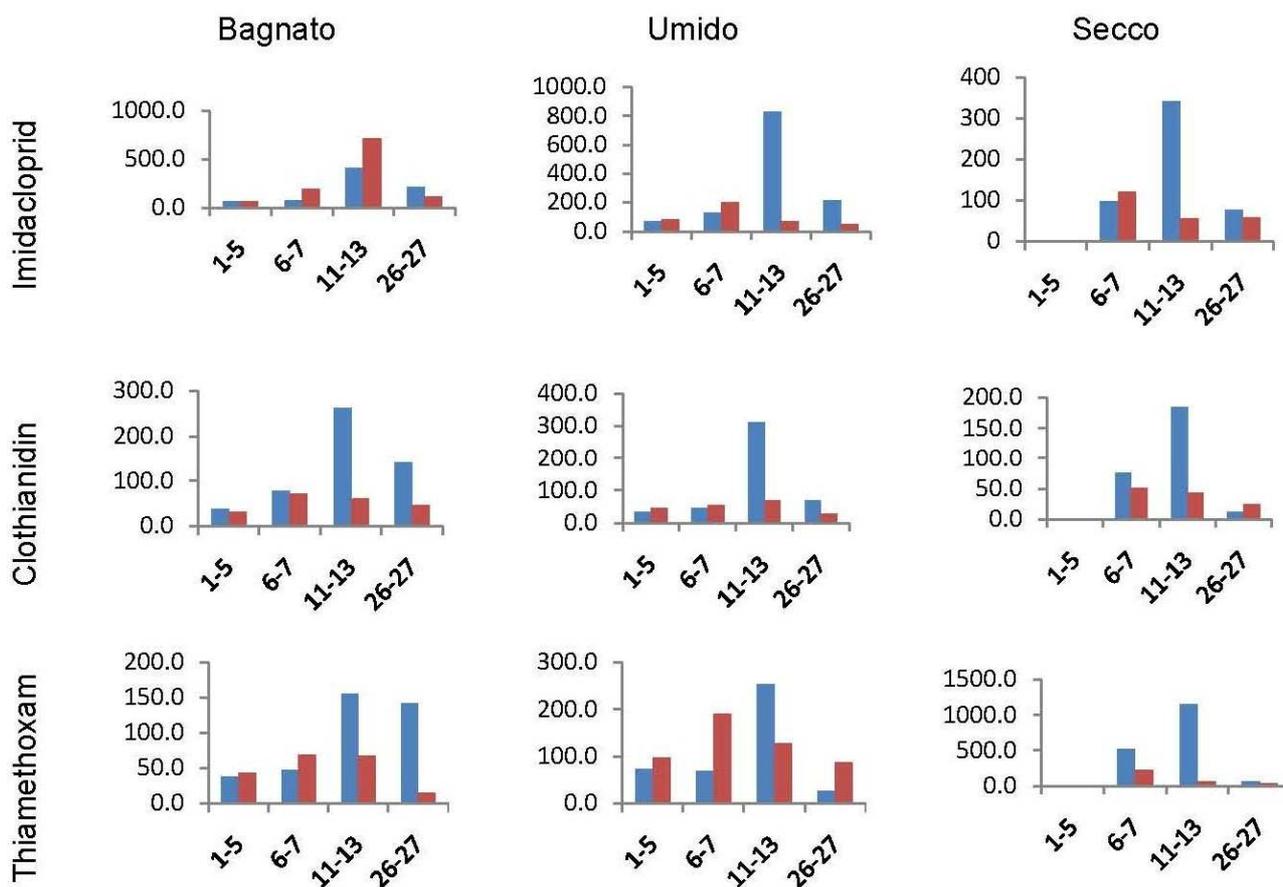
Per quasi tutte le serie di campioni si osserva una maggiore concentrazione nelle gocce di guttazione prelevate nei giorni undicesimo e tredicesimo dall'emergenza. Queste concentrazioni sono notevolmente più elevate di quanto in precedenza osservato nelle guttazioni da piante seminate in vaso, stranamente le piante da interfila 30 cm mostrano picchi di concentrazione quasi sempre inferiori rispetto a quelle con interfila 60 cm. I risultati sono riportati in Tabella 27 e Figura 15.



**Tabella 27** - Contenuto di neonicotinoidi nelle gocce di guttazione provenienti da piante soggette a diversi regimi idrici.

		Guttazione mg/L							
		Imidacloprid		Clothianidin		Thiamethoxam		Fipronil	
		30 cm	60 cm	30 cm	60 cm	30 cm	60 cm	30 cm	60 cm
Bagnato	02/11/09	66.74	61.9	31.37	36.78	42.97	38.076	0	0
Umido	02/11/09	80.40	66.8	44.43	35.04	97.44	71.967	0	0
Bagnato	04/11/09	196.52	78.3	71.11	77.2	68.59	47.17	0	0
Umido	04/11/09	199.1	130.5	55.72	45.62	190.41	68.03	0	0
Secco	04/11/09	121.1	97.1	50.37	75.56	219.88	520.59	0	0
Bagnato	08-10/11	716.73	412.77	60.3	261.5	67.5	155.0	0	0
Umido	08-10/11	70.91	828.0	68.2	310.4	128.1	253.0	0	0
Secco	08-10/11	54.65	340.1	42.2	185.2	56.6	1153.5	0	0
Bagnato	23-24/11	109.2	213.2	45.7	140.9	14.1	141.7	0	0
Umido	23-24/11	46.5	214.1	28.4	69.1	86.1	26.9	0	0
Secco	23-24/11	57.2	76.1	24.5	11.6	33.9	68.1	0	0

Si conferma pertanto che il regime idrico condiziona l'effettiva produzione di guttazioni e la concentrazione di insetticida in esse contenuto. In regime secco le guttazioni tardano ad apparire. Con una maggiore piovosità si osserva un effetto di dilavamento del p.a. più consistente per quanto riguarda il thiamethoxam, che è il composto più solubile in acqua tra quelli considerati. Questo è infatti maggiormente concentrato, anche rispetto ad altri composti, nelle piante cresciute in regime secco. In regime umido/bagnato, la concentrazione di p.a. sembra quindi ben accordarsi con la polarità del composto. In base ai dati di tossicità acuta (Girolami *et al.* 2009) tali concentrazioni risultano comunque sempre letali per le api.



**Figura 15** - Andamento della concentrazione dal 1° al 27° giorno dall'emergenza.  
 Ordinate: mg/L p.a.; Ascisse: giorni dall'emergenza  
 Azzurro: semina interfila 60 cm; Rosso: semina interfila 30 cm

### 5.3 Concentrazione di insetticida nelle gocce di guttazione provenienti da piante seminate e cresciute su terreni a tessitura diversa

Al fine di studiare il fenomeno della presenza dei neonicotinoidi nelle gocce di guttazione delle piantine di mais e della loro diversa concentrazione al variare del tipo di terreno, è stato programmato il seguente esperimento: per ognuno dei tre diversi appezzamenti utilizzati, aventi caratteristiche differenti, sono state seminate 4 file di mais rispettivamente conciate con Celest (fila 1, come controllo) Celest e Clothianidin (fila 2), Celest e Imidacloprid (fila 3) e Celest e Thiamethoxam (fila 4).

I tre diversi appezzamenti avevano le seguenti caratteristiche:

- terreno sabbioso e ricco in scheletro molto drenante (“Campo S”);
- terreno a medio impasto (“Campo M”);
- terreno argilloso ricco di sostanza organica e poco drenante (“Campo N”);

Le semine sono state effettuate il 30/04/2010 per il “Campo S” ed il “Campo M” e il 21/05/2010 per il “Campo N”. La completa emergenza delle piantine di mais si è verificata dopo 11 giorni (11/05/2010) per i campi “S” ed “M” e dopo 8 giorni (29/05/2010) per il “Campo N”.

I campionamenti delle gocce di guttazione sono stati effettuati da più piante sulla stessa fila come riportato in Tabella 28.

I risultati delle analisi sono riportati nelle Tabelle 28 e 29 e nelle Figure 16, 17 e 18, divisi per tipologia di terreno, e nelle Figure 19, 20 e 21 divisi per principio attivo.

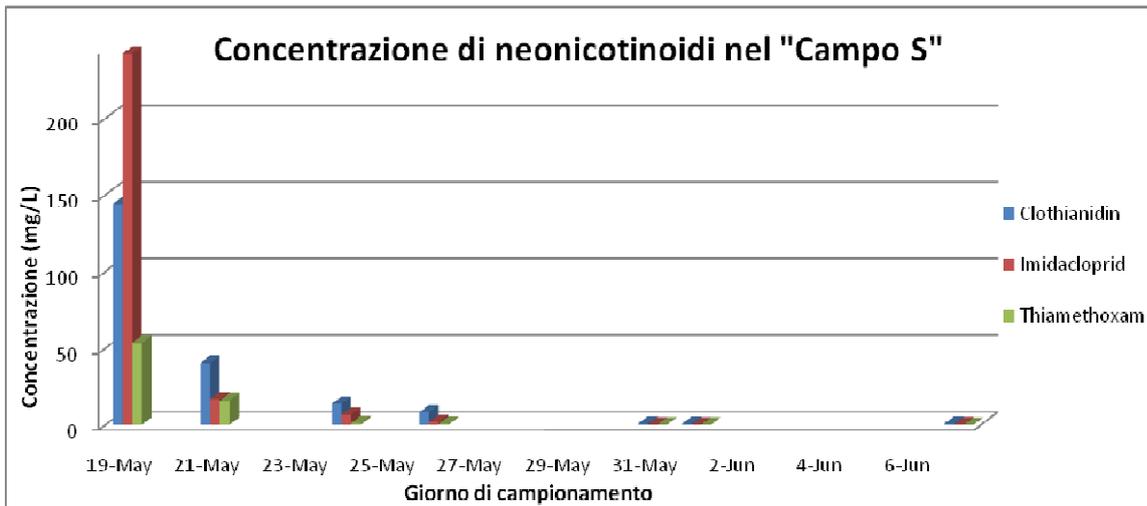
**Tabella 28** - Concentrazioni di neonicotinoidi nelle guttazioni fogliari di piante coltivate in tre diverse tipologie di terreno.

Campo	Data	Neonicotinoidi (mg/L)				
		Fila 2	Fila 3		Fila 4	
		Clothianidin	Imidacloprid	Clothianidin	Thiamethoxam	Clothianidin
S	19 maggio	143,964	242,070	2,400	53,428	14,278
	21 maggio	40,418	16,731	- <sup>a</sup>	15,822	4,277
	24 maggio	13,593	6,527	- <sup>a</sup>	1,048	0,307
	26 maggio	8,073	1,775	- <sup>a</sup>	0,606	0,150
	31 maggio	0,725	0,093	- <sup>a</sup>	0,020	0,012
	1 giugno	0,509	0,137	- <sup>a</sup>	0,015	0,007
	7 giugno	0,644	0,227	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,025
M	26 maggio	2,503	1,826	- <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
	26 maggio	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
	31 maggio	0,367	0,179	- <sup>a</sup>	0,035	0,018
	1 giugno	0,532	0,238	- <sup>a</sup>	0,089	0,034
	1 giugno	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
	4 giugno	0,533	0,116	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,040
	7 giugno	0,367	0,128	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,033
N	7 giugno	20,813	2,970	- <sup>a</sup>	5,434	0,909
	11 giugno	2,899	0,613	- <sup>a</sup>	1,016	0,408
	12 giugno	5,213	0,970	- <sup>a</sup>	0,531	0,258
	17 giugno	0,131	0,048	- <sup>a</sup>	0,022	0,021

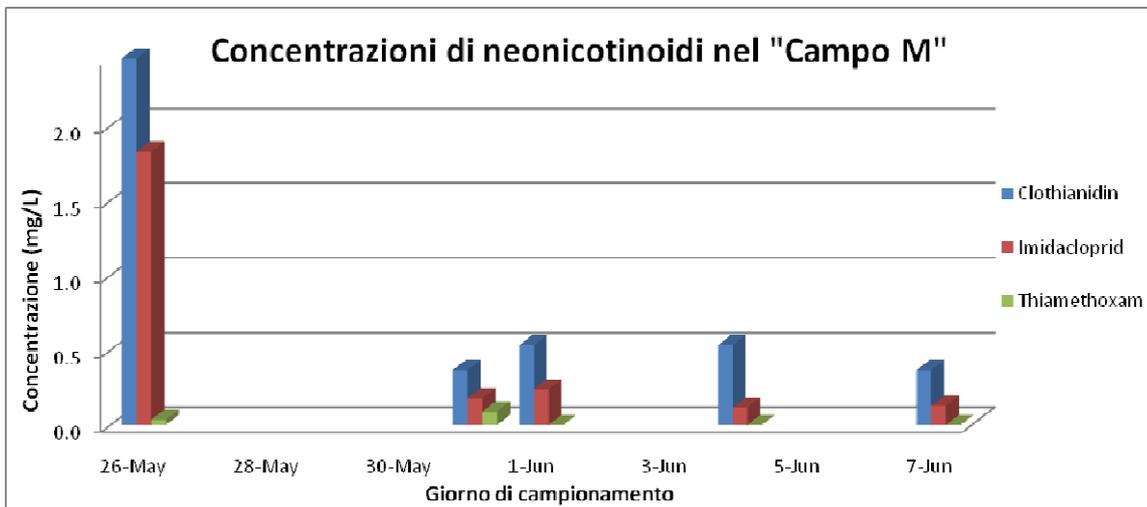
<sup>a</sup> Concentrazioni inferiori al limite di rilevabilità. <sup>b</sup> Campionamenti non effettuati.

**Tabella 29** - Concentrazioni di neonicotinoidi presenti nelle gocce di guttazione fogliare di piante coltivate in tre diverse tipologie di terreno al variare della distanza temporale dalla completa emersione delle plantule dal suolo.

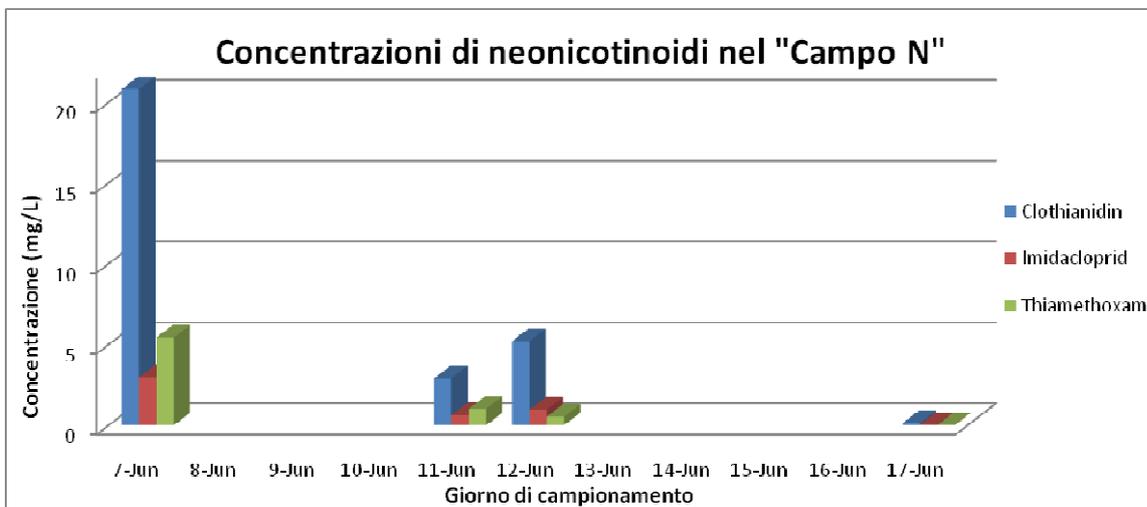
Giorni di distanza dalla comparsa delle plantule	Fila 2 (Clothianidin)			Fila 3 (Imidacloprid)			Fila 4 (Thiamethoxam)		
	Concentrazioni (mg/L)			Concentrazioni (mg/L)			Concentrazioni (mg/L)		
	Campo S	Campo M	Campo N	Campo S	Campo M	Campo N	Campo S	Campo M	Campo N
8	143,964			242,070			53,428		
9			20,813			2,970			5,434
10	40,418			16,731			15,822		
13	13,593		2,899	6,527		0,613	1,048		1,016
14			5,213			0,970			0,531
15	8,073	2,503		1,775	1,826		0,606		
19			0,131			0,048			0,022
20	0,725	0,367		0,093	0,179		0,020	0,035	
21	0,509	0,532		0,137	0,238		0,015	0,089	
24		0,533			0,116			< LOD	
27	0,644	0,367		0,227	0,128		< LOD	< LOD	



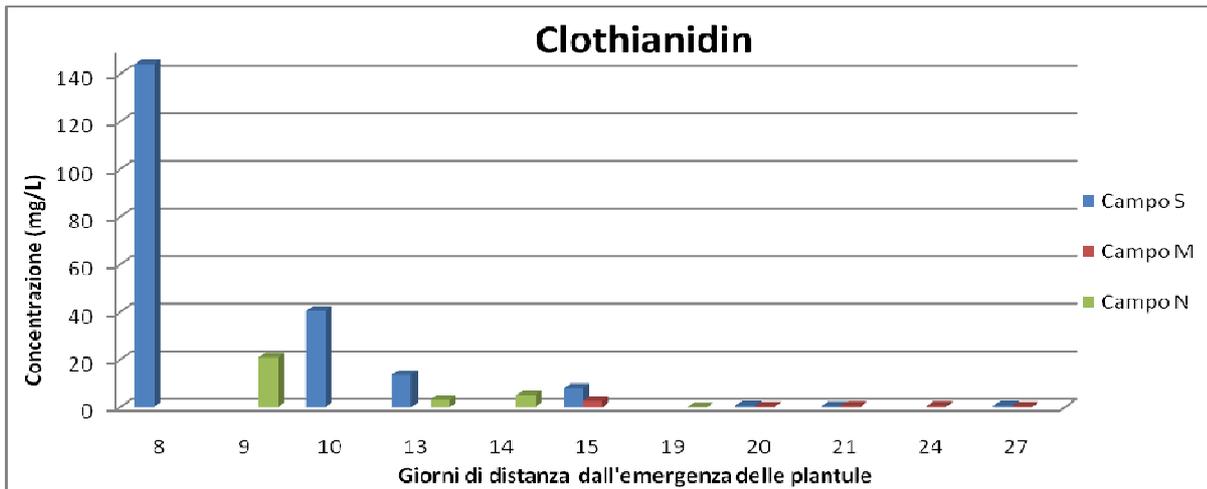
**Figura 16** - Concentrazioni di Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam presenti nelle gocce di guttazione fogliare prelevate dalle piante di mais coltivate nel “Campo S”.



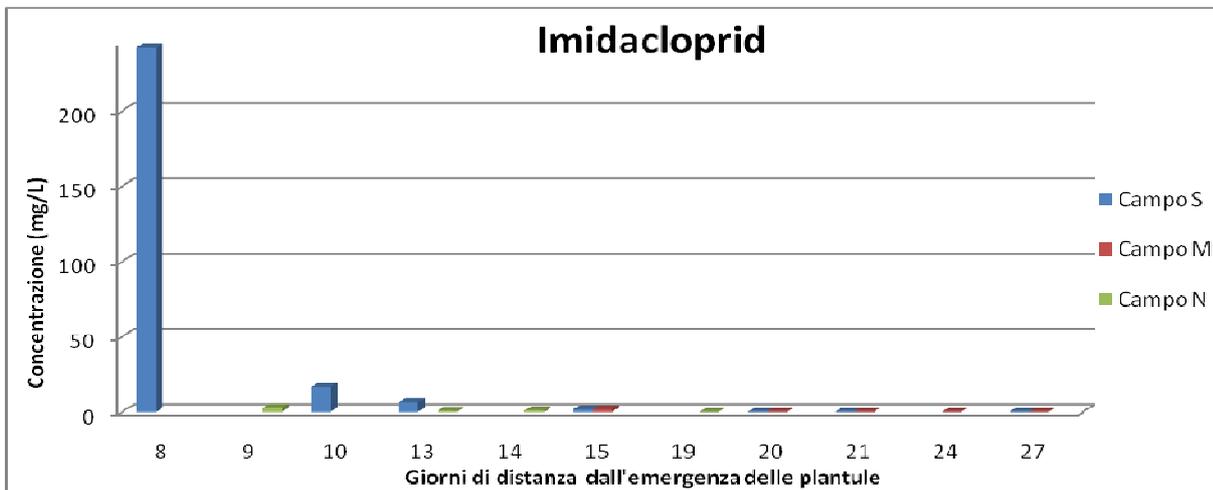
**Figura 17** - Concentrazioni di Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam presenti nelle gocce di guttazione fogliare prelevate dalle piante di mais coltivate nel “Campo M”.



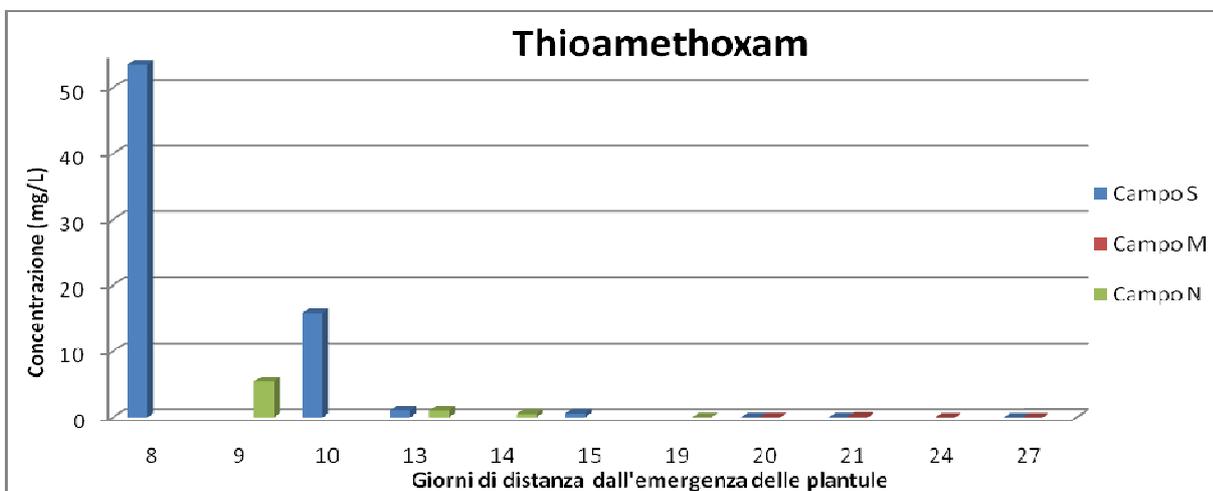
**Figura 18** - Concentrazioni di Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam presenti nelle gocce di guttazione fogliare prelevate dalle piante di mais coltivate nel “Campo N”.



**Figura 19** - Confronto tra le concentrazioni di Clothianidin presenti nelle gocce di guttazione fogliare per piante coltivate in tre diversi tipi di terreno al variare della distanza dal giorno di completa emersione delle piante dal terreno.



**Figura 20** - Confronto tra le concentrazioni di Imidacloprid presenti nelle gocce di guttazione fogliare per piante coltivate in tre diversi tipi di terreno al variare della distanza dal giorno di completa emersione delle piante dal terreno.



**Figura 21** - Confronto tra le concentrazioni di Thiamethoxam presenti nelle gocce di guttazione fogliare per piante coltivate in tre diversi tipi di terreno al variare della distanza dal giorno di completa emersione delle piante dal terreno.

Dai risultati ottenuti è possibile osservare che in tutti i tre tipi di terreno si ha un decadimento rapido delle concentrazioni dei tre principi attivi man mano che ci si allontana dal giorno di semina. L'andamento generale per tutti e tre i campi in esame vede una presenza in concentrazione maggiore di Clothianidin rispetto agli altri due principi attivi (tranne per il primo dato sul "Campo S") seguito poi dall'Imidacloprid e dal Thiamethoxam per i campi "S" ed "M". Inoltre, a differenza degli altri due casi, nel caso del campo con terreno argilloso ("Campo N", Figura 18) le concentrazioni di Thiamethoxam risultano mediamente superiori rispetto a quelle dell'Imidacloprid. Ipotizzando condizioni meteorologiche simili tra le semine effettuate in periodi diversi, si può osservare come, a parità di distanza dei prelievi, nel campo S le guttazioni presentino sempre concentrazioni maggiori nei tre p.a. di quelle trovate negli altri appezzamenti. Non è possibile effettuare un reale confronto con terreno dal medio impasto ("Campo M") poiché i campionamenti sono stati effettuati in periodi eccessivamente lontani dal giorno di semina (a causa dei ritardi della semina dovuti alle avverse condizioni meteorologiche).

#### **5.4. Valutazione dell'attività di bottinamento delle api sulle guttazioni**

In aprile e maggio 2010 sono stati effettuati rilievi sulla presenza di api bottinanti guttazioni di mais attraverso transetti effettuati in prima mattinata, in campi situati in prossimità dell'apiario nel Centro sperimentale della Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna a Cadriano (BO). I rilievi sono stati effettuati in tre distinti appezzamenti investiti a mais.

1. campo di circa 1.300 m<sup>2</sup> situato a circa 50 m dagli apiari;
2. campo di 6.000 m<sup>2</sup> distante 300 m dagli apiari;
3. campo di 1.500 m<sup>2</sup> adiacente agli apiari.

I transetti venivano effettuati lungo le file osservando le 4 file adiacenti. Nel primo e nel terzo appezzamento sono stati effettuati 5 transetti all'interno del campo, nel secondo otto. Per ciascun appezzamento sono state effettuate le osservazioni anche lungo le capezzagne.

I rilievi sono stati effettuati dalla comparsa della prima foglia vera fino alla 6 foglia.

I risultati sono riportati di seguito:

- 22 aprile: attività di volo regolare e guttazioni presenti. Non rilevate api durante i transetti.
- 26 aprile: attività di volo scarsa e guttazioni presenti. Sciamatura 1 o 2 alveari. Non rilevate api lungo i transetti.
- 30 aprile: attività di volo regolare e guttazioni presenti. Rilevata 1 ape nel 2° transetto (verso le 8.30) nel campo 1 che però non bottinava gocce di guttazione.
- 3 maggio: attività di volo regolare e guttazioni presenti. Non rilevate api durante i transetti
- 7 maggio: attività di volo quasi assente e guttazioni presenti. Non è stato possibile effettuare i transetti per pioggia improvvisa.
- 11 maggio: pioggia.
- 14 maggio: pioggia.
- 18 maggio: attività di volo regolare e guttazioni presenti. Tra i campi 1 e 3 in una pozzanghera sulla strada è stata osservata un'ape che beveva.
- 21 maggio: attività di volo regolare e guttazioni assenti (soleggiato e ventilato).
- 27 maggio: attività di volo regolare e guttazioni presenti. Non rilevate api durante i transetti.
- 1 giugno: attività di volo regolare e guttazioni assenti (soleggiato e ventilato).

I dati di campo rilevati nel corso di questa primavera confermano quanto già osservato nel 2009 e cioè che l'attività di bottinamento delle api sulle gocce di guttazione del mais nelle condizioni ambientali della nostra latitudine (Bologna), è nulla o irrilevante.

## **6. Effetti letali e subletali sulle api dei principi attivi usati nella concia delle sementi**

### **6.1 Effetti verso le api della polvere proveniente dai semi di mais concitati con clothianidin: valutazione della mortalità in laboratorio**

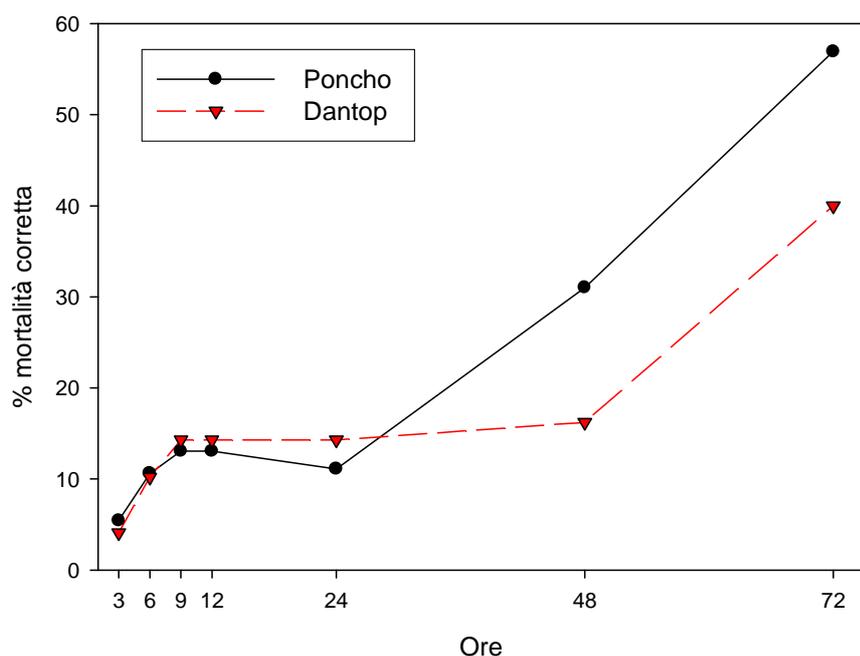
E' stata effettuata una prova di laboratorio per valutare gli effetti di tossicità acuta per contatto indiretto delle polveri disperse dalle macchine seminatrici durante la semina del mais conciato con clothianidin (nome commerciale: Poncho®). Come confronto è stato utilizzato lo stesso p.a. venduto in formulazione liquido (nome commerciale: Dantop®). La prova prevedeva la deambulazione delle api per 3 ore su di un substrato (foglie di melo biologico) trattato con il p.a. da saggiare ed inserito sul fondo di gabbiette di plastica (13 cm x 6 cm x 11 cm altezza) insieme a 10 api bottinatrici. Il substrato veniva rimosso dopo la 3<sup>a</sup> ora. Ogni gabbietta era provvista di un alimentatore con acqua e zucchero per le api.

Da precedenti accordi, le quantità di clothianidin da utilizzare nella presente ricerca, avrebbero dovuto essere quelle ricavate dalle sperimentazioni del CRA-ING di Monterotondo (Roma) nel corso della sperimentazione effettuata durante la primavera, relative alla ricaduta del p.a. a 5 m dal bordo del campo. Tuttavia, a causa dei ritardi nelle sperimentazioni di campo dovuti delle condizioni meteorologiche avverse della scorsa primavera (piogge continue nei mesi di Aprile e Maggio) –peraltro documentate con lettera del coordinatore in data 8/6/2010 n.prot 1474 ai competenti uffici del Mipaaf - e alla rottura dello strumento analitico in dotazione presso il CRA-PAV di Roma (HPLC-MS-MS), è stato deciso di iniziare comunque le prove di laboratorio utilizzando una quantità  $5,12 \mu\text{g}/\text{m}^2$  stimata in base a precedenti prove di campo. Le successive sperimentazioni a Monterotondo hanno poi rilevato una quantità di p.a. a 5 m pari a  $6,25 \mu\text{g}/\text{m}^2$ . Di ciò bisognerà tenere conto nella valutazione complessiva della sperimentazione anche se, essendo la dose qui utilizzata inferiore a quella realmente ottenuta, gli effetti evidenziati nelle prove di seguito descritte non avrebbero che potuto essere di eguale o superiore entità.

La polvere contenente clothianidin, ottenuta dalla semente di mais fornita da Assosementi, è stata preparata con un setaccio di precisione con maglie di  $45 \mu\text{m}$  e poi analizzata. Il contenuto di p.a. è risultato pari all'81% della polvere. Per consentire una dispersione omogenea della polvere sul substrato delle gabbiette (con un'area di  $57,2 \text{ cm}^2$ ) in proporzione al quantitativo di p.a. ricaduto a 5 m (x 1:  $0,029 \mu\text{g}$  di p.a./substrato), è stato necessario miscelare la polvere ( $0,036 \mu\text{g}/\text{substrato}$ ) con un materiale inerte (talco) attraverso diluizioni geometriche partendo da una dose 1000 volte più concentrata. Per la tesi liquida (Dantop) ogni substrato è stato irrorato con  $200 \mu\text{l}$  di soluzione mentre nella tesi polverulenta (Poncho) le foglie sono state cosparse con  $0,01 \text{ g}$  di polvere contenente clothianidin miscelata con talco. Per ogni tesi sono state saggiate le 4 dosi utilizzate per le diluizioni (x 1, x 10, x 100, x 1000) più il controllo negativo: rispettivamente talco per il Poncho e acqua per il Dantop. Ogni dose comprendeva 5 ripetizioni (5 gabbiette con 10 api ognuna). Durante la prova le gabbiette con le api sono state tenute per 3 giorni in cella oscurata a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  e con UR del 70-80%.

Il controllo della mortalità è stato effettuato ogni 3 ore fino alla 12<sup>a</sup> ora del primo giorno, alla 24<sup>a</sup> ora e successivamente ogni 24 ore fino al 4° giorno (3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 ore). La Figura 21 mostra la mortalità corretta con la formula di Schneider-Orelli alle diverse ore del Poncho e del Dantop alla dose di p.a. riscontrata a 5 m durante la semina (x 1). Fino alla 24<sup>a</sup> ora la mortalità causata dai due prodotti è molto simile risultando entrambi “leggermente tossici”, Nelle ore successive il numero delle api morte aumenta maggiormente nelle tesi con le polveri del Poncho fino a “moderatamente tossico” a 48 ore ed a “notevolmente tossico” a 72 ore.

Confrontando invece i valori della  $CL_{50}$  (in  $\mu\text{g}$  di p.a./gabbietta) a 48 ore calcolati con i dati di mortalità delle quattro concentrazioni, emerge una maggiore tossicità del Dantop rispetto al Poncho, rispettivamente  $0,149$  (limiti:  $0,044-0,372$ ) e  $1,872$  (limiti:  $0,417-5,165$ ).



**Figura 22** - Mortalità corretta alla concentrazione di 0,029  $\mu\text{g}/\text{substrato}$  (x 1) del Poncho® (polvere) e del Dantop® (liquido) nelle diverse ore.

## 6.2 Effetti verso le api della polvere proveniente dai semi di mais conciatì con clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil: valutazione della mortalità per contatto indiretto in laboratorio

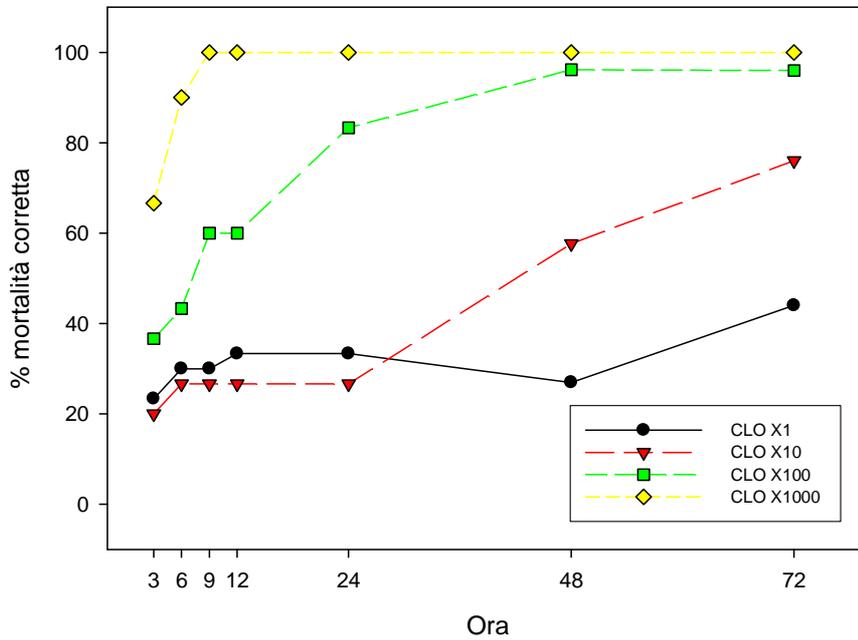
La sperimentazione è stata condotta con le stesse modalità della prova descritta nel capitolo 6.1. Le uniche variazioni sono state le 3 ripetizioni al posto delle 5 della prova precedente e le dosi saggiate. Infatti oltre alla quantità di p.a. a 5 m (x1) dal campo di semina per i diversi principi attivi (il clothianidin nella quantità realmente rilevata di 6,25  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) (Tabella 30), sono state valutate anche le dosi x10, x100 e x1000.

**Tabella 30** - Quantità di principio attivo presente nelle polveri ricadute a 5 metri (x1) e saggiata in laboratorio

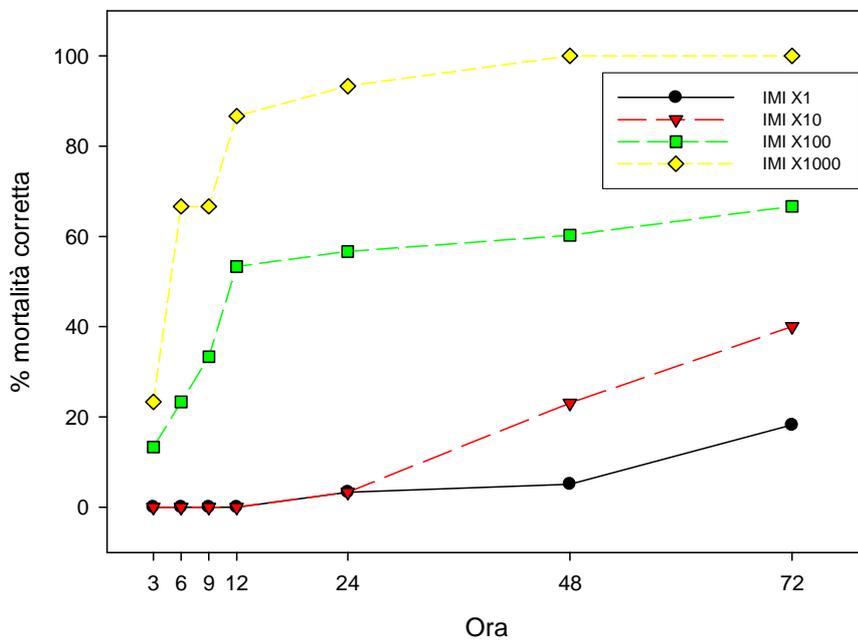
Principio attivo	Q.tà di p.a. ricaduto a 5 m ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	% di p.a. dopo la setacciatura	Q.tà di p.a./gabbietta in $\mu\text{g}$	Q.tà di polvere/gabbietta in $\mu\text{g}$
clothianidin	6,25	81,00	0,036	0,044
imidacloprid	3,66	60,10	0,0209	0,035
thiamethoxam	2,77	46,30	0,0158	0,034
fipronil	0,28	47,00	0,0016	0,0034

I dati fino ad ora disponibili, evidenziati nelle figure 23, 24, 25 e 26 mostrano un andamento della mortalità (corretta con la formula di Schneider-Orelli) correlato con le dosi saggiate per tutti i principi attivi. L'unico dato anomalo è relativo alla dose più elevata del fipronil (FIP x 1000) in cui la mortalità è risultata inferiore alle altre dosi più basse fino alla 24<sup>a</sup> ora per poi schizzare in testa alla 48<sup>a</sup> ed alla 72<sup>a</sup> ora (Figura 26). Il clothianidin, rispetto alla prova precedente (dose di 5,12  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) in cui la mortalità iniziando dal 5% nelle prime ore si assestava poco sopra il 10% fino alla 24<sup>a</sup> ora e poi si innalzava al 30% e al di sopra del 50% rispettivamente alla 48<sup>a</sup> e alla 72<sup>a</sup> ora, in

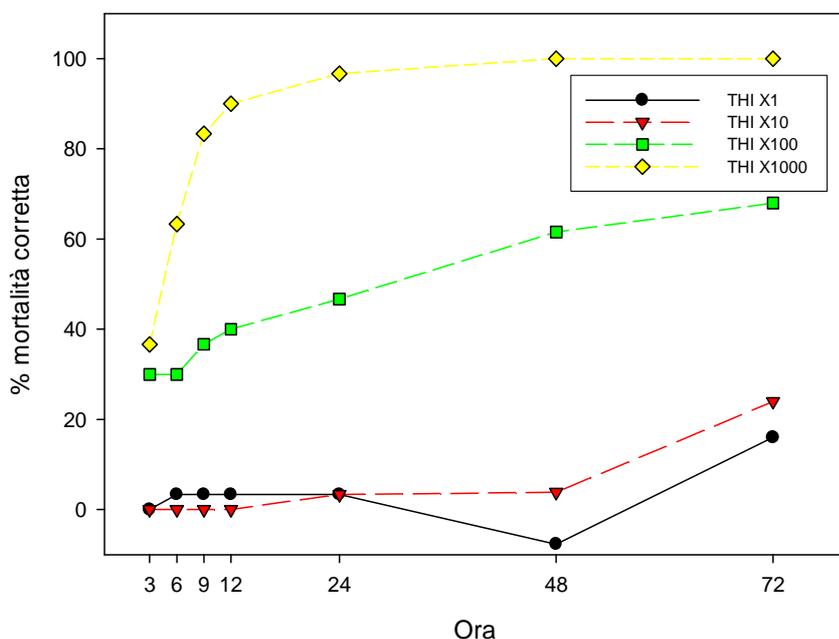
questa prova ( $6,25 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ), provoca una mortalità superiore al 20% già nelle prime ore, supera il 30% nelle ore successive per arrivare al 40% alla 72<sup>a</sup> ora.



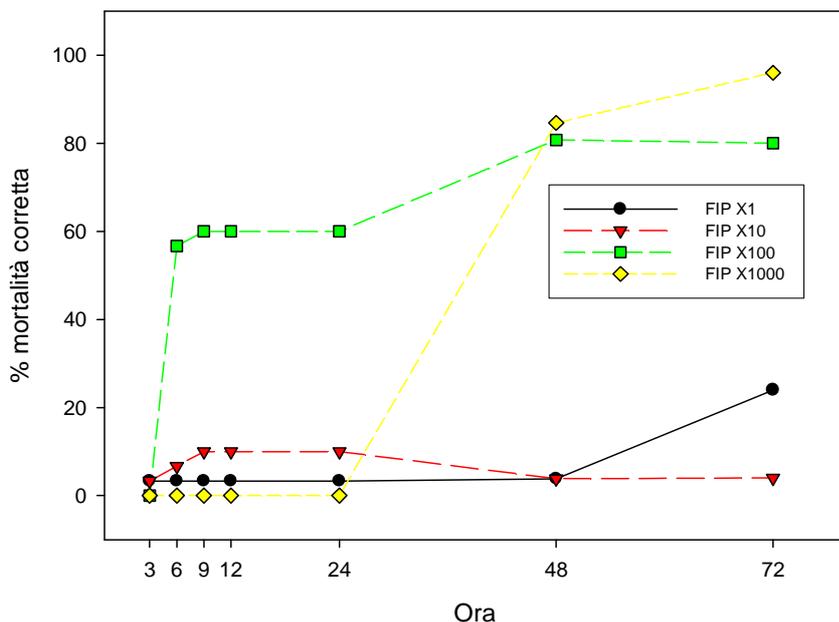
**Figura 23** - Percentuale di mortalità corretta delle api avvelenate con clothianidin.



**Figura 24** - Percentuale di mortalità corretta delle api avvelenate con imidacloprid.



**Figura 25** - Percentuale di mortalità corretta delle api avvelenate con thiamethoxam.



**Figura 26** - Percentuale di mortalità corretta delle api avvelenate con fipronil.

Classificando i dati ottenuti nelle diverse ore per la dose x1 secondo le seguenti cinque classi di tossicità: “non tossico” (<1%), “leggermente tossico” (1-25%), “moderatamente tossico” (26-50%), “notevolmente tossico” (51-75%), “altamente tossico” (76-100%) normalmente utilizzate in questo tipo di prove, è possibile osservare come tutti i prodotti (a parte l’imidacloprid nelle prime ore) mantengano costante una certa tossicità. Il clothianidin, in particolare è risultato il principio attivo più tossico (anche per la maggior quantità di prodotto ricaduta a 5 metri) (Tabella 31).

**Tabella 31** - Classificazione della tossicità verso le api dei diversi principi attivi rispetto alla quantità ricaduta a 5 m (x1) dal bordo del campo di semina.

Principio attivo	6 <sup>a</sup> ora	12 <sup>a</sup> ora	24 <sup>a</sup> ora	48 <sup>a</sup> ora	72 <sup>a</sup> ora
<b>clothianidin</b>	moderatamente tossico				
<b>imidacloprid</b>	non tossico	non tossico	leggermente tossico	leggermente tossico	leggermente tossico
<b>thiamethoxam</b>	leggermente tossico	leggermente tossico	leggermente tossico	non tossico (*)	leggermente tossico
<b>fipronil</b>	leggermente tossico				

\*Nel calcolo della mortalità corretta il numero di api morte del testimone era più elevato rispetto al trattato.

Rispetto alle sperimentazioni del 2009 (in cui le parcelle erano di 0,16 ha) svolte da CRA-ING a Monterotondo, l'aumento della superficie di semina a 3 ha e dei tempi di esecuzione della stessa, ha incrementato le quantità di polveri ricadute in particolare quelle ottenute con la seminatrice senza modifica (vedi capitolo 2). Se nella realtà le quantità fossero 10 volte più elevate il clothianidin passerebbe dalla 48<sup>a</sup> ora da moderatamente a notevolmente e altamente tossico. Ma se le ricadute fossero 100 volte più alte di quelle rilevate le cose cambierebbero radicalmente. Quasi tutti i prodotti dalla 12<sup>a</sup> ora in poi (il clothianidin addirittura dalla 3<sup>a</sup> ora) finirebbero nelle classi di tossicità più elevate. Quindi, a nostro avviso, per una miglior valutazione complessiva dei dati bisogna tener in considerazione, oltre alle maggiori dimensioni rispetto al 2009 per l'ovvio riscontro che l'estensione della superficie seminata può influenzare il livello di contaminazione delle zone circostanti (come già ricordato anche nel Capitolo 2 della relazione), che la prova nel suo complesso durava solo un'ora e tre quarti, quando normalmente nell'area maidicola nazionale (compresa fra le regioni Lombardia, Piemonte, Veneto, Friuli Venezia Giulia ed Emilia Romagna) gli agricoltori tendono a seminare tutti nello stesso periodo dalle prime ore dell'alba fino a sera per non incorrere nelle piogge.

### **6.3 Effetti verso le api della polvere proveniente dai semi di mais concitati con clothianidin: valutazione della mortalità e di altri parametri in semicampo**

L'effetto della quantità di clothianidin contenuta nella polvere ricaduta a 5 metri dai bordi del campo di mais durante la semina sperimentale, effettuata presso il CRA-ING di Monterotondo (Roma) (vedere al punto 6.1 per la stima del valore), è stato valutato in nuclei di api poste all'interno di tunnel bottinanti su colza. La polvere utilizzata miscelata con talco, è stata preparata come nella prova in laboratorio (punto 6.1). A fine maggio 2010 presso un campo seminato a colza collocato nell'Azienda Agraria Sperimentale di Cadriano (BO) sono stati allestiti 6 tunnel sperimentali (3 per il testimone e 3 per il trattato) delle dimensioni di 40 m<sup>2</sup> cadauno coperti di rete antiafidi. I tunnel delle due tesi erano posizionati in modo randomizzato. Il 31 maggio, quando la colza era circa al 50% di fioritura, in ogni tunnel è stato posizionato un nucleo di api disposte su 3 telaini (due di covata e uno contenente circa 20-25% di scorte di miele) e provvisti di regina del 2009. Ogni tunnel era provvisto di gabbia per la raccolta di api morte (tipo "underbasket") posizionate davanti al nucleo. La prova è stata svolta seguendo le linee guida EPPO e, sia prima che dopo il trattamento, sono stati raccolti i seguenti dati:

1. Mortalità giornaliera (numero di api bottinatrici morte presenti all'interno delle gabbie underbasket);
2. Forza della famiglia: sviluppo della famiglia (api adulte, covata) valutato con il metodo dei sestii;
3. Attività di volo: numero di api in uscita dall'alveare in 30";

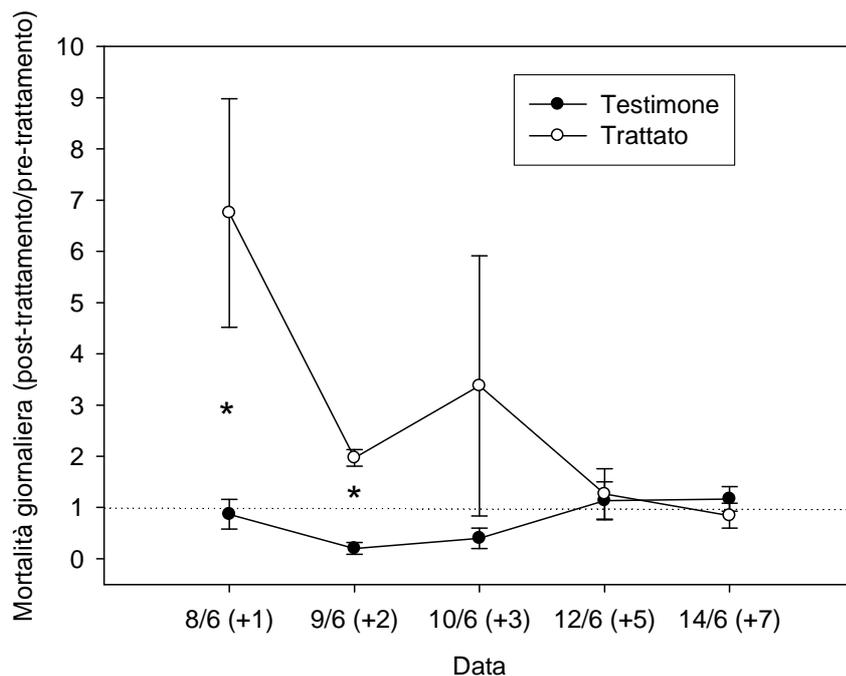
4. Attività di bottinamento: numero di api presenti sui fiori di colza in 3 parcelle di 0,25 m<sup>2</sup> distribuite in modo omogeneo all'interno di ogni tunnel. Il conteggio delle api è stato effettuato con il metodo istantaneo. Anche se sotto tunnel l'etologia delle api risulta spesso alterata, oltre al numero di api presenti sui fiori, l'attività di bottinamento è stata valutata anche dal punto di vista qualitativo annotando comportamenti che possono indicare anomalie come api immobili sulle foglie o sui fiori, api che si puliscono le zampe e/o le antenne, oppure api che sembrano stordite (Giffard e Mamet, 2009);
5. Osservazioni di fronte all'alveare: presenza di bottinatrici con polline ed eventuali comportamenti anomali.
6. Analisi dei residui sulle api morte raccolte nelle gabbie underbasket e sulla vegetazione trattata con polvere contenente clothiandin a diversi giorni dall'applicazione (-4, 0 (+1h), +1, +3, +7 giorni dal trattamento).
7. Oltre a queste informazioni sono stati raccolti dei dati aggiuntivi che riguardano lo stato sociofisiologico della famiglia di api. In particolare è stata registrata la temperatura interna al nucleo nella zona di covata (con sensore iButton DS1923) e il grado di costruzione di un favo su un telaino vuoto (privo di foglio cereo), inserito in ogni nucleo il giorno del trattamento.

La valutazione del comportamento di fronte all'alveare, dell'attività di volo e di bottinamento è stata effettuata nei giorni: -3, -1, 0, 1, 2, 3, 5 e 7 dal trattamento. Le osservazioni venivano svolte ogni due ore nella parte centrale della giornata (10.00 -12.00 -14.00 -16.00) ad eccezione del giorno -3 in cui sono stati raccolti solo i dati del pomeriggio. Al mattino dei giorni di osservazione si procedeva alla raccolta delle api morte. La forza della famiglia è stata valutata prima del trattamento (-4) e dopo 7 e 15 giorni dal trattamento. Il sensore di temperatura ed umidità è stato collocato durante il primo controllo interno agli alveari (-4) e scaricato dopo il terzo (+15). La costruzione del favo sul telaino vuoto è stato valutato al +7 e al +15.

Il trattamento è stato effettuato con un polverizzatore meccanico (Cifarelli serie M3. Motore: 2 tempi da 77cc; Potenza: 3,6 kw; Uscita polveri: 0 - 6 Kg/min; Velocità aria: 125 m/sec; Volume aria: 20 m<sup>3</sup>/min) il 7 giugno alle 12.30 spargendo sui fiori di colza, in piena fioritura, 200 g di polvere contaminata contenente 204,77 µg di p.a. miscelata col talco in ogni tunnel del trattato. Il talco puro è stato applicato nei tunnel della tesi testimone. La copertura di rete nei tunnel è stata tolta il 15 giugno (8 giorni dopo il trattamento), in modo da consentire alle api di bottinare liberamente nelle rimanenti zone dell'appezzamento di colza o nei campi circostanti.

Dal confronto giornaliero tra la mortalità del trattato e quella del testimone (dati normalizzati facendo il rapporto con la mortalità giornaliera pre-trattamento) sono emerse differenze statisticamente significativamente nei due giorni successivi al trattamento. La mortalità è maggiore nel trattato, nei giorni +1 e +2, ma poi tende a stabilizzarsi con quella del testimone nei giorni successivi (Figura 27). Applicando l'indice proposto da Schmidt (*Schmidt H.-W., Brasse D., Künast C., Mühlen W., von der Ohe W., Tornier I., Wallner K. (2003). Introduction of indices for the evaluation of tent tests and field tests with honeybees. Bulletin of Insectology, 56(1): 111-118*) per confrontare gli effetti degli agrofarmaci in prove di campo e semicampo emerge che la mortalità del trattato è circa 10 volte superiore a quella del testimone. Questo indice è il risultato del rapporto tra la mortalità del trattato e quella del testimone normalizzata con la mortalità pre-trattamento di ogni alveare (Tabella 32).

Nonostante il picco di mortalità nei tunnel trattati con polvere contenente clothianidin, non sono emerse differenze significative tra le due tesi per quanto riguarda la forza della famiglia, sia nelle api che nella covata. Sono emerse differenze statisticamente significative tra i giorni in entrambe le tesi, infatti, sia i sestini di api che di covata aumentano dal 14 giugno (+7) al 22 giugno (+15), dopo che è stata tolta la copertura dei tunnel. L'interazione giorno-tesi è risultata non significativa (Figura 28, Tabella 33).



**Figura 27** - Rapporto tra la mortalità giornaliera nei diversi giorni post-trattamento con la mortalità media dei giorni pre-trattamento.

\*Differenze statisticamente significative tra trattato e testimone al Test U di Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

La linea punteggiata indica quando la mortalità post-trattamento è uguale al pre-trattamento (rapporto = 1).

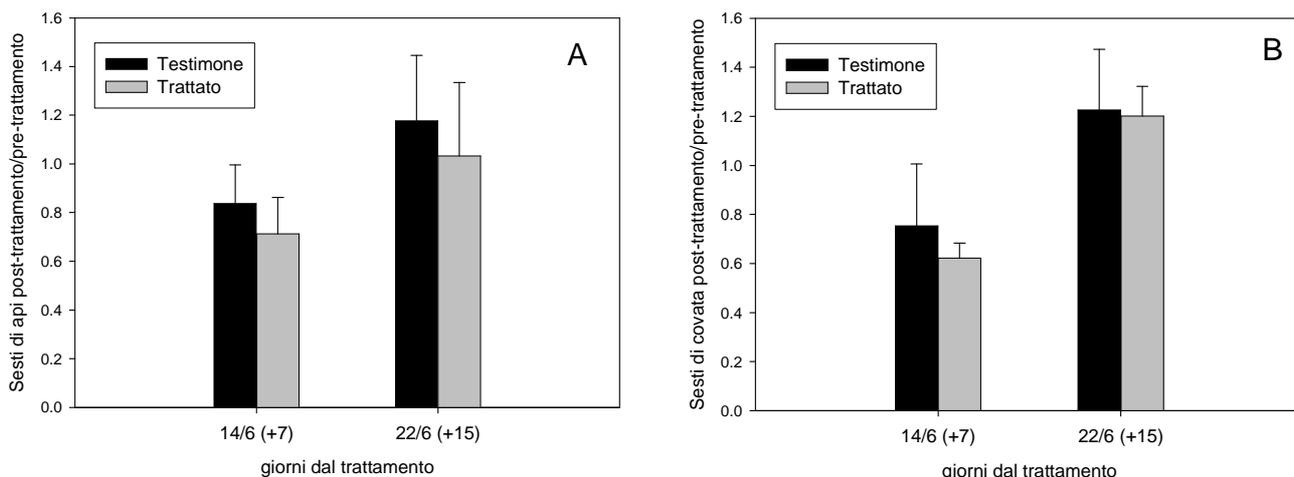
**Tabella 32** - Indice definito dal rapporto tra la mortalità media normalizzata con la mortalità pre-trattamento dei tunnel trattati con quelli del testimone (da Schmidt *et al.* 2003).

Alveari	Tesi	Mortalità giornaliera pre-trattamento (3 giorni)	Mortalità giornaliera post-trattamento (5 giorni)	Indice medio post-trattamento/ pre-trattamento
1	Testimone	9,00	4,80	0,93
3	Testimone	3,33	1,80	
5	Testimone	2,67	4,60	
2	Trattato	0,33	7,80	9,67
4	Trattato	6,67	6,40	
6	Trattato	3,67	17,00	
<b>Indice di confronto trattato/testimone</b>				<b>10,67</b>

**Tabella 33** - Risultati del test ANOVA a misure ripetute per gli effetti delle tesi, dei giorni e dell'interazione sul rapporto post e pre-trattamento dei sestini di api e di covata.

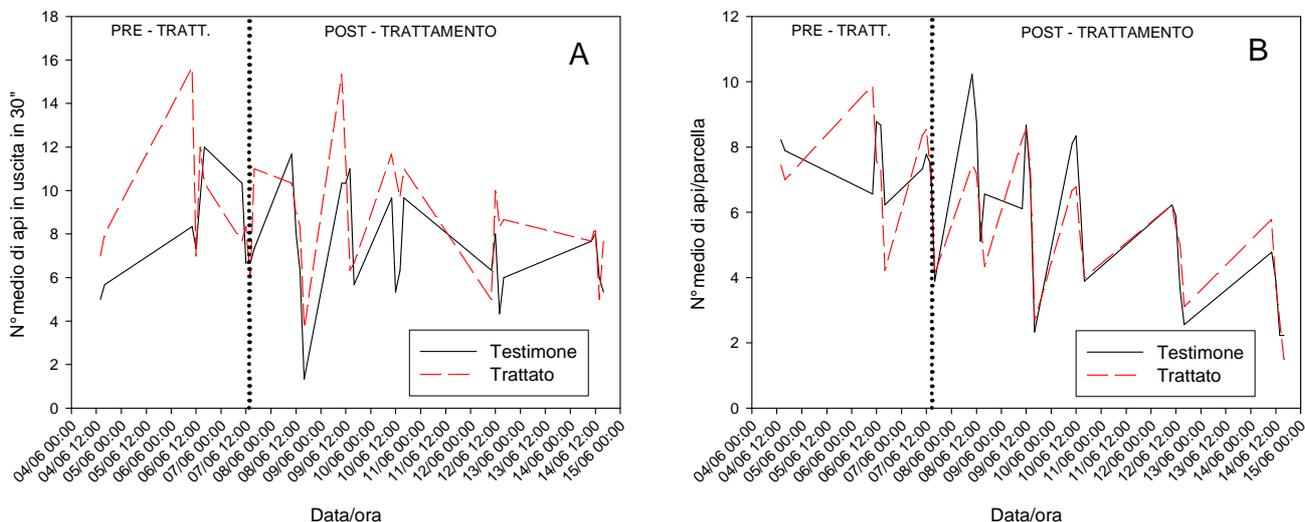
Effetti	Sestini di api		Sestini di covata	
	F	p	F	p
Tesi	0,19	0,69	0,09	0,78
Giorni	11,04	0,03 *	107,26	< 0,01 *
Interazione	0,01	0,92	1,12	0,35

\*Differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).



**Figura 28** - Rapporto tra i sesti di api (A) e di covata (B) nei giorni dopo il trattamento (a +7 e +15) e quelli pre-trattamento (-4).

Per quanto riguarda l'attività di volo e di bottinamento, i dati sono in fase di elaborazione statistica, tuttavia dal loro andamento (Figura 29) non sembrano delinearsi effetti negativi. In media l'attività di volo dopo il trattamento è stata maggiore nei nuclei del trattato rispetto al testimone (8,7 vs 7,3 api in uscita ogni 30"), mentre il numero medio di api osservate sulle parcelle dopo il trattamento è stato simile in entrambe le tesi (5,6 vs 5,4 rispettivamente per il testimone e il trattato). Anche gli altri comportamenti osservati sulle parcelle non mostrano evidenti sintomi di avvelenamento. Ciò è dimostrato sia dalla loro bassa frequenza riscontrata in entrambe le tesi che la presenza di tali comportamenti sia prima che dopo il trattamento (Tabella 34).



**Figura 29** - Attività di volo (A) e di bottinamento (B) medio per i tre tunnel di ogni tesi rilevati durante la prova.

**Tabella 34** - Numero totale di api osservate sulle parcelle di colza mostranti comportamenti anomali. Il valore tra parentesi fa riferimento alla tesi trattato.

	Api immobili sulle foglie o sui fiori	Api in attività di pulizia	Api stordite
<b>Pre-trattamento</b>	0 (0)	0 (4)	0 (0)
<b>Post-trattamento</b>	3 (10)	0 (2)	0 (0)

Anche per quanto riguarda la percentuale di favo costruito sul telaino vuoto non sono emerse differenze statisticamente significative tra i nuclei del testimone e quelli del trattato ( $F_{(1,4)} = 0,086$ ;  $p = 0,783$ ). A 15 giorni dal trattamento, in media le api avevano costruito circa il 20% del telaino. L'elaborazione dei dati relativi alla temperatura interna agli alveari e l'analisi dei residui sulle api morte e sulla vegetazione sono tuttora in corso.

In conclusione dai risultati emerge un effetto significativo delle polveri derivanti da mais conciato con clothianidin (Poncho) sulla mortalità delle api. Il picco di mortalità si riscontra subito dopo l'esposizione delle api al principio attivo e perdura per circa 2-3 giorni. Tuttavia le famiglie colpite, seppur indebolite, non risultano danneggiate dal punto di vista del numero di api e di covata almeno nel breve-medio periodo (fino a 15 giorni dal trattamento).

#### **6.4. Effetti subletali di clothianidin sul comportamento di bottinamento e di la capacità di homing delle api in campo**

##### **6.4.1 Effetti di clothianidin sul bottinamento e la danza delle api**

Le api di un alveare con pareti a vetro, costituito da 6 telaini di cui due di miele ed 1 di covata, sono state addestrate a cercare polline da un dispenser artificiale (Figura 30). Le api sono state marcate e il dispenser è stato gradualmente spostato a 150 m dal nido.

I tempi di volo delle api in andata e ritorno dal dispenser sono stati misurati, così come le frequenze di volo. Le api che mostravano una frequenza assidua al dispenser sono state scelte per la sperimentazione e divise in gruppi di 10 api ciascuno.

La cattura degli individui è stata effettuata alla postazione dispenser dopo che l'ape aveva finito di costituire la pallottolina di polline, in modo che mantenesse la motivazione a 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 la cui punta era stata tagliata. Dopo circa 30' di affamamento è stato somministrato singolarmente il trattamento: 0,70 ng/ape di clothianidin in 5 microlitri di soluzione zuccherina al 50% ad un gruppo (N=10); 5 microlitri di soluzione zuccherina al 50% al secondo gruppo (N=10).

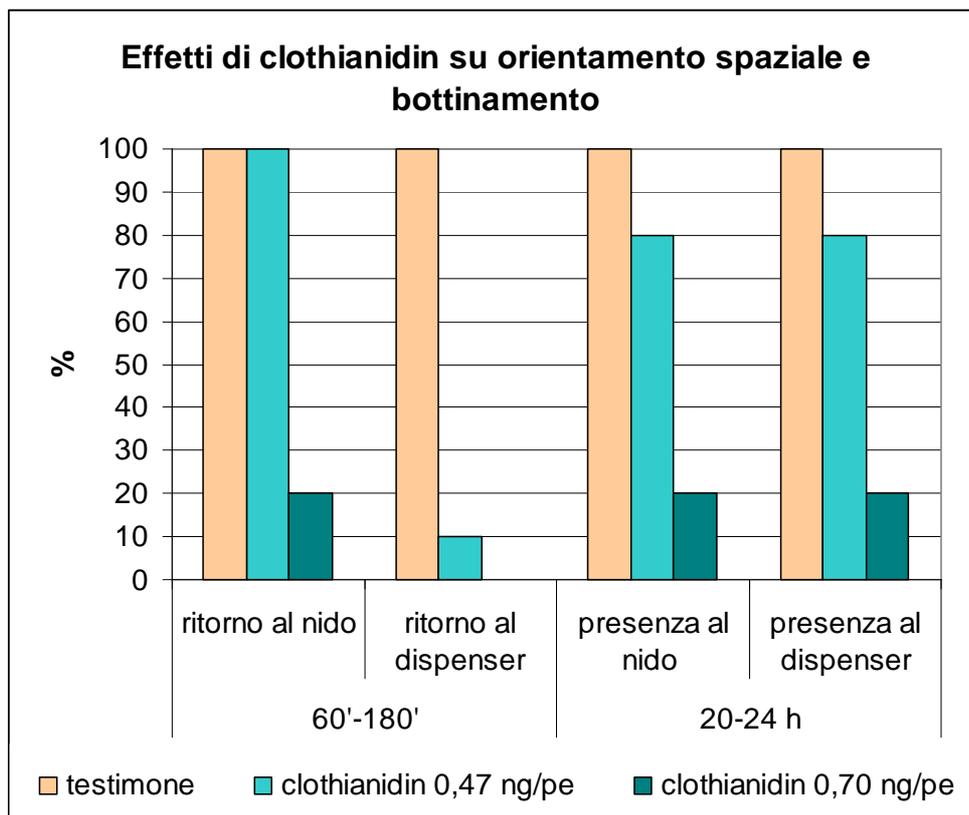
Dopo 60' le api sono state liberate a piccoli gruppi alla postazione dispenser. E' stato seguito il comportamento di ogni individuo al dispenser e al nido per 3 ore, annotando la frequenza e i tempi dei voli di ritorno e filmando il comportamento al nido per 5 minuti al ritorno dell'ape. Sono stati annotati contestualmente i principali comportamenti (scarica il polline, danza, trofallassi, cammino, immobilità, uscita). Analoghe videoriprese e osservazioni dirette sono state effettuate dopo 20-24 ore. La sperimentazione è stata ripetuta con le stesse modalità utilizzando un dosaggio minore di clothianidin, pari a 0,47ng/ape.



**Figura 30** - A: api durante la raccolta del polline dal dispenser; B: api marcate al nido.

Le riprese video sono in corso di elaborazione. 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 polline, interazioni e scambio di cibo con le compagne, uscita e ritorno immediato al dispenser per la raccolta del polline), mentre solo una delle api trattate con la dose più alta ha fatto ritorno al nido, dove non ha scaricato il polline ed è rimasta a lungo isolata e immobile. Le api trattate con il dosaggio più basso di clothianidin hanno fatto ritorno al nido ma hanno avuto difficoltà a scaricare il polline e durante le prime 3 ore di osservazione non sono tornate al dispenser; solo l'80% di esse si è presentata il giorno successivo..

I principali dati provenienti dall'osservazione diretta sono riportati in Figura 31.



**Figura 31** - Principali comportamenti osservati.

#### **6.4.2 Effetti della polvere proveniente dai semi di mais conciati con clothianidin sulla capacità di homing delle api**

L'obiettivo dello studio è valutare la capacità di orientamento delle api in seguito al contatto con le quantità di polveri disperse a 5 m dalla macchina seminatrice di mais conciato con Poncho®.

L'ipotesi si basa sul fatto che le api, durante l'attività di bottinamento, possono venire in contatto con quantità subletali di clothianidin contenuto nelle polveri disperse nell'ambiente circostante durante la semina del mais, con modalità diverse (ingestione, contatto diretto, contatto indiretto) in maniera singola o multipla.

Per valutare questa ipotesi le api di un alveare sono state marcate singolarmente, contaminate con le diverse modalità e successivamente si è valutato il loro ritorno all'alveare e al punto di alimentazione.

La prima parte della sperimentazione (contatto indiretto) è stata condotta in una zona coltivata prevalentemente a mais nei pressi di Bolognina (frazione di Crevalcore – BO) (coordinate: 44° 46'

16° N; 11° 08'53" E) (Figura 32) in cui, dai sopralluoghi effettuati e dai colloqui intercorsi con i residenti e con gli apicoltori locali, non erano presenti apiari in un raggio di 2 km.

La fase di addestramento comportava di posizionare, a circa 330 m dall'alveare, portato in loco la sera del 26 luglio 2010, un alimentatore con acqua e miele. Essendo una fonte alimentare estremamente attraente in una zona e in un periodo privo di estese e importanti fioriture, le api sono state attratte all'alimentatore e abituate a visitarlo in poco tempo. L'alimentatore era costituito da un vassoio riempito con acqua e zucchero al 50% e munito di coperchio di plexiglass forato. All'interno dei fori sono state collocate delle spugnette che assorbivano la soluzione.

Una volta abituate al percorso le api sono state marcate usando pennellini imbevuti con gocce di Uniposca®, catturate (30 api per tesi) e messe nelle gabbiette per il trattamento: 1) trattato (contatto indiretto) (0,044 µg di polvere/gabbietta, valore corrispondente a 6,25 µg/m<sup>2</sup> quantità di clothianidin riscontrata a 5 m dal campo seminato a mais; 2) controllo (talco).

Le api marcate, catturate nell'alimentatore, sono state lasciate deambulare per un'ora su di un substrato (foglie di melo biologico) cosparso con talco puro (o addizionato con la polvere contaminata). Le gabbiette sperimentali in plexiglass erano provviste sul fondo di un alimentatore (tappo di una Eppendorf) contenente 200 µl di soluzione zuccherina e di substrato con foglie di melo. Per mantenere le api sul fondo della gabbietta e costringerle a deambulare il più possibile sul substrato trattato, è stato utilizzato un separatore in cartone.

La raccolta dei dati, iniziata dopo che le api sono state liberate, consisteva in 3 ore di osservazioni continue all'alveare e al punto di alimentazione. Il protocollo prevedeva anche un ulteriore controllo a 24 ore dal rilascio, nel caso che, entro tale periodo di tempo, le api fossero tornate in una percentuale limitata o non rientrate affatto.

I dati sono ancora in fase di elaborazione, ma dalle prime analisi emerge che le api disperse (cioè mai rientrate all'alveare dopo il rilascio, né viste sull'alimentatore) sono state il 10% nella tesi "trattato" e il 3,4% nella tesi "controllo". In entrambe le tesi, le api sono rientrate all'alveare in media circa 30 minuti dopo il rilascio. L'87,5% delle api "testimone" sono rientrate entro la prima ora contro l'80,8% delle api che sono entrate in contatto con il clothianidin.

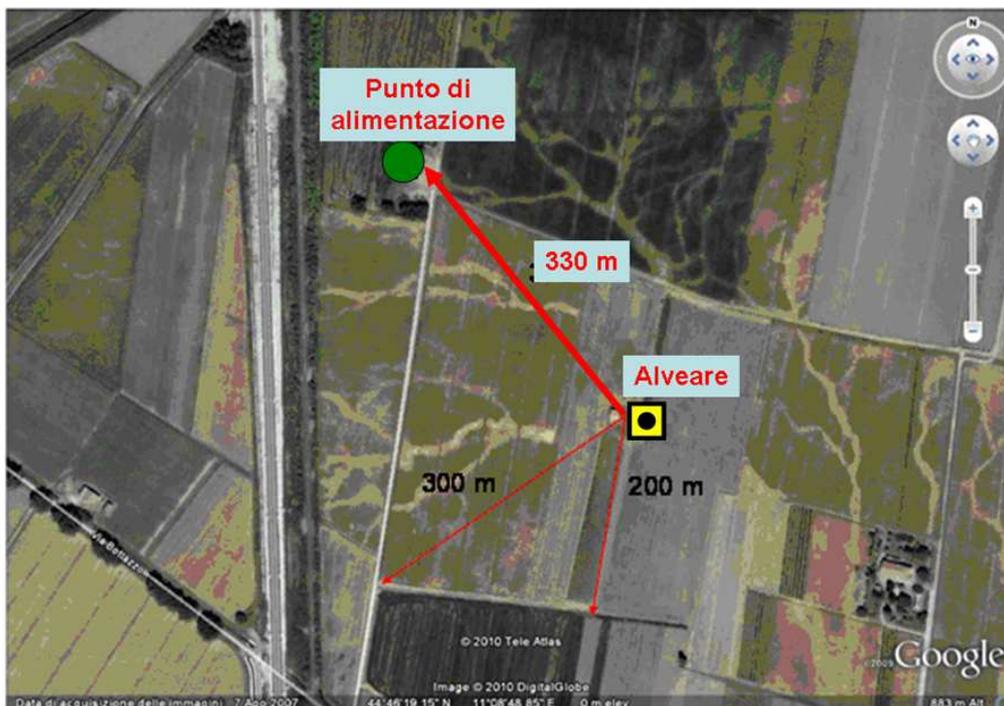


Figura 32 – Mappa dell'area di prova.

## **6.5 Effetti verso le api delle polveri provenienti da semi concitati con clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil: valutazione degli effetti su apprendimento e memoria di odori e colori ed orientamento spaziale**

Lo studio del riflesso di estensione della ligula in presenza di odori associati alla somministrazione di liquidi zuccherini consente di verificare l'impatto dei pesticidi su alcuni processi cognitivi, come l'apprendimento e la memorizzazione di diversi tipi di stimoli ambientali.

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. Nel corso delle sperimentazioni svolte nel 2009 nell'ambito della scheda di ricerca "Api e Agrofarmaci" del Progetto Apenet, era già stato evidenziato come le quantità di 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, che si manifesta con una ridotta capacità di riconoscere odori associati ad una ricompensa durante un apposito training.

Trattandosi di effetti verificabili a dosi sub letali, il nostro programma prevedeva di ripeterle solo se, dopo le modifiche sperimentate per ridurre la fuoriuscita di polveri, si fosse giunti a determinare una quantità di polveri disperse al di sotto delle quantità da noi già saggiate. In realtà, le quantità misurate appaiono uguali o superiori a quelle rilevate lo scorso anno.

Tuttavia, anche a seguito del dibattito svoltosi nel corso della tavola rotonda tenutasi lo scorso 4 giugno 2010 a Roma, presso il CRA sede centrale, alla presenza di esperti europei sui meccanismi neuronali che sottendono all'apprendimento e alla memoria delle api, si è deciso di continuare le sperimentazioni adottando un protocollo PER (*Proboscis Extension Reflex*) in parte modificato, al fine di aumentare i margini di appropriatezza del metodo.

Gli odori utilizzati in questo secondo anno di sperimentazioni, hanno a che fare con la sua vita sociale dell'ape: il linalolo, componente della ghiandola di Nasonov con funzioni di richiamo e aggregazione, e una miscela feromonica (Bee Boost) contenente alcuni dei componenti del feromone della regina, molecole poco volatili con molteplici funzioni, fondamentali per la coesione della colonia e per stimolare le operaie svolgere i propri compiti. Ciò allo scopo di avvicinare maggiormente il metodo utilizzato per le sperimentazioni a quanto può succedere in campo e favorire l'interpretazione dei risultati nell'ottica dell'alveare, e non solo della singola ape.

Per questa stessa ragione, riguardo invece alle prove nel labirinto ad Y sulla capacità di orientamento, si è deciso di lavorare all'aperto utilizzando api libere di volare, quindi vere bottinatrici in attività presso il loro alveare, che venivano addestrate a cercare la ricompensa nella nostra struttura sperimentale.

### ***6.5.1 PER-test: valutazione degli effetti di clothianidin (polveri contaminate) sulla capacità di riconoscimento del linalolo, componente della ghiandola di Nasonov***

**Alveari, numero api, ripetizioni:** sono stati utilizzati due alveari (B e C), e condotte 4 ripetizioni (di 9-11 api ciascuna) per alveare.

**Cattura:** Le api sono state catturate in apposite gabbiette di plexiglass aventi come fondo una piastra Petri del diametro di 8,5 cm (10 api per gabbietta). Ogni gabbietta era munita di un alimentatore.

**Principio attivo:** clothianidin contenuto nelle polveri disperse durante la semina del mais. La polvere per le sperimentazioni è stata estratta da partite di semi concitati forniti da Assosementi presso il CRA-ING di Roma, utilizzando il cilindro Heubach.

La quantità di principio attivo per superficie utilizzato nelle nostre ricerche è pari a quella stimata nella ricaduta a 5 m dal campo di semina, utilizzando la seminatrice con modifica: 5,121  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  (dati CRA-ING; vedere nota al punto 5.1 per la stima).

Poiché sono state utilizzate gabbiette sperimentali con una superficie totale di 56,72 cm<sup>2</sup>, aventi come fondo una capsula Petri di 8,5 cm di diametro, la quantità di polvere utilizzata per ogni gabbietta è stata calcolata in proporzione alla superficie a disposizione.

La preparazione e miscelazione con talco per ottenere dalla polvere concentrata del principio attivo estratta dall'Heubach alle concentrazioni sub letali da utilizzare è stata effettuata presso il DiSTA. In ogni contenitore sono stati posti 0,01 g di talco contenente 0,036 microgrammi di polvere contaminata con 0,029 microgrammi di principio attivo.

In ciascuna gabbietta sono state poste 10 api.

**Modalità di contaminazione con il principio attivo:** Subito dopo la cattura in uscita dall'alveare il fondo di ogni gabbietta è stato sostituito con una capsula Petri sulla quale era stata distribuita la dose 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:** Ogni ape, una volta trattata, è stata inserita, singolarmente, all'interno di contenitori ottenuti da puntali per pipette Gilson.

**Training:** Il training ha avuto inizio con alcuni esercizi per abituare le api ad un flusso d'aria per 25 secondi, cui sono seguite 12 prove (distanziate tra loro da 12 minuti) in cui sono stati presentati due odori, linalolo e menta piperita, associati rispettivamente alla ricompensa (soluzione zuccherina al 30%, 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 in 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 con l'odore ed usciva dall'apertura della siringa (senza ago).

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 30% e, all'estensione della ligula, contemporaneamente 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 si esegue ai 60', 180' e a 24h, rispettivi all'ultima prova del training. Ogni test consisteva in una prova con presentazione alternata dell'odore premiato e di quello associato alla punizione. Durante le presentazioni all'ape non è stata offerta né la ricompensa né la punizione.

Ogni risposta è stata classificata nelle seguenti categorie:

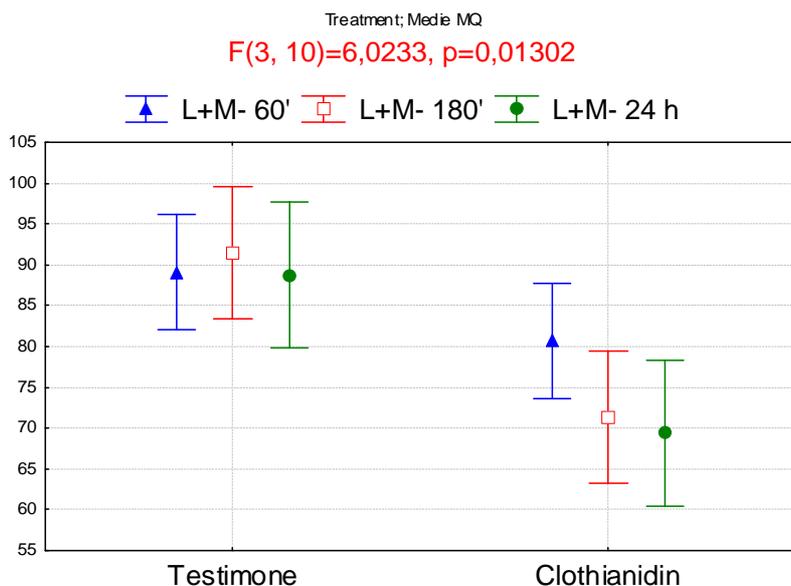
1. Corretta: risposta solo all'odore premiato e non a quello punito
2. Parzialmente corretta: risposta ad entrambi
3. Parzialmente sbagliata: nessuna risposta
4. Sbagliata: risposta solo all'odore punito e non a quello premiato

Le api sono state nutrite al termine del test a 180' con una goccia da 30 µl di soluzione zuccherina.

**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 una ANOVA a due vie, considerando come fattori principali il trattamento (clothianidin, testimone non trattato) e la colonia di origine.

I risultati mostrano un effetto significativo del trattamento con clothianidin sulla capacità di riconoscere gli odori. La percentuale di risposte pienamente corrette (estensione della ligula in presenza del linalolo e non della menta, L+M-) è infatti significativamente inferiore nelle api trattate rispetto ai testimoni non trattati (Figura 33, Tabella 35).



**Figura 33** - Spiegazione nel testo.

**Tabella 35** - Spiegazione nel testo.

Effetto	Test di Significatività Multivariati (Polveri 2010 a in polveri 2010 a) Parametrizzazione sigma-ristretta Decomposizione ipotesi effettive					
	Test	Valore	F	Effetto gl	Errore gl	p
Intercetta	Wilks	0,004496	738,0811	3	10	0,000000
Treatment	Wilks	0,356253	6,0233	3	10	0,013018
Colony	Wilks	0,566133	2,5546	3	10	0,114113
Treatment*Colony	Wilks	0,927065	0,2622	3	10	0,851035

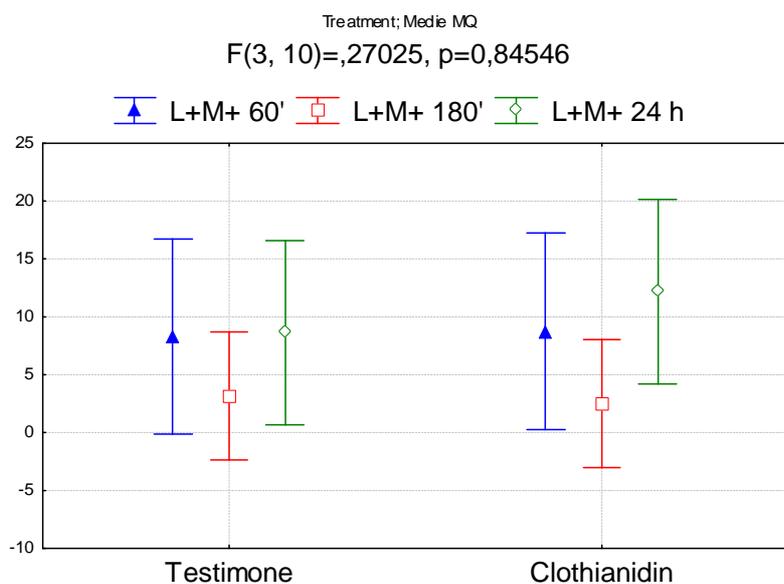
Le percentuali di risposte sempre positive non sono statisticamente diverse nei due gruppi, e neanche quelle delle risposte sempre negative (Tabelle 36 e 37, Figure 34 e 35), anche se la percentuale media di api che non rispondono è più alto nelle trattate che nei testimoni (Figura 35).

**Tabella 36** - Spiegazione nel testo.

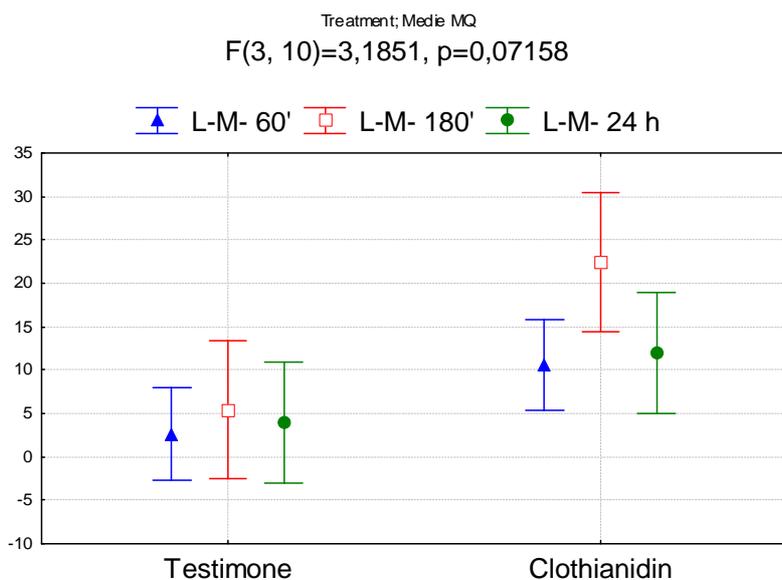
Effetto	Test di Significatività Multivariati (Polveri 2010 a in polveri 2010 a) Parametrizzazione sigma-ristretta Decomposizione ipotesi effettive					
	Test	Valore	F	Effetto gl	Errore gl	p
Intercetta	Wilks	0,247170	10,15266	3	10	0,002225
Treatment	Wilks	0,925006	0,27025	3	10	0,845462
Colony	Wilks	0,501564	3,31254	3	10	0,065440
Treatment*Colony	Wilks	0,747133	1,12817	3	10	0,383740

**Tabella 37** - Vedi testo.

Test di Significatività Multivariati (Polveri 2010 a in polveri 2010 a)						
Parametrizzazione sigma-ristretta						
Decomposizione ipotesi effettive						
Effetto	Test	Valore	F	Effetto gl	Errore gl	p
Intercetta	Wilks	0,268770	9,068836	3	10	0,003344
Treatment	Wilks	0,511373	3,185068	3	10	0,071571
Colony	Wilks	0,940376	0,211350	3	10	0,886261
Treatment*Colony	Wilks	0,754426	1,085035	3	10	0,399398

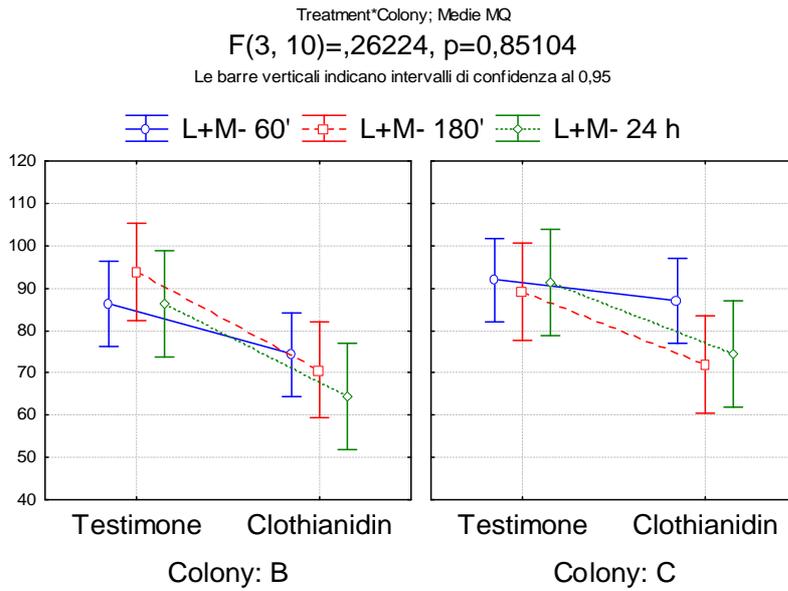


**Figura 34** - Spiegazione nel testo.

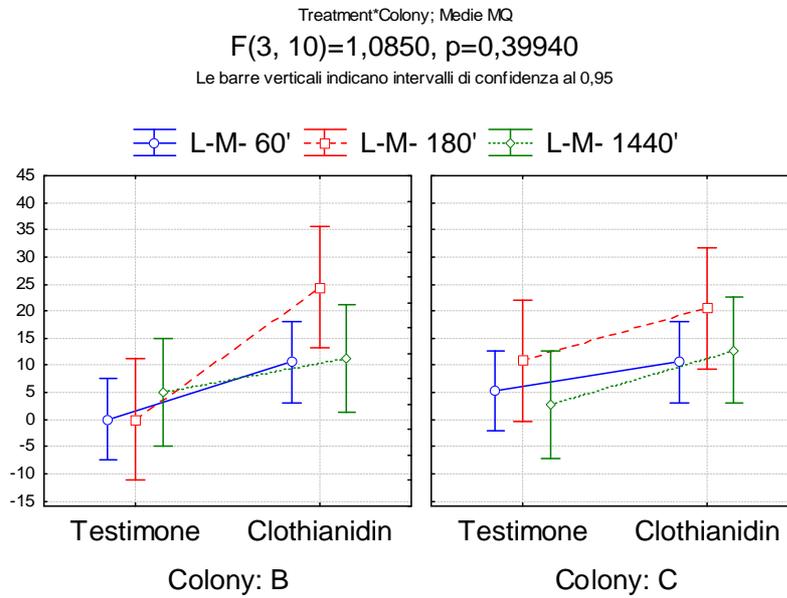


**Figura 35** - Spiegazione nel testo.

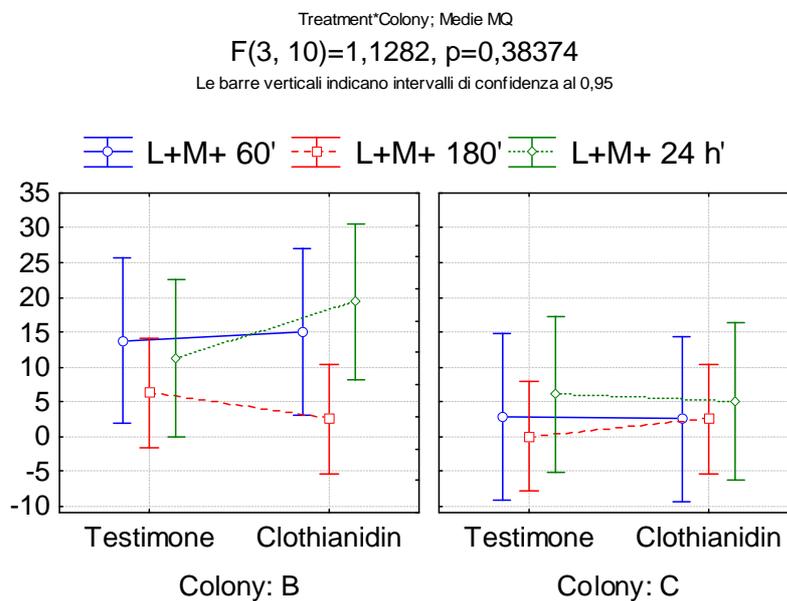
Non ci sono differenze significative tra i due alveari e non è significativa l'interazione tra trattamento e alveare per nessuna delle categorie di risposta considerate (Tabella 35; Figure 36, 37 e 38).



**Figura 36 -** Spiegazione nel testo.



**Figura 37 -** Spiegazione nel testo.



**Figura 38 -** Spiegazione nel testo.

### 6.5.2 PER-test: valutazione degli effetti di clothianidin (polveri contaminate) sulla capacità di riconoscimento del feromone della regina

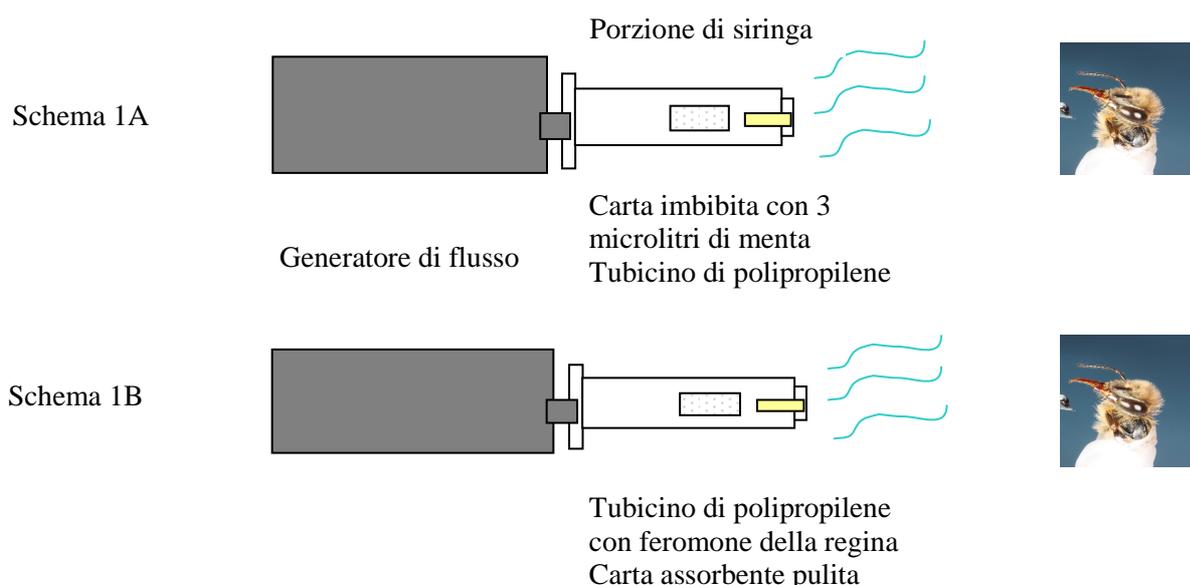
I materiali e i metodi utilizzati sono stati gli stessi descritti nella sperimentazione del punto 6.5.1.

**Odori e modalità di presentazione:** Qualche modifica rispetto alla prova precedente è stata apportata in ragione della natura degli odori utilizzati che ha necessitato una diversa modalità di presentazione.

Come odore punito è stato utilizzato un frammento di carta assorbente imbevuto con 3 microlitri di menta piperita (identico alla sperimentazione precedente) collocato in una siringa da 5 ml in cui era stato tolto lo stantuffo e allargato il foro (senza ago).

Come odore premiato è stata usata una miscela feromonica contenente le principali componenti del feromone della regina. Poiché la miscela feromonica utilizzata è costituita da molecole poco volatili, adsorbite su un sottile tubicino di propilene, al fine di rendere *visivamente uguali* le siringhe utilizzate per la presentazione degli odori:

- è stato aggiunto un tubetto di propilene senza odore nella siringa con la carta imbevuta di menta (schema 1 A)
- è stato aggiunto un pezzetto di carta assorbente senza odore nella siringa contenente il tubicino con la miscela feromonica (schema 1 B).



**Alveari, numeri e ripetizioni:** la sperimentazione è ancora in corso. Sono state completate due ripetizioni di 11 api ciascuna per l'alveare C. I dati sono stati analizzati statisticamente con ANOVA ad 1 via.

I risultati mostrano un effetto significativo del trattamento con clothianidin sulla capacità di riconoscere i componenti della miscela feromonica della regina. La percentuale di risposte pienamente corrette (estensione della ligula in presenza del feromone e non della menta, QP+M-) è infatti significativamente inferiore nelle api trattate rispetto ai testimoni non trattati a tutti gli intervalli considerati (Figura 39), mentre la percentuale di risposte parzialmente sbagliate (QP-M-) è significativamente maggiore nelle api trattate rispetto al testimone (Figura 41).

Cresce inoltre a 24 ore dal trattamento anche la percentuale di risposte sempre positive (QP+M+, Figura 40) e completamente sbagliate (QP-M+, Figura 42) confermando quanto emerso nel corso delle sperimentazioni del 2009 per il thiamethoxam.

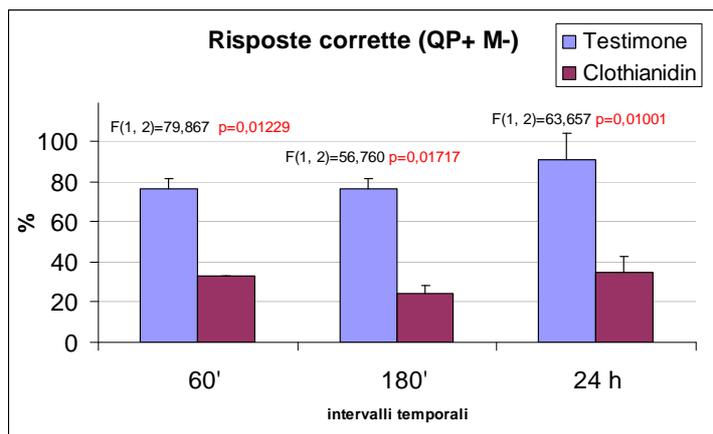


Figura 39 - Spiegazione nel testo.

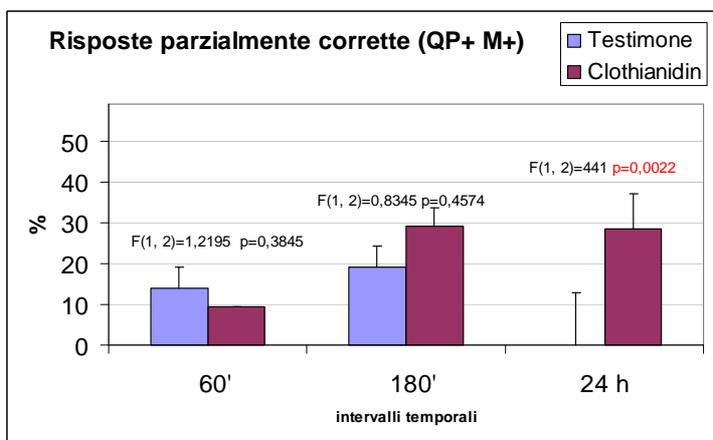


Figura 40 - Spiegazione nel testo.

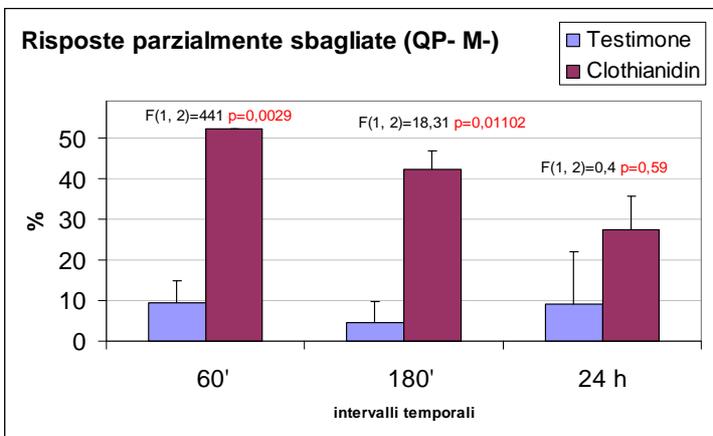


Figura 41 - Spiegazione nel testo.

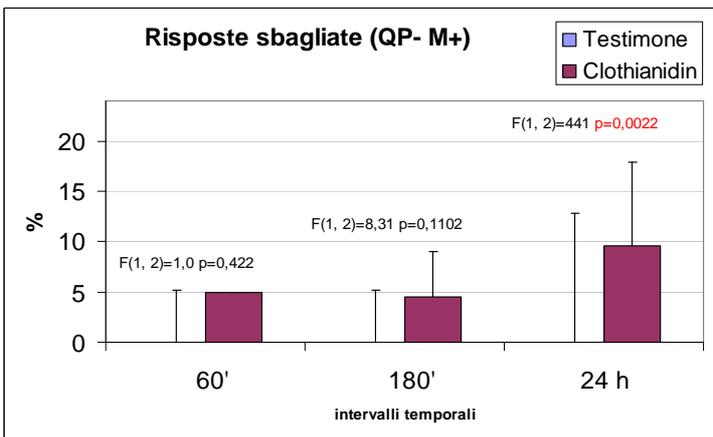


Figura 42 - Spiegazione nel testo.

La capacità di superare lo stress dell'immobilizzazione, la vitalità alla liberazione, la capacità di mettere in atto diversi tipi di schemi motori è stata valutata liberando le api in una gabbia di volo. I risultati riassunti in Figura 43 mostrano che non ci sono differenze degne di nota tra le api trattate e le api non trattate. Se da un lato questo tipo di controllo non è sufficiente a dimostrare che non ci siano effetti motori (essendo la gabbia di soli 40 x 30 x 30 cm) dall'altro ci conferma che le eventuali mancate risposte al *PER* non sono dovute all'impossibilità dell'ape di attuare schemi motori semplici come l'estensione della ligula in seguito all'immobilizzazione.

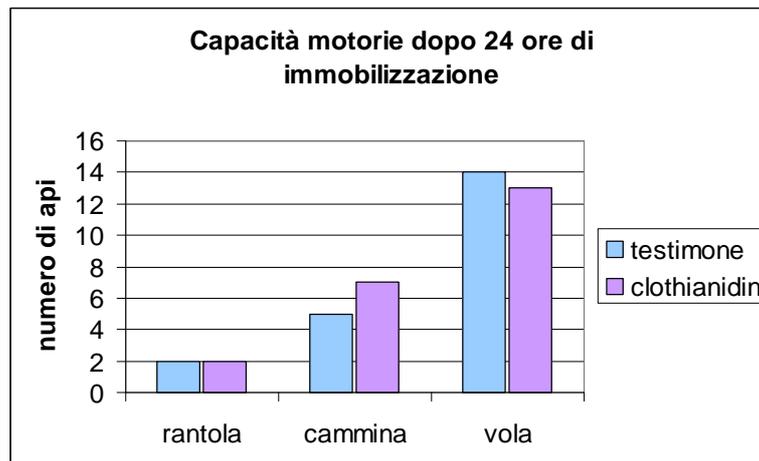


Figura 43 - Spiegazione nel testo.

### 6.5.3 Apprendimento e memoria dei colori ed orientamento spaziale in labirinto ad Y

**Addestramento spaziale e sui colori** - Un labirinto semplice ad Y è stato posto all'esterno, a circa 25 m dagli alveari (Figura 44). E' stato condotto un addestramento preliminare in gruppo a prelevare soluzione zuccherina al 50% nell'anticamera del labirinto da un alimentatore bianco (fase 1).

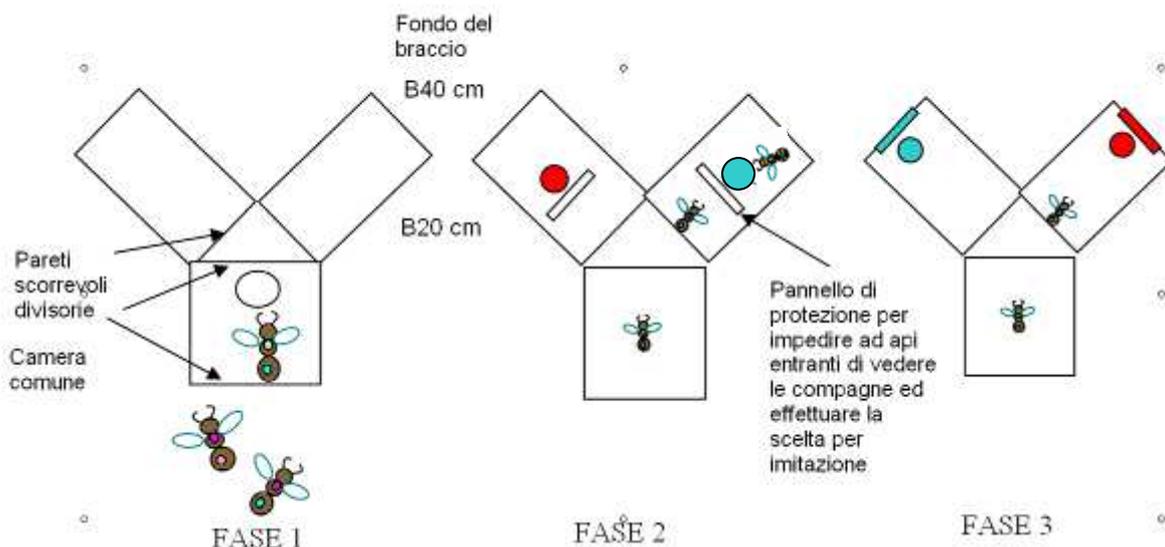


Figura 44 - Schema di addestramento.

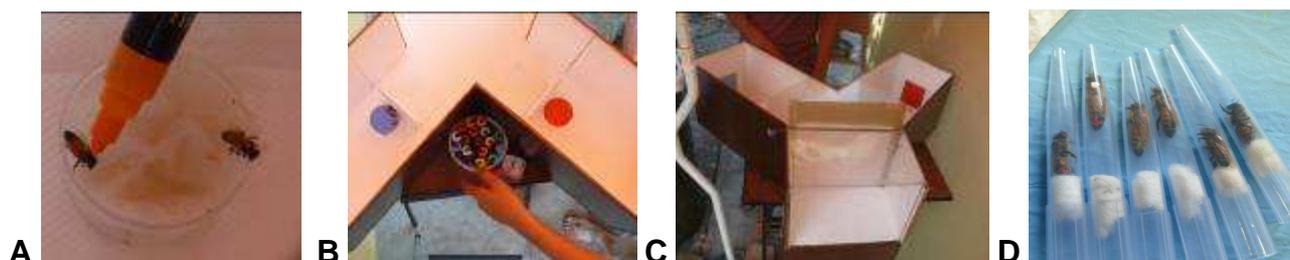
Un gruppo di 8-10 api è stato poi marcato con colori ad acqua (Uniposca) sul torace e sull'addome in modo che fossero singolarmente riconoscibili (Figura 45 A). Gli altri soggetti sono stati esclusi dalle successive fasi, mediante la cattura e il rilascio in una apposita gabbia. Nella fase 2 un cartoncino bianco è stato posto in verticale davanti all'alimentatore allo scopo di nascondere la vista alle api in arrivo (Figura 45B). L'addestramento è proseguito per i soli soggetti marcati all'interno della camera comune e poi dei due bracci su alimentatori con coperchio colorato: azzurro=premio (soluzione zuccherina 50%); rosso=punizione (soluzione salina saturata) (fase 3).

Ogni ape ha effettuato:

- 4 visite con alimentatori posti a metà dei due bracci (B20), con ostacolo verticale davanti all'alimentatore (Figura 45B);
- 4 visite al termine dei due bracci (B40), con ostacolo verticale;
- 4 visite al termine dei due bracci (B40), senza ostacolo verticale e con l'aggiunta di un quadrato dello stesso colore del coperchio dell'alimentatore nella parete verticale dietro l'alimentatore stesso (Figura 45C);

L'addestramento avveniva lasciando accesso ad un soggetto per volta, e la disposizione del colore premiato nell'uno o l'altro braccio avveniva secondo sequenza semirandom (non più di due visite successive sullo stesso lato), dividendo le api in due gruppi: uno con inizio dell'addestramento (prima ricompensa) a destra e uno a sinistra.

Ad ogni visita è stato annotato l'orario di arrivo del soggetto ed il lato di prima scelta.



**Figura 45** - A: marcatura; B: addestramento con colori protetti da barriera bianca verticale; C: addestramento finale con colore visibile per le api in arrivo, con cartoncino colorato sul fondo del braccio; D: trattamento delle api nel puntale.

**Cattura e trattamento** – La cattura avveniva durante l'ultima visita dell'addestramento, dopo che il soggetto si era posato sull'alimentatore corretto, ma prima che avesse iniziato ad alimentarsi:

- inserimento del soggetto in un puntale per pipette Gilson (200 microlitri), a cui era stata preventivamente tagliata la punta (Figura 45D);
- affamamento per 30 minuti;
- somministrazione del trattamento (vedi Tabella 38) per ingestione all'interno del puntale stesso; i testimoni hanno ricevuto la stessa quantità di soluzione zuccherina al 50%;
- mantenimento delle api nel puntale al buio per 1h.

**Tabella 38** - Principi attivi, dosi e modalità di somministrazione utilizzati nella sperimentazione.

Principio attivo	DL50 48 h	Dose saggiata	Proporzione rispetto a DL50 a 48 h (*)
Clothianidin (Dantop 50 WG®)	4 ng/ape	0,47 ng/ape	1/10
Imidacloprid (Confidor 200 SL®)	3,7 ng/ape	0,036 ng/ape	1/100
Thiamethoxam (Actara 25 WG®)	5 ng/ape	0,05 ng/ape	1/100
Fipronil puro in polvere	4,17 ng/ape	1,2 ng/ape	1/5

(\*) Dati disponibili su Footprint (<http://sitem.herts.ac.uk>). La proporzione rispetto alla DL50 per i diversi principi attivi è stata scelta sulla base di prove di mortalità dopo la somministrazione eseguite nel 2009.

**Test 60'**: ogni soggetto è stato liberato dopo 60 minuti dalla somministrazione in corrispondenza del labirinto Y; tutti i soggetti sono stati liberati contemporaneamente.

Gli alimentatori colorati (visibili alle api in arrivo, anche per la presenza del cartoncino di identico colore sulla parete di fondo del braccio del labirinto) non contenevano ricompensa/punizione.

Il test era costituito da due visite alternate ai bracci, nelle quali alla prima visita il colore premiato veniva posto nel lato di inizio dell'addestramento del soggetto.

L'accesso era consentito ad un'ape per volta, regolando l'entrata con barriere verticali scorrevoli posizionate all'ingresso del labirinto e della camera comune.

Per ogni ape è stata annotata l'ora di ogni visita, il primo braccio esplorato (destra o sinistra) e il comportamento nei confronti dell'alimentatore posto in fondo al braccio: 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 per l'accesso alla soluzione interna (non presente); A= atterra sull'alimentatore senza tentare di nutrirsi.

Le visite di ogni test sono *non correttive*: l'ape viene lasciata muovere nel primo braccio scelto e, indipendentemente dal colore presente, non le viene data la possibilità di muoversi anche nell'altro braccio ma viene fatta uscire subito dal labirinto sollevando il coperchio di plexiglas trasparente che lo ricopre.

Il ritorno di ogni soggetto al labirinto dopo la liberazione viene atteso per un massimo di 3h.

Al termine delle due visite del test, ogni individuo viene catturato e inserito assieme agli altri dello stesso gruppo (trattate/testimoni) in una gabbietta contenente un alimentatore, e mantenuti al buio a 26°C fino al giorno successivo.

**Test 24 h**: i soggetti dei due gruppi vengono liberati a 24 h dalla somministrazione del p.a. Il test è stato effettuato con le stesse modalità descritte per il Test a 60'.

I dati raccolti sono ancora in corso di elaborazione. I primi risultati dell'analisi statistica sono riportati nelle Figure 46 e 47.

In Figura 46 A-H sono riportate le percentuali di api che dopo la liberazione hanno scelto il braccio che presentava sul fondo l'alimentatore con il colore corretto (premiato con soluzione zuccherina durante l'addestramento).

Come si può vedere l'ANOVA ad una via eseguita per ogni principio attivo e per ogni test ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa della capacità di entrare nel lato corretto dopo 60 minuti dal trattamento per clothianidin ed imidacloprid, mentre per thiamethoxam e fipronil, a questo intervallo, le api trattate si sono orientate in maniera non diversa dal gruppo dei rispettivi testimoni non trattati.

Al controllo dopo 24 ore dal trattamento, tutti i principi attivi saggiati hanno determinato una riduzione significativa delle capacità di orientamento rispetto ai testimoni.

In Figura 47 sono riportate le percentuali di scelta delle api di fronte all'alimentatore che trovavano in fondo al braccio scelto. Le percentuali sono calcolate complessivamente sul totale delle api che costituivano il gruppo e non sono ancora state sottoposte ad analisi statistica.

Emerge tuttavia una tendenza generale ad una riduzione del comportamento di ricerca del cibo. Per imidacloprid, clothianidin e fipronil pare anche emergere una difficoltà a riconoscere il colore premiato, poiché sono state registrate percentuali non trascurabili di tentativi di nutrizione sull'alimentatore rosso, che conteneva, durante l'addestramento, la punizione (soluzione salina satura).

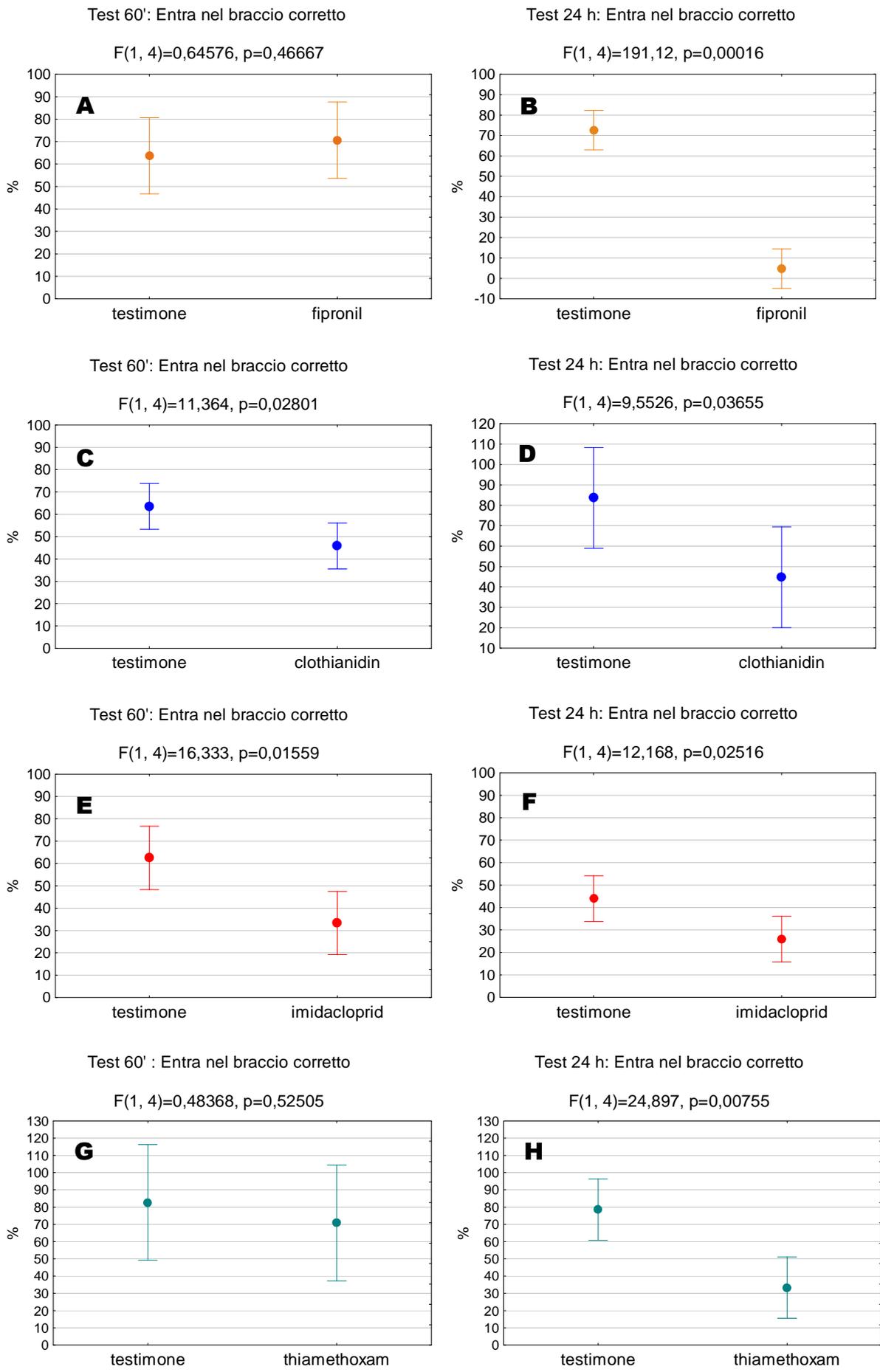
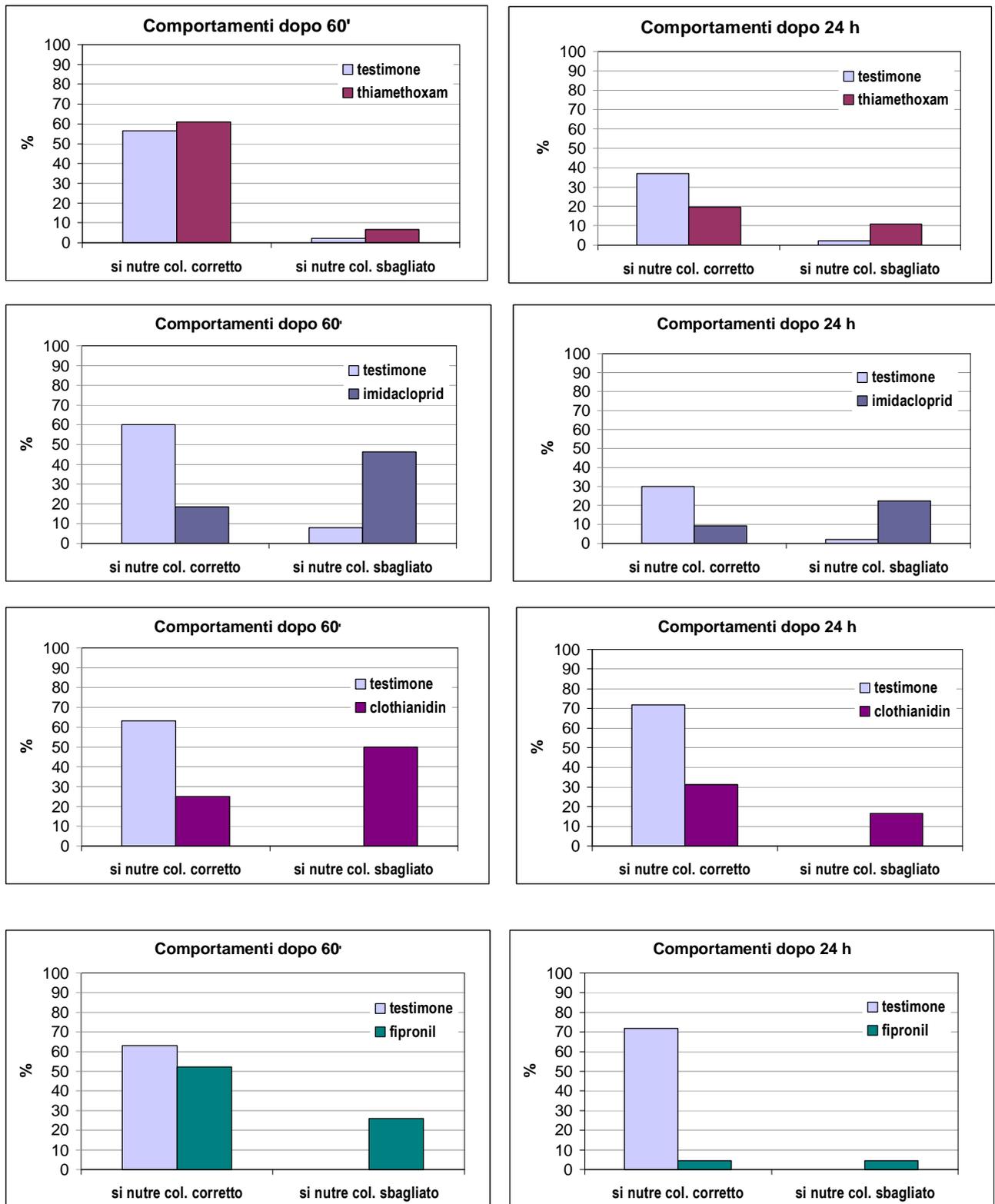


Figura 46 – Vedi testo.



**Figura 47** - Percentuale di api che hanno effettuato comportamenti di ricerca di cibo sull'alimentatore corretto e sbagliato (entrambi vuoti) durante i test a 60' e 24 h. Solo uno dei due si trovava in fondo al braccio. Alle api che lo raggiungevano veniva consentita una sola esplorazione, poi venivano fatte uscire dal tunnel.

#### **6.5.4 Conclusioni**

Le sperimentazioni sono ancora in corso, tuttavia i dati fin qui raccolti consentono di confermare i risultati delle sperimentazioni compiute nel corso del 2009.

Il protocollo applicato in queste sperimentazioni, disegnato per verificare gli effetti sub letali sulla memoria degli odori è stato in parte modificato rispetto a quello del 2009, poiché si incentra su una lunga fase di training (12 presentazioni) seguita da un test molto breve (1 prova), mentre il protocollo del 2009 prevedeva una fase di training breve (2 presentazioni) ed una fase di test lunga (10 prove), in cui l'ape veniva saggiata molte volte nello stesso intervallo temporale.

I due approcci hanno condotto, per quanto evidente sino ad ora, agli stessi risultati, che dimostrano una riduzione significativa della memoria a lungo termine (24 ore) di api contaminate con polveri contenenti dosi sub letali di clothianidin,

L'impiego, come odori premiati, del linalolo (componente della ghiandola di Nasonov, che ha una funzione di richiamo e di aggregazione) e della miscela feromonica della regina (che ha molteplici funzioni, ed è fondamentale per mantenere la coesione della colonia e per indurre ogni operaia a svolgere il proprio compito secondo la propria età) ha il significato di dimostrare che la perturbazione della percezione degli odori ha un forte impatto non solo per le bottinatrici e per la funzione di raccolta, ma può incidere sull'equilibrio della colonia, per le molteplici essenziali funzioni che la percezione dei feromoni ha nell'organizzazione delle relazioni tra compagne di nido e tra di esse, la regina e le larve, e quindi nel determinare la forza della famiglia.

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 dosi sub letali di tutti principi attivi contenuti nelle polveri ricadute a 5 m dal campo seminato sono in grado di compromettere dopo 24 ore la capacità di recarsi ad una fonte di cibo conosciuta e di riconoscere i colori associati alla ricompensa zuccherina; per imidacloprid e clothianidin tale effetto è visibile già dopo 60 minuti dal trattamento.

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

### **1. La rete di monitoraggio**

*Responsabile di scheda di ricerca*

Dr Franco Mutinelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie



*Collaboratori*

Dr Claudio Porrini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



### **2. Dispersione di polveri durante la semina del mais conciato e stima degli effetti sulle api**

*Responsabile di scheda di ricerca*

Dr Daniele Pochi

CRA - Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria



*Collaboratori:*

Dr. Marcello Biocca,

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



Dr Enzo Marinelli

CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



Dr.ssa Elisa Conte

CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



Dr Patrizio Pulcini

CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



### **3. 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



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

*Responsabile di scheda di ricerca*

Dr Mario Motto

Direttore CRA - Unità di ricerca per la maiscoltura



Dott.ssa Carlotta Balconi

CRA - Unità di ricerca per la maiscoltura



*Collaboratori esterni*

Dr Lorenzo Furlan

Veneto Agricoltura



## **5. Effetti della guttazione del mais sulle api**

*Responsabile della ricerca*

Prof. Vincenzo Girolami

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



Dr Claudio Porrini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



Dr Fabio Sgolastra

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



## **6. Effetti letali e subletali sulle api dei principi attivi usati nella concia delle sementi**

*Responsabile di scheda di ricerca*

Prof. Stefano Maini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



Dr Claudio Porrini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



Dr Fabio Sgolastra

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



*Collaboratori esterni*

Dr.ssa Bettina Maccagnani

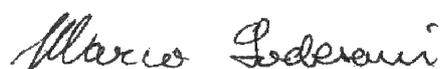
Centro Agricoltura Ambiente “Giorgio Nicoli”, Bologna

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Bettina Maccagnani". The script is cursive and fluid.

**Coordinamento del progetto APENET**

Dr. Marco Lodesani

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marco Lodesani". The script is cursive and fluid.