



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio

**RELAZIONE TRA LA CONCENTRAZIONE DI
NEONICOTINOIDI IN SOLUZIONI ZUCCHERINE E
L'INTOSSICAZIONE DELLE API**

Relatore

Prof. Andrea Tapparo

Correlatori

Dott. Edoardo Petrucco Toffolo

Prof. Vincenzo Girolami

Laureando

Michele Bertoncetto

Matricola n° 1062330

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

RIASSUNTO	V
SUMMARY	VII
1 INTRODUZIONE	1
1.1 APIS MELLIFERA.....	1
1.1.1 La comunicazione.....	3
1.2 RILEVANZA ECONOMICA DELL' IMPOLLINAZIONE ENTOMOGAMA E DELL' APE MELLIFERA.....	4
1.3 CCD (Colony Collapse Disorder).....	5
1.3.1 Varroa e Nosema apis.....	7
1.3.2 Neonicotinoidi.....	8
1.4 ESPOSIZIONE E PROVE IN LABORATORIO; IN SEMI-CAMPO E CAMPO SUI NEONICOTINOIDI.....	16
1.4.1 Vie di esposizione.....	16
1.4.2 Definizioni degli indici di tossicità e degli effetti acuti e subletali.....	16
1.4.3 Prove in laboratorio, in semi-campo e in campo sui neonicotinoidi.....	19
2. SCOPI DELLA PRESENTE TESI	23
3. MATERIALI E METODI	25
3.1 LUOGO, TIPOLOGIA DI API E GESTIONE DELL' ALVEARE.....	25
3.2 DESCRIZIONE ALIMENTATORI.....	26
3.3 DESCRIZIONE DEGLI SCHEMI SPERIMENTALI.....	27
3.4 DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA DI ATTIVAZIONE E GESTIONE DEGLI ALIMENTATORI.....	29
3.5 LA MARCATURA DI MASSA.....	30
3.6 METODO DI COSTRUZIONE DEI GRAFICI.....	31
3.6.1 Raccolta e gestione dati.....	32
3.6.2 Precisazioni sull'analisi statistica.....	32
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	33
4.1 Prove preliminari di marcatura con 80 e 160 ppb nell'autunno 2014.....	33
4.2 Prove con concentrazione di insetticida di 20 ppb.....	36
4.3 PROVE CON CONCENTRAZIONE DI INSETTICIDA DI 40 ppb.....	39
4.3.1 Prove con concentrazione di insetticida di 40 ppb autunno del 2014.....	39
4.3.2 Prove con concentrazione di insetticida di 40 ppb estate del 2015.....	42
4.4 PROVE CON CONCENTRAZIONE DI INSETTICIDA DI 80 ppb.....	53
4.4.1 Prove con concentrazione di insetticida di 80 ppb nell'autunno del 2014.....	53
4.4.2 Prove con concentrazione di insetticida di 80 ppb estate del 2015.....	56

4.5 ANDAMENTO DEL NUMERO DI API NELLE FASI DELLA SPERIMENTAZIONE.	65
4.5.1 Prove con concentrazione di insetticida di 20 ppb.....	66
4.5.2 Prove con concentrazione di insetticida di 40 ppb. estate del 2015.....	67
4.5.3 Prova con concentrazione di insetticida di 80 ppb. autunno del 2014.....	70
4.5.4 Prove con concentrazione di insetticida di 80 ppb. estate del 2015.....	70
5. CONCLUSIONI.....	73
BIBLIOGRAFIA	77

RIASSUNTO

Il temporaneo bando europeo dei neonicotinoidi ha suggerito di approfondire le cause della moria delle api. In particolare l'attenzione è stata posta alla relazione tra esposizione delle api a basse concentrazioni nell'ordine dei ppb di insetticidi neonicotinoidi quale causa delle morie degli alveari.

Il presente studio si pone l'obiettivo di comprendere in modo più preciso il reale rischio di esposizione di *Apis mellifera* a concentrazioni variabili tra 20 e 80 ppb di insetticida neonicotinoide Clothianidin in soluzione zuccherina. A differenza di quanto riportato in letteratura, ove si considera un'unica assunzione di insetticida, alle api è stata offerta la possibilità di accedere ripetutamente agli alimentatori contenenti diverse concentrazioni di neonicotinoide, simulando attraverso prove di campo le stesse condizioni riscontrabili in natura.

Per valutare il numero di api presenti, gli alimentatori erano costituiti da scatole di plastica forate e sovrapposte, in modo che le api bevessero tutte su un unico piano verticale; in tal modo una fotografia permetteva di registrare l'esatto numero di api presenti, e di riconoscere quelle marcate da quelle non marcate. In questa tesi riveste grande importanza l'innovativo metodo di marcatura di massa delle api bottinatrici, che ha permesso di comprendere meglio gli effetti dovuti al Clothianidin, seguendo il comportamento di gruppi numerosi di api riconoscibili.

Per mezzo della marcatura si è dimostrato che le api restano fedeli al sito anche nei giorni seguenti al trattamento, e inoltre durante le prove le bottinatrici non si spostano dalla postazione trattata a quella del testimone, tranne per una piccola percentuale, dimostrando un'alta fedeltà alla postazione. La marcatura ha permesso di individuare e distinguere il comportamento delle api non marcate (di ignota provenienza) che si sono dimostrate minoritarie nella maggior parte delle prove.

E' stato confermato che l'abbandono delle api bottinatrici dei siti avvelenati avviene in tempi inversamente proporzionali alla concentrazione dell'insetticida. A tutte le concentrazioni testate (20-40-80 ppb) si assiste il giorno stesso ad un calo delle api presenti nelle postazioni trattate durante e successivamente al trattamento, meno consistente a 20 ppb, veloce e marcato a 40 ppb e a 80 ppb in molti casi si assiste ad un rapido abbandono quasi totale della postazione.

La fase di post-trattamento, avvenuta il giorno successivo, sia per la postazione trattata che per quella del testimone, fornisce importanti informazioni riguardo la consistenza del ritorno delle api trattate, che risulta totale a 20 ppb e parziale a 40 e 80 ppb. A 80 ppb dato il ritorno solo parziale, si ipotizza che le api, che non fanno ritorno alla postazione e non sono state individuate morte nei pressi dell'alveare, vaghino stordite trovando la morte lontano dall'alveare.

Dai risultati emerge che le prove svolte a diverse distanze non sembrano evidenziare differenze nel comportamento delle api, mentre il periodo dell'anno in cui si svolgono le prove sembra avere un effetto sui tempi di risposta alla presenza dell'insetticida. Nel periodo autunnale l'abbandono delle postazioni

trattate è più veloce rispetto quello che avviene in estate; le api autunnali sembrano essere quindi più sensibili all'insetticida.

Un aspetto rilevante delle indagini sperimentali è l'osservazione del ritorno delle api bottinatrici una volta ripristinati gli alimentatori non contenenti insetticida. Marcando le api, si è dimostrato che sono interessate al ritorno le stesse api che avevano assunto l'insetticida. Tale osservazione ha permesso di affermare che le api non subiscono effetti di perdita di memoria o disorientamento, almeno fino alla dose di 40 ppb.

SUMMARY

The temporary European ban of neonicotinoids has led to in-depth analysis of the causes of bees' death.

In particular, attention has been paid to the relationship between bee exposure to sub-lethal concentrations of neonicotinoid insecticides as a cause of death in bee hives.

This work has as an objective that of understanding in a more precise way the real risk of exposure of *Apis Mellifera* to concentrations of neonicotinoid insecticides in sugary solutions in concentrations between 20 and 120 ppb. Differently from what can be found in literature, where a single ingestion of insecticide is considered, bees have been given the possibility to have repeated access to feeders containing different concentrations of neonicotinoids. Similarly to what happens on treated flowers, the reported concentrations are regularly inferior to those that, in nature, are commonly defined as "sub-lethal doses". To appreciate the effective number of bees that were present, the feeders were made of perforated and overlapping plastic boxes, so that all of the bees would drink on a single vertical surface. This way, a photo would be enough to determine the exact number of bees.

A method of mass marking of foragers bees has been carried out, bees were directly marked with a drop of dye on the thorax during feeding on the vertical surface of feeders.

Marking more than hundred individuals in one hour allowed us to demonstrate that the foragers bees, after the abandonment the feeders with insecticide, stay long without collect and they don't move to the feeders with the only sugar solution.

The forager bees, that visit again the feeders after the renovation of the only sugar solution without insecticide, were the same that visit the feeders in the pre-treatments phase, therefore the foragers bees, that assume the insecticide, could perceive the toxicity avoiding forward contact with insecticide.

The number of marked bees come back in the following day on the feeders with the only sugar solution was inversely proportional to insecticide concentration present in the sugar solution.

A method of mass marking of forager bees has been carried out, bees were directly marked with a drop of dye on the thorax during feeding on the vertical surface of the feeders.

The marking of more than hundred bees in one hour allowed us to demonstrate that the forager bees, after the abandonment the feeders with insecticide, stayed long without collect and they did not move to the feeders with only sugar solution.

The forager bees, that visited again the feeders after the renovation of sugar solution without insecticide, were the same that visited the feeders in the pre-treatment phase. Therefore, the forager bees, that assume the insecticide, could perceive the toxicity avoiding further ingestion of insecticide.

The following day the marked bees, that visited back the feeders on sugar solution without insecticide, were in number inversely proportional to insecticide concentration present in the sugar solution the previous day.

1 INTRODUZIONE

1.1 APIS MELLIFERA

Apis mellifera, comunemente chiamata ape domestica, è un insetto che appartiene all'ordine degli Imenotteri, famiglia degli apidi, al genere *Apis*. *A. mellifera* è un insetto sociale che vive in colonie numerose; in un alveare, durante la stagione estiva, in media ci sono circa 60.000 api. Questa specie non è di origine europea, il carattere perenne delle colonie di Ape domestica fa supporre che essa provenga da regioni più calde, quasi certamente dall'Asia sudorientale (Chinery. M. 1998. Guida degli insetti d'Europa). È possibile riconoscere tre caste: la regina, i fuchi e le operaie. Solo l'ape regina ha i caratteri sessuali femminili completamente sviluppati e rappresenta l'unica femmina fertile dell'alveare, la regina non partecipa ai lavori del nido, o alla raccolta del cibo, e non possiede il sacco del polline, né le ghiandole della cera per costruire le cellette, e ha una lingua più corta rispetto a quella delle operaie. La regina può vivere anche 4 o 5 anni, non è in grado di alimentarsi da sola ed è accudita dalle api operaie che la nutrono esclusivamente con la pappa reale, alimento chiave per l'alveare. La pappa reale è prodotta da alcune ghiandole presenti nelle api operaie, è responsabile dello sviluppo di un'ape femmina in regina o in operaia. La quasi totalità di individui in un alveare è rappresentato dalle operaie: queste sono di minori dimensioni rispetto alla regina ed inoltre sono sterili, presentando degli organi genitali involuti. A completare la colonia vi sono i maschi, o fuchi. Questi non hanno strutture che li rendano adatti alla raccolta del nettare, polline o propoli, e non sono in grado di secernere pappa reale o cera. Il loro sviluppo dura 24 giorni e hanno principalmente il compito di fecondare le regine vergini. I fuchi che riescono ad accoppiarsi con successo subiscono la mutilazione dei genitali e muoiono. Una regina nel volo nuziale può accoppiarsi con 5-25 fuchi di alveari diversi e quindi ricevere una scorta di spermatozoi, che conserverà vitali per tutta la sua carriera riproduttiva (3-4 anni in genere). Ma il compito dei fuchi non si limita a fecondare le regine vergini fuori dall'alveare. Si è scoperto che essi partecipano al riscaldamento della colonia ed alcuni processi di maturazione del miele, nonché alla diffusione di segnali chimici (feromoni). Dunque, oltre al compito di fecondare la regina, i fuchi non sono da ritenersi dei "parassiti" come spesso vengono descritti ma rivestono un ruolo importante.

Il compito delle operaie è quello di lavorare per l'alveare: le giovani operaie tendono ad essere casalinghe se occupano prevalentemente di attività all'interno del nido, come la cura delle larve e la pulizia delle cellette, mentre le operaie più vecchie difendono l'arnia e si preoccupano di raccogliere il cibo per l'intero alveare. Le operaie, che vengono in questo caso chiamate bottinatrici, producono il cibo visitando i fiori, sui quali alcune raccolgono goccioline di nettare ad alta concentrazione zuccherina. Altre operaie, dato che anche le

proteine sono necessarie allo sviluppo delle larve, si dedicano al polline; l'acqua viene raccolta per mantenere costante l'umidità all'interno dell'alveare ma anche per abbassarne la temperatura.

Nelle api la differenziazione delle caste avviene, quindi, attraverso un meccanismo trofogenico, cioè è determinata dalla quantità e dalla qualità del cibo assunto dalle larve. La raccolta del cibo da parte delle bottinatrici non costituisce un saccheggio, può anzi essere considerato un fenomeno di mutuo scambio. Le api, infatti, svolgono un servizio alle piante favorendo, con i voli da un fiore all'altro, grazie al polline che aderisce al loro corpo, l'impollinazione (Frisch, 1976).

Come tutti gli insetti, le api hanno il corpo suddiviso in tre parti ben distinte: capo, torace e addome.

Esternamente il loro corpo è protetto da un esoscheletro che gli conferisce rigidità. Le varie parti sono articolate fra loro mediante membrane elastiche in cui lo spessore della cuticola, che forma l'esoscheletro, si assottiglia e diventa maggiormente flessibile.

Il capo reca gli organi della vista, le antenne e l'apparato boccale lambente succhiante. La testa dell'ape operaia è grossolanamente triangolare, agli angoli superiori si trovano gli occhi composti, due, di grossi dimensioni. Sono costituiti da migliaia di piccoli elementi che permettono la formazione dell'immagine dell'ambiente circostante. Oltre gli occhi composti l'ape possiede tre occhi semplici o ocelli, disposti sulla fronte, la loro funzione sembra sia vedere gli oggetti molto vicini. L'angolo visuale delle api è vicino a 360°, vedono male i dettagli ma distinguono bene le forme. La percezione dei colori da parte delle api è diversa rispetto a quella umana. Il campo di visione è contratto verso il rosso e dilatato verso l'ultravioletto, invisibile all'occhio umano, mentre per le api è un vero e proprio colore.

Le antenne sono di forma cilindrica, ripiegate a L, con la base inserita entro due fossette membranose. Osservando le antenne con un microscopio a scansione elettronica appaiono migliaia di sensilli che possono avere una funzione tattile, olfattiva o possono costituire dei termocettori e igrocettori. Le api ripuliscono le antenne dal pulviscolo atmosferico affinché la percezione sensitiva sia ottimale.

Il torace è attraversato dal tubo digerente e contiene i sacchi aerei e i muscoli alari. L'addome è formato da segmenti mobili detti uriti ed è privo di appendici; contiene la parte terminale del tubo digerente e altri organi, quali l'apparato linfatico, e l'ovidepositore che nelle api operaie è trasformato in pungiglione.

L'apparato boccale delle api è di tipo lambente succhiante ed è costituito da diverse parti ognuna con una specifica funzione. Il labbro superiore, poco sclerificato, ha la funzione di coprire e proteggere l'apparato stesso, mentre le due mandibole a forma di pinze, con bordo arrotondato e privo di dentellature, sono adatte alla lavorazione della cera e alla raccolta della propoli, ma incapaci di lacerare superfici continue come le bucce sane dei frutti. Le due mascelle molto mobili, sono costituite da parti ben distinte tra cui il cardine, lo stipite, la galea e da un piccolo palpo: la loro funzione principale è quella di formare assieme ad altre appendici, un canale di suzione degli alimenti liquidi. A completare l'apparato boccale vi è il labbro inferiore, originato dalla fusione di un secondo paio di mascelle. Il labbro inferiore è formato da vari articoli, in parte impari, quali postmento, pre-mento e ligula e in parte pari, quali paraglosse e palpi boccali.

Allo stato di riposo e in volo l'apparato boccale viene mantenuto ripiegato sotto il capo; al momento della raccolta di sostanze liquide, come nettare, melata o acqua, l'ape stende le appendici formando una specie di proboscide, costituita dalla ligula, che a riposo si trova avvolta nella parte prossimale delle galee e dei palpi labiali. I liquidi vengono poi aspirati grazie ad un organo presente nella faringe che funziona come un pompa.

Per solubilizzare sostanze solide, l'ape dapprima emette della saliva, attraverso il canale collocato nella ligula, poi aspira le sostanze disciolte.

1.1.1 La comunicazione

Il comportamento sociale è sicuramente una delle caratteristiche che ha contribuito a rendere l'ape uno degli organismi più studiati. L'entomologo statunitense William Morton Wheeler ha definito l'alveare un super organismo in cui l'intera famiglia viene vista come un unico individuo superiore. Si tratta di un insieme di organismi che non possono vivere, prosperare o moltiplicarsi se non in gruppo.

La riproduzione del superorganismo è la sciamatura: la colonia di api si divide ed una parte consistente delle api operaie, assieme alla vecchia ape regina, abbandona l'alveare per fondare una nuova colonia. Lo scheletro è dato dai favi, all'interno dei quali vengono immagazzinate le scorte alimentari della colonia (miele e polline) e allevate le giovani api. Le api operaie rappresentano i muscoli e gli organi legati al sostentamento della colonia, mentre l'ape regina ed i fuchi ne costituiscono l'apparato riproduttivo.

Il coordinamento delle attività di tutti questi individui appartenenti alle diverse caste, l'individuazione delle necessità immediate e delle priorità per lo sviluppo e la sopravvivenza della colonia derivano da un complesso ma efficiente sistema di comunicazione.

Nelle api la comunicazione può avvenire sia attraverso suoni emessi mediante la contrazione ritmica dei muscoli alari sia attraverso dei segnali chimici, i feromoni. Sono stati isolati numerosi feromoni emessi dalla regina, dalle api operaie, dai fuchi e dalla covata. La regina può emettere fino a 32 tipi di feromoni, tra questi troviamo il feromone reale emesso all'interno dell'arnia, e i feromoni sessuali e di sciamatura emessi invece all'esterno dell'arnia. Il feromone reale prodotto dalle ghiandole mandibolari della regina assicura la coesione della colonia, impedisce la costruzione di altre celle reali e stabilizza la corte delle operaie che accompagnano la regina. Le api cambiano comportamento solo nel momento in cui percepiscono l'assenza del feromone. Le api operaie emettono feromoni di richiamo e traccianti, mentre quelli emessi dalla covata stimolano la raccolta del polline e del nettare e inibiscono gli ovari delle operaie, infine i feromoni emessi dai fuchi stimolano l'attività delle operaie (Istituto zooprofilattico sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana 2013).

L'aspetto della comunicazione delle api che ha una rilevanza maggiore in questa tesi, è la danza la quale equivale a un vero e proprio linguaggio gestuale utilizzato dalle api bottinatrici per scambiare informazioni

sulla presenza e qualità delle fonti alimentari. Molte delle osservazioni e interpretazioni sulla danza delle api risalgono agli studi svolti dall'etologo Karl von Frisch.

Le api si orientano principalmente con il Sole di cui sono in grado di compensare gli spostamenti giornalieri, usandolo come una sorta di bussola astronomica. Dopo aver individuato una sorgente di cibo, fiori ricchi di polline e di nettare, le bottinatrici rientrano nell'alveare e compiono sui favi verticali delle evoluzioni che attirano l'attenzione delle altre operaie. Se la fonte trofica è nei pressi dell'alveare, l'informazione viene comunicata attraverso una "danza in tondo", in cui l'operaia scambia nettare con le compagne e compie giri molto stretti cambiando frequentemente verso. La qualità del nettare o del polline proveniente dalla sorgente in questione è indicata dal vigore della danza. Se il cibo è più lontano, l'ape passa dalla "danza in tondo" alla "danza a otto" chiamata anche danza oscillante, durante la quale l'addome compie ondulazioni laterali mentre l'ape percorre la figura di un otto cioè due semicerchi uniti da un tratto rettilineo.

Il percorso rettilineo indica alle compagne la direzione della fonte trofica. Se questa si trova sulla linea che collega l'alveare al punto a terra del Sole, il tratto rettilineo risulterà perpendicolare al suolo e quindi nella direzione della gravità, e l'ape danzerà con il capo sempre puntato verso l'alto. Se è l'alveare a trovarsi tra la fonte trofica e il punto a terra del Sole, il coreogramma avrà la stessa configurazione, ma l'ape danzerà con la testa puntata verso il basso. Se infine la fonte trofica si trova a est e ovest dell'alveare, il tratto rettilineo sarà obliquo rispetto alla direzione della gravità, formando con essa un angolo pari a quello formato dalle due linee immaginarie che vanno dall'alveare alla fonte trofica e dall'alveare al punto a terra del Sole. Per quanto riguarda la distanza della fonte trofica, sin dal principio von Frisch aveva notato che il ritmo della danza si fa tanto più rapido quanto più questa è vicina. Le caratteristiche della danza alle quali è associata un'informazione includono la lunghezza della parte rettilinea, misurata dal numero di celle del favo attraversate; la frequenza della danza, numero di danze per unità di tempo; la durata delle oscillazioni dell'addome e il suono prodotto dal tratto rettilineo dalla figura a otto e l'orientamento di questo tratto rettilineo rispetto alla verticale. Pertanto con un goniometro e un cronometro è possibile decodificare il messaggio della bottinatrice, individuando il luogo indicato dalla danza.

1.2 RILEVANZA ECONOMICA DELL'IMPOLLINAZIONE ENTOMOGAMA E DELL'APE MELLIFERA

L'apicoltura rappresenta un particolare comparto, fra i complessi del settore agricolo, in cui le funzioni principali sono rappresentate dall'attività economica e dallo sviluppo rurale, dalla produzione di miele e di altri prodotti dell'alveare. La moria di api che si è verificata in questi ultimi anni in tutto il mondo ha determinato un notevole allarme sia nell'ambiente agricolo che nell'opinione pubblica. È stato stimato che circa il 35 per cento del cibo che l'uomo consuma dipende direttamente, attraverso l'impollinazione di

frutta o colture vegetali in generale, o indirettamente, tramite l'impollinazione di campi coltivati a foraggio per il bestiame, dall'attività svolta dalle api.

Il settore in Italia conta 1,2 milioni di alveari per un giro d'affari di 60 milioni di euro. In Italia gli apicoltori sono 50000 di cui 7500 professionisti che totalizzano un fatturato di 25 milioni di euro. A ciò si aggiunge il fatto che le api concorrono per l'80 per cento al lavoro di impollinazione e l'alimentazione umana dipende per un terzo da coltivazioni impollinate attraverso il lavoro degli insetti (riso e grano, le specie più consumate al mondo, sono impollinate dal vento) (Besomi, 2014).. In tutto il mondo il valore economico totale dell'impollinazione svolta dalle api è stato stimato pari a 153 miliardi di euro (Moritz et al., 2010). Da un recente studio dell'ESFA (Autorità europea per la sicurezza alimentare) pubblicato nel Marzo 2014, le api, soprattutto quelle allevate, svolgono un ruolo importante nell'impollinazione di una vasta gamma di colture e piante selvatiche. Oltre che altri imenotteri alcuni lepidotteri, ditteri e coleotteri il ruolo delle api nell'impollinazione rimane decisivo come evidenziato da più fonti. Oltre a contribuire all'impollinazione, le api forniscono anche alimenti e servizi alimentari: miele, polline, larve, cera per la lavorazione di alimenti, propoli nella tecnologia alimentare e pappa reale come integratore alimentare e ingrediente di alimenti.

Al fine di preservare l'importante compito svolto dagli insetti impollinatori risulta fondamentale indirizzarsi verso un tipo di agricoltura più consapevole e sostenibile rispetto alle pratiche convenzionali. Il dibattito attuale su questo argomento è molto inteso, come viene dimostrato dall'elevato numero di pubblicazioni (Bengtsoon et al., 2005); (Dobermann, 2012); (Tuck et al., 2014).

Alcuni studi hanno evidenziato come una maggiore diversità del paesaggio hanno un effetto positivo sugli insetti impollinatori, dalle farfalle alle api, dai bombi ai coleotteri (Belfrage, 2005). L'effetto positivo, inoltre si può manifestare anche in campi vicini gestiti in modo convenzionale e nelle aree semi-naturali (Holzschus et al., 2007, Gabriel et al., 2007). La celebre frase attribuita a Einstein "se le api scomparissero dalla Terra, per l'uomo non resterebbero che 4 anni di vita" può essere vista come una pura provocazione allarmistica, ma può far riflettere sull'importanza di porre maggiore attenzione sulla salvaguardia di questi importanti insetti. La rarefazione del patrimonio apistico porterebbe ad un elevato danno economico e ambientale.

1.3 CCD (Colony Collapse Disorder)

Il Colony Collapse Disorder (CCD; sindrome dello spopolamento degli alveari) è un fenomeno caratterizzato dalla scomparsa improvvisa di un numero elevato di api adulte dalla colonia, che può portare anche all'estinzione dell'intero alveare. Alla fine del 2006 il fenomeno è stato descritto per la prima volta in Nord America. Numerosi episodi di morie sono stati riportati anche in diversi altri stati europei Belgio, Francia, Grecia, Spagna e anche in Medio Oriente e in Giappone. Il CCD ha portato in alcune aree a morie dal 30% al 90% degli alveari. La situazione tipica all'interno dell'alveare, in caso di CCD, è la presenza della regina, di

poche api operaie e covata opercolata con scorte di cibo abbondanti (polline e miele); da questa descrizione è evidente che la mancanza di api adulte non possa essere attribuita alla carenza o mancanza di cibo ma ad altre cause. Uno dei sintomi più singolari è la totale o quasi assenza di api morte all'interno o nei pressi dell'alveare. Molti apicoltori hanno descritto successivamente una situazione diversa che in molti casi ha come conseguenza la morte dell'intera colonia; pur trattandosi di alveari in buona salute, è stato osservato un consistente accumulo di api morte nei pressi dell'alveare, fenomeno descritto solitamente nel periodo primaverile. Nel primo caso il sintomo indica che la morte avveniva durante l'attività di bottinaggio in campo; più complesso era comprendere il secondo, con l'accumulo di migliaia di api nei pressi dell'alveare in un periodo molto breve (morte primaverili senza evidenti segni della presenza di parassiti).

In passato sono state segnalate morie di api dovute a condizioni climatiche particolari, infestazioni di peste, esposizioni ad insetticidi; la CCD differisce da queste morie per l'intensità e la rapidità con la quale si verifica, inoltre questo fenomeno può ripetersi per più anni consecutivi nella stessa area. Sono state sviluppate diverse ipotesi su quale possa essere il fattore scatenante, tra questi sono stati indicati degli organismi parassiti come *Varroa destructor*, il diffondersi di alcuni virus (paralisi acuta da virus Israeliano (IAPV), virus della deformazione dell'ala (DWV), o di alcuni funghi (es. *Nosema apis*, *Ascosphaera apis*). Un'altra minaccia che incombe sull'apicoltura europea ed italiana è quella della vespa velutina o calabrone asiatico (*Vespa velutina* Lepeletier), importato accidentalmente dalla Cina, in grado di predare le api e di distruggere gli alveari e di arrecare danno a tutta l'entomofauna utile. Negli ultimi anni il calabrone asiatico è stato in grado di colonizzare quasi tutto l'intero territorio francese, con la scomparsa del 50 % degli alveari, arrivando a varcare i confini con il Belgio, la Spagna, il Portogallo e l'Italia dove è stata ufficialmente segnalata nella provincia di Imperia e Cuneo. Alcuni studi hanno ipotizzato invece che l'utilizzo di organismi geneticamente modificati in agricoltura o l'aumento delle radiazioni elettromagnetiche possano avere un impatto negativo sulle api; infine, uno dei fattori che più spesso viene chiamato in causa è l'esposizione multipla a prodotti per la protezione delle piante (fitosanitari).

Alcuni studi hanno indicato una probabile azione sinergica tra i diversi fattori elencati precedentemente (Mullin et al., 2010; Cox-foster et al., 2007; Johnson et al., 2010, Van Engelsdorp et al., 2009; Nazzi et al., 2012; Pettis et al., 2012). È stato dimostrato come piccole quantità di insetticidi neonicotinoidi (assunti singolarmente o combinati con altri pesticidi o patogeni) possano causare disorientamento, difficoltà di comunicazione, compromissione della capacità di apprendimento e di memoria fino alla riduzione della longevità e interferenze sul ciclo della covata. Nel tempo si è rafforzata l'ipotesi che, tra i diversi fattori, i neonicotinoidi potessero avere un ruolo fondamentale in questo intreccio di molteplici cause (Jeroen P van der Sluijs et al., 2013) ed in particolare che esistesse una relazione fra le semine primaverili di mais impieganti sementi "conciate" con i principi insetticidi neonicotinoidi e le repentine morie (morte primaverili) negli alveari circostanti (Greatti et al., 2006; Marzaro et al., 2011; Girolami et al., 2012). Lo scenario che si va tracciando nella comprensione della sindrome, è un'origine multifattoriale dei fenomeni

legati alla mortalità delle api, dove i vari fattori di stress, primi fra tutti Varroa e virus, agiscono contemporaneamente sulla vita delle api.

1.3.1 Varroa e Nosema apis

La Varroa è un parassita che causa una malattia infettiva, la Varroasi o Varroatosi, con danni diretti e indiretti a larve e adulti di ape, appartiene al gruppo sistematico degli acari alla famiglia Varroidae ed il suo nome scientifico è *Varroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000).

Questo parassita possiede un fortissimo dimorfismo sessuale; la femmina adulta, ovale ed appiattita e di colore rosso-brunastro, può essere facilmente osservata ad occhio nudo. Il maschio è notevolmente più piccolo e di colore bianco, difficilmente visibile ad occhio nudo. *V. destructor* ha adattato sia il proprio corpo che la propria biologia a quelle delle api domestiche. In particolare, il corpo della femmina, che è l'unico stadio libero di muoversi all'interno dell'alveare, è appiattito, leggermente ricurvo ventralmente, ricco di peli e spinette che facilitano l'attacco al corpo dell'ape (Fontana et al., 2013).

Attualmente sono note 4 specie di Varroa, tutte associate originariamente a specie di api diffuse in oriente, soprattutto all'asiatica *Apis cerana*. *Varroa jacobsoni* ha effetti minori sulle colonie del suo ospite naturale *Apis cerana*, almeno in parte perché l'acaro può riprodursi solo quando è presente una covata maschile. In contrasto *Varroa destructor* in grado di riprodursi sia con la covata di *Apis mellifera* maschile che quella femminile, avendo in tal modo la stagione riproduttiva di questo acaro si può protrarre per un periodo di tempo più lungo raggiungendo densità di popolazione più elevate, colpendo in proporzione più api adulte e larve. Senza trattamento, una colonia di *Apis mellifera* infestata da *V. destructor* muore entro 3 anni (Korpela et al., 1993; Fries et al., 2006), mentre invece le colonie di *Apis cerana* sono in grado di sopravvivere a una infestazione da acari Varroa senza danni evidenti. *Varroa destructor* è considerato il maggior parassita da api da miele da quando si è diffuso su *Apis mellifera*. Recenti studi hanno confermato il suo sostanziale contributo nella perdita di api da miele nell'emisfero settentrionale (Schneider et al., 2010; Chauzat et al., 2010; Dahle, 2010; Genersch et al., 2010; Tololska et al., 2010; Van Engelsdorp et al., 2011).

V. destructor colpisce le giovani larve dalle quali succhia l'emolinfa, senza però causarne la morte direttamente, ma inducendo un forte indebolimento. Le larve infettate nascono malformate, svigorite e con difficoltà nel produrre la pappa reale, l'elemento essenziale per la nutrizione della regina e delle altre giovani operaie.

La saliva dell'acaro, oltretutto, crea un'immunodeficienza nell'ape in quanto non è più in grado di mettere in atto idonee difese immunitarie nei confronti di altri patogeni.

V. destructor oltre a provocare questi sintomi, può trasmettere diversi virus, come il Virus delle Ali Deformi (DWV) o il Virus della Paralisi Acuta (VPA) che causano rispettivamente deformazioni alle ali e la morte delle api in breve tempo.

La nosemiasi è invece una malattia che colpisce le api adulte e viene causata da funghi unicellulari appartenenti al Genere *Nosema*. Esistono due diverse specie di *Nosema* che colpiscono *A. mellifera*: *N. apis* ed *N. ceranae*, responsabili di due forme completamente distinte di malattia. Mentre *N. apis* è responsabile di una forma gastro-enterica della malattia, *Nosema ceranae*, un patogeno segnalato recentemente su *A. mellifera* classificato nel 1996 da Fries, provoca forme di malattia caratterizzate da lento spopolamento fino alla morte dell'alveare.

Nosema apis è responsabile della forma "classica" della malattia, diffusa soprattutto nelle regioni fredde ed umide, sebbene attualmente in Italia sia molto meno frequente rispetto a *N. ceranae*, *N. apis* attacca nel periodo invernale più frequentemente gli alveari mal gestiti dal punto di vista nutritivo. La malattia viene anche detta "spopolamento primaverile", perché si manifesta in modo più evidente durante la primavera con una diminuzione dell'entità numerica della colonia. *N. apis* risulta molto dannoso perché lo stadio dormiente è costituito da spore resistenti alle variazioni di temperatura ed umidità.

Dopo l'attacco della famiglia da parte di *N. apis*, compaiono nelle api disturbi intestinali con diarrea; le giovani nutrici divengono incapaci di produrre la pappa reale, mentre le bottinatrici riducono la loro attività, fino ad interromperla del tutto nelle forme più conclamate. Nei rari casi in cui si ammala anche la regina, diminuisce notevolmente l'ovideposizione che, nei casi più gravi, cessa del tutto.

N. apis vive e si moltiplica a spese delle cellule epiteliali del tubo digerente delle api adulte. Non colpisce mai gli stadi larvali. *N. ceranae*, invece, è una nuova specie di microsporidio isolato per la prima volta nel 1996 su *Apis cerana*, un'ape diffusa nel sud-est del continente asiatico. Attraverso meccanismi e percorsi non ancora del tutto chiariti, *N. ceranae* si è propagato in vaste aree europee su *A. mellifera*, Italia inclusa, sostituendosi alla forma indigena di *N. apis*, dando luogo a manifestazioni del tutto differenti dalla nosemiasi classica. Il ciclo di vita di *N. ceranae* ha una durata di circa due anni ed è costituito da una prima fase asintomatica; i sintomi diventano visibili in modo graduale nelle successive fasi. Tra gli elementi che distinguono questo tipo di nosemiasi dalla forma classica vi sono: la gravità dei sintomi (spopolamento e morte degli alveari), l'assenza di turbe gastroenteriche (diarrea) come sintomo tipico, l'apparizione della malattia in periodi differenti da quelli classici. Diversi autori attribuiscono a questo patogeno un ruolo rilevante nei fenomeni di spopolamento e morte degli alveari che hanno colpito in questi ultimi anni le api in UE (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana 2013).

1.3.2 Neonicotinoidi

Il crescente utilizzo di insetticidi ed erbicidi specialmente in agricoltura, ma anche per uso domestico, ha causato un inquinamento delle risorse idriche, dell'ambiente e dei prodotti alimentari. Molto spesso una grossa parte dei pesticidi e dei loro prodotti di degradazione non sono completamente biodegradabili.

Gli insetticidi possono essere raggruppati in: organoclorurati, organofosforici, e carbammati; recentemente si sono aggiunti insetticidi di nuova concezione come i neonicotinoidi e i regolatori di crescita quali indoxacarb e spinosad.

Riguardo i primi tre gruppi di insetticidi, la loro abilità nel controllare gli insetti infestanti è andata però scemando nel tempo poiché questi ultimi hanno sviluppato una resistenza verso queste tre classi di insetticidi costringendo quindi l'uomo a sviluppare nuovi composti.

Anche la sicurezza dell'ambiente è diventata una prerogativa sempre più importante, cosicché con il passare del tempo la richiesta è diventata quella di prodotti insetticidi di minor impatto ambientale ma che allo stesso tempo che mantenessero un'elevata efficacia nel combattere i parassiti.

La famiglia dei neonicotinoidi ha sostituito man mano gli insetticidi delle altre famiglie anche per la minore tossicità sui vertebrati rispetto a numerose altre classi di insetticidi usati in precedenza.

La storia dei neonicotinoidi si inserisce quindi nella richiesta da parte del mercato di composti sempre meno pericolosi, ed in particolare inizia nel 1991 con il lancio dell'Imidacloprid, da parte della Bayer Crop Science, che, è rimasto per diversi anni l'insetticida più venduto nel mondo (Jeschke et al., 2008).

Successivamente molte altre molecole neonicotinoidi furono sintetizzate fra cui le più importanti sono state il Thiacloprid da parte della Bayer, il Clothianidin da parte della Takeda e il Dinotefuran dalla Mitsui Chemicals. Il composto imidacloprid, oltre a mostrare un'elevata efficacia, ha una notevole importanza per la sua struttura chimica; infatti, è costituito da tre porzioni da ciascuna delle quali si può procedere alla sintesi di ulteriori composti neonicotinoidi tra i quali il clothianidin ed il thiamethoxam.

I neonicotinoidi (Figura 1.1) agiscono a livello dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR) degli insetti. Questa tipologia di insetticidi è molto efficiente nei confronti di diversi gruppi di fitofagi, quali afidi, auleurodidi, tripidi, cavallette, alcuni micro-lepidotteri ed alcuni gruppi di coleotteri. Questo ha contribuito a far sì che i neonicotinoidi diventassero la categoria più importante nel mercato mondiale degli insetticidi tanto da coprire circa il 40% del mercato dei prodotti per la protezione delle colture (Jeschke et al., 2011; Van der Sluijs et al., 2013; Simon-Delso et al., 2014). La produzione di neonicotinoidi è gestita da 2 grandi multinazionali, Syngenta per il thiamethoxam, Bayer per il clothianidin e l'imidacloprid e al quale si affianca il fipronil (un composto che fa parte della famiglia dei Fenilpirazoli) prodotto dalla BASF, che generano profitti per migliaia di milioni di euro.

Per quanto riguarda i neonicotinoidi si suddividono in due gruppi: i nitro-sostituiti (clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiamethoxam, e nitenpyram) e i ciano-sostituiti (acetamiprid e thiacloprid) (Figura 1.1).

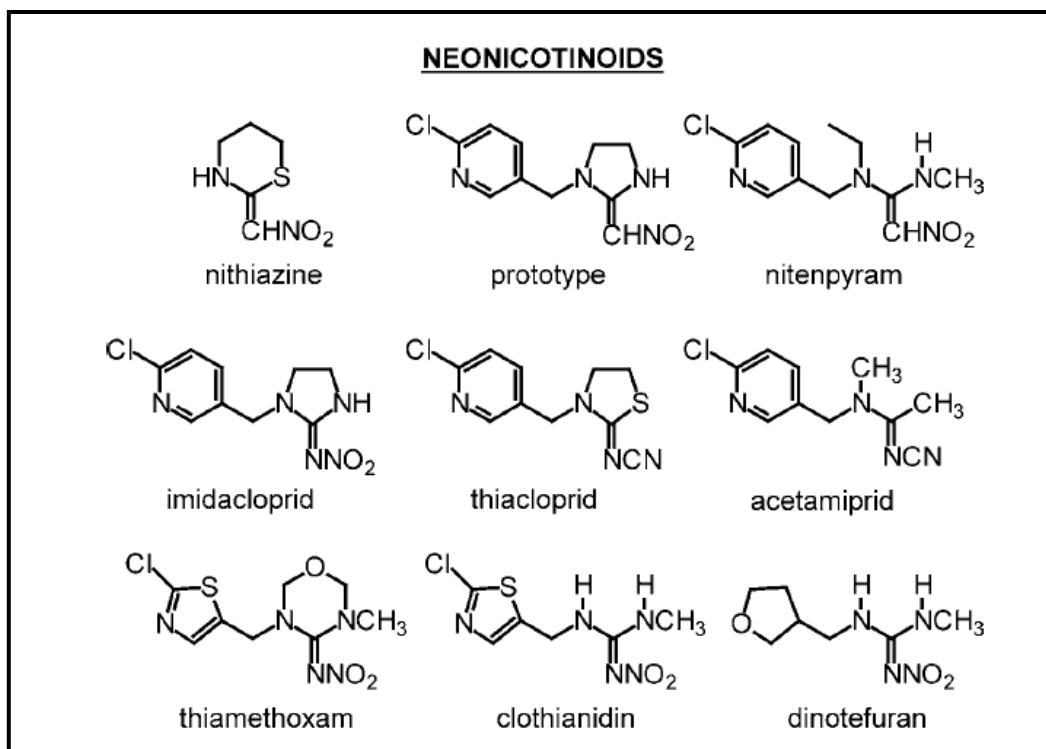


Figura 1.1 Struttura chimica dei principali neonicotinoidi (Tomizawa et al.,2004).

1.3.2.1 Formulazione dei neonicotinoidi e proprietà chimiche

I principi attivi neonicotinoidi sono comunemente utilizzati su semi (come concianti), sui suoli coltivati e sui prati (sparsi in formulazione granulare o tramite spray), su strutture (per la disinfestazione dalle termiti), nei frutteti tramite l'uso di spray fogliari o tramite iniezione sui tronchi ed infine come trattamento topico sugli animali domestici per l'eliminazione delle pulci.

La maggior quota di mercato dei neonicotinoidi, circa il 60%, è costituito da concianti. L'operazione di concia delle sementi è una pratica che consiste nell'avvolgere il seme da piantare in una pellicola contenente una certa dose di fitofarmaco. Tale composto, se agisce in modo sistemico come nel caso dei neonicotinoidi, viene portato all'interno dei tessuti della pianta una volta che questa inizia il suo processo di sviluppo proteggendola quindi su gran parte dei tessuti ed assicurando una buona persistenza della protezione sia dai principali fitofagi radicali, sia dai principali insetti fitofagi e fitomizi, che attaccano i tessuti aerei della pianta. Questa modalità di impiego degli agrofarmaci ha portato ad una forte riduzione delle quantità di prodotti necessari per un'adeguata protezione delle colture rispetto alle precedenti tecniche agronomiche utilizzate. Queste prevedevano infatti l'uso massiccio di geo-disinfestanti o di prodotti irrorati con spray. Con questa modalità di somministrazione si sono così ridotte drasticamente le quantità di principio attivo disperse nell'ambiente con relativi vantaggi sia economici che ambientali. L'uso

dei concianti, nel tempo, è stato esteso oltre che al mais anche a molte altre colture quali il cotone, la colza, il girasole e la barbabietola da zucchero.

I neonicotinoidi sono chimicamente delle molecole relativamente piccole e sono altamente solubili in acqua. L'alta tensione di vapore, compresa tra $2,8 \cdot 10^{-8}$ e 0.002 mPa a 25 °C, conferisce ai neonicotinoidi una bassa tendenza a volatilizzare e pertanto queste sostanze hanno una breve permanenza in fase gasosa.

La solubilità in acqua dei neonicotinoidi dipende dalla temperatura, dal pH e dalla formulazione dell'insetticida. Il peso molecolare dei neonicotinoidi è nell'intervallo tra 250 e 300 g/mol, mentre il range di solubilità è situato tra 184 (media) e 590'000mg/L (alta) rispettivamente per il thiacloprid e il nitenpyram a 20 °C e a pH 7 (PPDB, 2012).

1.3.2.2 Destino ambientale dei neonicotinoidi

L'uso sempre crescente di questa tipologia di insetticidi ha incrementato anche la ricerca per capire quello che può essere il destino ambientale di questi composti; è stata valutata con grande attenzione la loro persistenza, gli effetti sull'ambiente ed in particolare sugli insetti impollinatori e su altri organismi invertebrati non bersaglio e la potenziale contaminazione per deriva (aerea, lisciviazione e run-off) delle aree non trattate.

Da quanto emerge dal primo dei sette capitoli del ***Worldwide Integrated Assessment of the Impact of Systemic Pesticides on Biodiversity and Ecosystem*** ([WIA](#)), un lavoro di meta-analisi di oltre 800 pubblicazioni scientifiche che si è posto l'obiettivo di monitorare l'impatto dei pesticidi sistemici negli ecosistemi e nella biodiversità risulta che i principali indagati sono i neonicotinoidi analizzando gli effetti sulle specie note come più vulnerabili, api e farfalle in testa, fino ad arrivare agli effetti indiretti sui vertebrati. La prima parte, pubblicata su *Environmental Science and Pollution Research*, prende in esame proprio questi ultimi. Dai risultati delle meta-analisi (Van der Sluijs et al., 2015), le specie animali in assoluto più vulnerabili all'utilizzo di questi prodotti sono gli invertebrati terrestri, come ad esempio i lombrichi, esposti ai pesticidi tramite il terreno, l'acqua superficiale, l'aria o direttamente attraverso le piante. Subito a seguire ci sono gli inetti impollinatori, come api e farfalle, esposti ad altissimi livelli di contaminazione attraverso il polline e l'aria. Il terzo posto viene occupato dagli invertebrati acquatici, anch'essi molto sensibili. La solubilità in acqua dei neonicotinoidi, infatti, fa in modo che possano contaminare acque superficiali e falde acquifere, andando a modificare l'alimentazione, la mobilità e la capacità riproduttiva dei piccoli invertebrati acquatici, come il plancton.

Anche alcuni vertebrati, nonostante siano meno sensibili, risentono degli effetti diretti o indiretti dell'uso dei neonicotinoidi. Alcune specie di piccoli uccelli, come i passeri, possono mangiare semi trattati e andare incontro ad un aumento di mortalità e a un ridotto tasso riproduttivo. Pesci e anfibi sono invece risultati

sensibili ad alti livelli di pesticidi o esposizioni prolungate. Questa analisi, dicono gli studiosi, presenta anche alcuni limiti, dati soprattutto dalla mancanza di studi esaustivi sulla effettiva concentrazione ambientale dei neonicotinoidi e sulla loro tossicità in molte specie animali.

I neonicotinoidi che hanno una bassa tendenza a volatilizzare; hanno un aspetto negativo dovuto alla capacità di questi composti di legarsi chimicamente alle particelle di suolo. In particolare vengono adsorbiti nei suoli con alto contenuto di materia organica (Broznic e Milin, 2012). È stato inoltre riscontrato che i neonicotinoidi possono legarsi ai sedimenti presenti sia nei corpi d'acqua dolce che salata (Baird et al., 2013). Molti batteri comunemente presenti nei terreni e nelle acque sono in grado di biotrasformare questi composti in tempi relativamente brevi nei loro comuni metaboliti questi, si è osservato, sono spesso più tossici per gli insetti dei principi attivi stessi ad esempio il Thiamethoxam viene biotrasformato in Clothianidin.

1.3.2.3 Clothianidin

L'insetticida utilizzato in questo studio sperimentale è il Clothianidin; di seguito si riportano in modo schematico (Tabella 1.1) alcune caratteristiche strutturali, chimiche, ambientali della molecola e i principali prodotti fitosanitari in cui si può reperire tale principio attivo.

Nome comune	Clothianidin
Nome commerciale	Poncho®, Poncho Beta®, Deter®, Raxil Deter®, Redigo Deter®
Azienda produttrice e anno di registrazione	Bayer Corporation, 2003
Formula	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S
Peso molecolare	249,7 g/mol
Classe chimica	Nitroguanidina sottogruppo dei neonicotinoidi
Modalità di azione	Agisce per ingestione e contatto sugli insetti. La molecola si fissa in modo permanente ai recettori nicotinici dell'acetilcolina, provocando movimenti scoordinati, tremori, paralisi ed infine morte dell'insetto.
Modalità d'applicazione	Viene applicato come conciante di semi, o come geodisinfestante in formulazione granulare.
Insetti controllati	Elateridi, Afidi, Cicaline, Nottue, Diabotica..
Pressione di vapore	1.3·10 ⁻¹⁰ Pa a 25°C
Solubilità	0.327 g/l in acqua a 20°C
Kow	LogKow=0.9 a 25°C (Kow=7.94)
Tempo di dimezzamento nel suolo (metabolismo aerobico nel suolo)	148-1 155 giorni
Dose di applicazione	Elateridi (<i>Agriotes spp.</i>) 7 kg/ha Diabrotica (<i>Diabrotica spp.</i>) 11kg/ha.

Tabella 1.1 EPA 2003.

1.3.2.4 Modalità di azione del Clothianidin

Il Clothianidin agisce a livello dello spazio intersinaptico, interferendo nella trasmissione dell'impulso nervoso ed agendo come antagonista sui recettori nicotinici dell'acetilcolina (ACh) del sistema nervoso centrale degli insetti. L'acetilcolina (ACh) è infatti l'agonista endogeno e il neurotrasmettitore del sistema nervoso colinergico. Le neurotrasmissioni attraverso le sinapsi sono mediate in due passaggi. Prima l'acetilcolina è rilasciata dalla membrana presinaptica tramite esocitosi e interagisce con il sito di legame localizzato nel dominio extracellulare del complesso costituito dal canale ionico del recettore nicoticonico dell'acetilcolina. Nel secondo passaggio una modificazione conformazionale della molecola del recettore porta all'apertura del canale, permettendo l'ingresso di cationi Na^+ extracellulare e l'uscita di cationi K^+ intracellulare per mantenere lo stato di equilibrio del potenziale di membrana. Il Clothianidin si lega allo stesso sito dell'acetilcolina, provocando l'apertura dei canali ionici e conducendo alla depolarizzazione delle membrane. La differenza rilevante tra il legame dell'acetilcolina ed i neonicotinoidi rispetto al legame acetilcolina-recettore è il fatto che l'acetilcolina si stacca dal recettore a seguito dell'attivazione mentre i neonicotinoidi rimangono legati ai recettori.

Quindi il Clothianidin, ad alti dosaggi, provoca una depolarizzazione continua della membrana, conducendo ad un blocco della trasmissione del segnale. Negli insetti l'azione dei neonicotinoidi causa l'eccitazione permanente dei nervi ed infine conduce alla morte (Fischel, 2005).

I recettori nicotinici non esistono solo negli insetti ma anche nei vertebrati (Tomizawa e Casida, 2003). Tali recettori, tuttavia, sono molto più abbondanti negli insetti (Fischel, 2005). Ci sono almeno 17 recettori nicotinici dell'acetilcolina che differiscono per la presenza o meno di diverse subunità (Schafer, 2008). I neonicotinoidi mostrano un'alta selettività per certi sottotipi di recettori e presentano differenze sulla modalità di azione tra i ricettori presenti negli insetti e quelli presenti nei vertebrati (Matsuda et al., 2001). In particolare, le differenti modalità di azione si esplicano nelle diverse modalità di interazione tra la carica negativa del gruppo nitro presente nei neonicotinoidi e le cariche amminoacidiche presenti sulla superficie del recettore; l'interazione chimica tra le cariche positive degli aminoacidi presenti sui recettori degli insetti avviene grazie ad un legame idrogeno o per effetto elettrostatico con la carica negativa dell'insetticida; tale interazione non avviene nei recettori nicotinici dei vertebrati per la presenza di cariche negative degli aminoacidi, che causano effetti di repulsione impedendo l'azione neurotossica dell'insetticida.

Uno degli aspetti positivi del Clothianidin e degli altri neonicotinoidi è dovuto alla loro specificità nella modalità di azione sugli insetti è la poco probabile insorgenza di resistenza negli organismi. Questo consente di utilizzarli per diversi anni senza la necessità che siano sostituiti da altre tipologie di insetticidi come è successo per le classi di insetticidi dei carbammati, degli organofosforici e dei piretroidi sintetici.

1.3.2.5 Normativa inerente i neonicotinoidi

La legislazione dell'Unione Europea riguardante la commercializzazione e l'impiego dei prodotti per la protezione delle piante e dei loro residui negli alimenti è disciplinata dalla Direttiva 79/117/CEE relativa al "Divieto di immettere in commercio e impiegare prodotti fitosanitari contenenti sostanze attive" e dal Regolamento (CEE) N.396/2005 riguardante " i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale", che modifica la Direttiva 91/414/CEE relativa "all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari". L'approvazione per utilizzazione o commercializzazione dei prodotti fitosanitari è basata su due livelli. A livello dell'Unione Europea viene effettuato uno screening di tutte le sostanze inserite nel mercato europeo e successivamente si danno, tramite regolamenti e direttive, le indicazioni per il controllo e la gestione dei prodotti fitosanitari le quali dovranno essere poi recepite dai singoli stati membri.

Il regolamento (CE) n.1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio per l'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari (PPP), contiene la disposizione secondo cui i PPP possono essere approvati a livello dell'UE solo se questi non sono particolarmente pericolosi per la salute umana, per l'ambiente e il loro impiego non ha alcun effetto inaccettabile per la salute delle api e deve comunque comportare un'esposizione trascurabile per le stesse. La Commissione, sempre allo scopo di rafforzare la protezione delle api, ha riesaminato i requisiti necessari per la approvazione dei PPP.

La crescente preoccupazione per i possibili effetti dei neonicotinoidi sulle api e sugli altri impollinatori selvatici ha allarmato anche l'opinione pubblica.

Questo ha portato la Commissione Europea ad assegnare uno studio dell'analisi del rischio e la verifica della sicurezza dei principi attivi clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e del fipronil in formulazione granulare e di concia, all'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) che ha pubblicato le nuove linee guida per la valutazione del rischio da pesticidi per la sopravvivenza delle api, che rappresenta un netto miglioramento per quel che riguarda la valutazione del pericolo rispetto a quanto proposto in precedenza dall'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante. Lo studio effettuato si è focalizzato sulla valutazione di tutte le vie di esposizione degli impollinatori e il potenziale rischio di ciascuna via di esposizione. Sono state considerate l'esposizione per contatto, attraverso il consumo di polline, nettare ed acqua (guttazioni e acqua superficiale) e l'esposizione ai metaboliti presenti nel polline e nel nettare.

Gli atti normativi più recenti riguardano il regolamento di esecuzione (UE) n. 485/2013 della Commissione del 24 maggio 2013 che ha dato il via alla moratoria contro i tre insetticidi considerati più dannosi per le api europee (moratoria entrata in vigore nel successivo mese di dicembre 2013, per la durata di 2 anni) clothianidin, imidacloprid, thiametoxam (della famiglia dei neonicotinoidi), destinati alla concia delle sementi, all'applicazione al suolo (granuli) ed ai trattamenti fogliari su piante e cereali (ad eccezione dei

cereali vernini), (GU 165,2013); e il Regolamento europeo (UE)n.781/2013, che analogamente, vieta l'uso del principio attivo fipronil (GU 164,2013). La Commissione europea stabilisce, inoltre, che i restanti usi autorizzati sono a disposizione dei soli professionisti e le eccezioni sono limitate alla possibilità di trattare coltivazioni che attraggono le api in serre e in campi all'aperto solo dopo la fine della fioritura. Con questi due regolamenti, la Commissione Europea ha preso atto delle conclusioni dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare stilate anche in base alle indicazioni contenute nelle conclusioni del progetto BEENET, progetto italiano, attivo dal 2011, che sostituisce il monitoraggio Apenet, approntato nel 2008 a seguito dei gravi casi di moria delle api. Nel marzo 2009 è partita, per due anni, nell'ambito del progetto nazionale APENET, una capillare rete di monitoraggio per conoscere lo stato di salute degli alveari. La rete di monitoraggio APENET era costituita da moduli di rilevamento, ogni modulo era costituito da cinque apiari, composti da 10 alveari, collocati ad una distanza di 50 km fra loro e dal centro di coordinamento. Attraverso rilevamenti periodici (4 volte/anno) sugli alveari e sull'ambiente si è anche provveduto a campionare diverse matrici (api morte, api vive, covata, cera, polline) che sono state consegnate all'IZS delle Venezie per le analisi di laboratorio (chimiche, patologiche, ecc.). Sono stati presi in considerazione gli effetti letali e sub letali associati ai residui di neonicotinoidi e fipronil, ma si fa anche riferimento all'impolveramento delle api in situazione di differente umidità.

In Francia, Germania, Slovenia e Italia, dove era già in atto la sospensione temporanea verso neonicotinoidi e fiononi (in Italia dal settembre 2008), è stata riscontrata l'efficacia di tali sospensioni in particolare nella drastica diminuzione delle morie primaverili degli alveari. In Slovenia, la riammissione dei neonicotinoidi nel 2011, dopo una sospensione del loro utilizzo per due anni, è la causa principale delle morie di alveari estese che si sono verificate nella primavera del 2011.

Nonostante il bando dei tre neonicotinoidi, il Collegio nazionale degli agrotecnici e degli agrotecnici laureati, nell'atto di impugnazione al tribunale amministrativo regionale del Lazio del Piano nazionale sui fitofarmaci, ha evidenziato come oltre l'80 per cento delle aziende agricole sia priva dell'autorizzazione all'acquisto dei fitofarmaci, che evidentemente vengono reperiti attraverso canali non regolari e non tracciati, circostanza che rischia di vanificare qualunque disposizione prescrittiva sull'uso dei neonicotinoidi, che si applicherebbe solo sul 20 per cento delle aziende con regolare autorizzazione e per il restante 80 per cento delle aziende l'applicazione delle norme resterebbe affidata al buon senso delle stesse. Inoltre le aziende produttrici di sementi concianti, a seguito di questo bando, hanno immesso nel mercato altri prodotti con caratteristiche simili come il thiacloprid (Sonido®), che è un neonicotinoide "scordato" dalla Ue, il 5 dicembre 2013 il Ministero della salute ha emesso con proprio decreto l'autorizzazione del prodotto fitosanitario della *Bayer CropScience* secondo la procedura di «riconoscimento reciproco» con un altro Stato membro (Francia). Trattasi di un neonicotinoide di tossicità di poco inferiore agli altri, ma potenzialmente nocivo. Anche il methiocarb (Mesurol FS 500®) con azione simile ai neonicotinoidi e l'"innovativo" Force 20 CS® a base del piretroide teflutrin, possono avere dei possibili effetti di tossicità per

le api. Proprio questi ultimi tre prodotti sono i principali indiziati non verificati delle morie primaverili avvenute tra aprile-maggio 2014 in alcune zone del Friuli della Lombardia e del Piemonte e registrate dalla rete di monitoraggio BEENET.

1.4 ESPOSIZIONE E PROVE IN LABORATORIO; IN SEMI-CAMPO E CAMPO SUI NEONICOTINOIDI

1.4.1 Vie di esposizione.

Molti studi sono stati condotti al fine di valutare le possibili vie di esposizione, di quantificare l'entità delle dosi a cui gli insetti vengono esposti, e di conoscere quali sono le concentrazioni che determinano effetti acuti o cronici sugli organismi. Tuttavia, per quanto riguarda l'esposizione delle api agli insetticidi neonicotinoidi, rimangono alcuni aspetti da chiarire seppur siano stati pubblicati alcuni studi che dimostrano sia la presenza di dosi significative di insetticida sia la reale possibilità che si verifichi l'episodio di esposizione.

L'ampio e diversificato utilizzo degli insetticidi neonicotinoidi e in secondo luogo la struttura sociale dell'ape e l'ampio spettro di matrici ambientali visitate sono elementi che fanno sì che il numero di fattori da considerare sia molto elevato.

Le api possono incorrere nell'esposizione attraverso l'ingestione, per contatto e per inalazione (aerosol). Per ingestione, le api possono ingerire fonti di cibo (nettare, polline, resina, melata, guttazioni, acqua) contenenti residui di insetticidi; per contatto, le api possono intercettare la nuvola di insetticida direttamente in volo, sia si tratti di spray nel caso di trattamenti sia di polveri derivanti dalla semina di semi conciatati o possono venire a contatto con l'insetticida visitando la vegetazione.

1.4.2 Definizioni degli indici di tossicità e degli effetti acuti e subletali.

Di seguito si riportano delle brevi definizioni delle tre tipologie di tossicità e dei possibili effetti in caso di avvenuta esposizione.

Si definisce tossicità acuta una sintomatologia in cui gli effetti avversi si manifestano in breve tempo dopo la somministrazione di una singola dose di una sostanza; i test di tossicità acuta prevedono la misura di una risposta individuale (solitamente la mortalità).

Si è in presenza di un evento di tossicità subacuta (subletale) quando gli effetti avversi si manifestano a seguito dell'esposizione ad una sostanza per un periodo prolungato. Una tossicità sub-letale considera effetti a livello della crescita, del comportamento dell'individuo o prende in considerazione parametri biochimici e fisiologici.

La tossicità cronica, infine, indica gli effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo maggiore al 50 % della durata della vita dell'organismo; la tossicità cronica prende in considerazione la risposta di popolazioni (parametri demografici), di comunità (interazioni tra specie), o dell'intero ecosistema (interazioni totali) (ECETOC, 1993b).

In ecotossicologia la tossicità acuta, riferita ad organismi, è espressa con l'indice DL50 il quale indica la dose di tossico che provoca la morte di metà degli individui esposti entro un arco temporale di 24-48 ore.

Il livello di tossicità di una sostanza dipende dalla tipologia di esposizione: l'esposizione per contatto solitamente evidenzia una minore tossicità rispetto a quello che accade per via orale.

A rendere lo studio di questi fenomeni complesso sono i numerosi fattori che possono avere influenzare i test. Se si prende in considerazione la via di esposizione orale dell'ape alcuni autori hanno individuato una variabilità nella risposta tra sottospecie, tra alveari ed in alcuni casi tra api di un stesso alveare (Decourtye e Devillers, 2010; Laurino et al., 2011); le prime due tipologie di variabilità sono dovute principalmente a differenze genetiche e ambientali (Suchail et al., 2001), mentre la terza tipologia di variabilità dipende dall'età degli individui (giovani, adulti, api svernanti, api estive), dallo stato di salute delle api e dal processo di trofallassi (modalità di alimentazione che integra elementi di socialità; in pratica un individuo usa condividere il cibo assunto precedentemente con altri individui del proprio gruppo sociale) che potrebbe contribuire nelle differenze di assunzione e accumulo dell'insetticida (Nauen et al., 2004). Un elemento che poche volte viene tenuto in considerazione che potrebbe però avere un effetto consistente è quello della modalità di raccolta delle api e della metodologia seguita nella successive prove di laboratorio.

Si riporta di seguito una tabella (Tabella 1.2) contenente la tossicità acuta per via orale e per contatto dei principali neonicotinoidi, la tabella è stata pubblicata in una review svolta sull'argomento da alcuni studiosi tedeschi.

Sostanza	Intervallo	Tossicità acuta orale LD ₅₀ (µg/ape)	Tossicità acuta per contatto LD ₅₀ (µg/ape)
Acetamiprid	M	LD ₅₀ :0.007-8.09 ^{2;3}	LD ₅₀ :8.85-14.52 ³
Clothianidin	H	LD ₅₀ :0.022-0.044 ^{2;4}	LD ₅₀ :0.00379 ⁵
Dinotefuran	H	LD ₅₀ :0.024-0.061 ^{2;6}	LD ₅₀ :0.0076-0.023 ⁶
Imidacloprid	H	LD ₅₀ : 0.0179-0.243 ^{4;7}	LD ₅₀ :0.0037-0.081 ^{7;8}
Thiacloprid	M	LD ₅₀ : 14.6-38.83 ⁹	LD ₅₀ :8.51-17.3 ⁹
Thiamethoxam	H	LD ₅₀ : 0.024-0.029 ²	LD ₅₀ :0.005 ¹⁰

Tabella 1.2 H=tossicità alta; M=tossicità moderata. Tossicità: alta:LD₅₀<2 µg/ape; moderata: LD₅₀<2-10,99 µg/ape; leggermente tossico: LD₅₀<11-100 µg/ape; praticamente non tossico LD₅₀> µg/ape.

Fonti: 1. WSDA 2010; 2. Iwasa et al., 2004; 3. EC 2004b; 4. EPA 2003a; 5. EC 2005; 6. EPA 2004; 7. Schmuck et al., 2001; 8. Nauen et al., 2001; 9. EC 2004a; 10 Syngenta Group 2005.

Come indice di riferimento della tossicità subacuta, spesso viene utilizzato l'indice NOEC (Non Observed Effect Level) il quale indica la più alta concentrazione di insetticida che non provoca alcun effetto all'organismo esposto; questo parametro sta ad indicare la concentrazione che non è dannosa per gli organismi. Al NOEC viene affiancato, in alcuni casi, l'indice LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) indicante la più bassa concentrazione a cui si osservano effetti.

Gli effetti subletali sulle api si possono suddividere in fisiologici e comportamentali.

Gli effetti subletali fisiologici riscontrati nelle api sono: effetti provocati sui recettori dell'acetilcolinesterasi, aumento dell'attività della Citocromo Ossidasi, che controlla la respirazione e l'attività enzimatica cerebrale (Desneux et al., 2007; Boily et al., 2013), perturbazioni nello sviluppo neuronale delle larve, minor longevità delle api adulte, minore deposizione di uova ed induzione ad apoptosi cellulare (Aupinel et al., 2005; Kakamand et al., 2008; Gregorc e Ellis, 2011).

Gli effetti comportamentali invece che si possono verificare a seguito all'esposizione a dosi subletali di insetticidi neonicotinoidi sono: aumento dell'attività motoria a bassissime concentrazioni, a dosi più alte ma sempre inferiori DL50, diminuzione dell'attività motoria (Medrzycki et al., 2003; Colin et al., 2004), difficoltà di approvvigionamento del cibo per l'alterazione dei riflessi dell'estensione della proboscide (PER; Proboscis Extension Reflex) e quindi, conseguentemente, l'alterazione della sensibilità delle antenne e della percezione del cibo (Bortolotti et al., 2003), infine alcuni studi hanno evidenziato un'incapacità di comunicare alle consorelle le fonti di cibo a causa dell'incapacità a svolgere la danza di segnalazione detta "waggling dance" (Decourtye e Devillers, 2010; Blacquiere et al., 2012; Eiri e Nieh, 2012) e dei problemi di orientamento e di vista (Thompson e Maus 2007; Desneux et al., 2007; Decourtye et al., 2011; Schneider et al., 2012).

Alcuni autori hanno ipotizzato che l'esposizione a dosi subletali di neonicotinoidi possa causare la moria degli alveari per CCD dovuta all'azione sinergica tra dosi subletali di neonicotinoidi e patogeni (Vidau et al., 2011; Di Prisco et al., 2013; Doublet et al., 2014).

1.4.3 Prove in laboratorio, in semi-campo e in campo sui neonicotinoidi.

In questo paragrafo sono descritti brevemente alcuni degli esperimenti che hanno indicato un possibile effetto subletale dei neonicotinoidi sulle api bottinatrici, in particolare vengono passati in rassegna i dati disponibili sul potenziale rischio posto dall'utilizzo di semi conciatati con l'imidacloprid nei confronti delle api. Un particolare interesse sarà rivolto agli studi effettuati in condizioni di campo e semi-campo. Sono state effettuate numerose prove di laboratorio in condizioni standard per valutare la tossicità acuta orale dell'imidacloprid, alimentando le api con una soluzione zuccherina contenente il neonicotinoide. In modo analogo è stata investigata anche la tossicità cronica orale dell'imidacloprid, esponendo le api alla soluzione contaminata per un tempo variabile dai 5 ai 10 giorni (Decourtye, 1998; Belzunces et al., 1998; Colin et al., 1998; Kirchner, 1999, 2000; Pham-Délégué et al., 2000; Suchail et al., 2001). Altri effetti indagati in laboratorio comprendono l'apprendimento associativo nel comportamento delle api. In queste prove uno stimolo chimico artificiale è stato legato al riflesso dell'estensione della proboscide delle api (Bitterman et al., 1983). Il PER (Proboscis Extension Reflex) è deputato alla memorizzazione di gusti ed odori, se esso non funziona correttamente le api non sono più in grado di riconoscere il cibo, di portarlo all'arnia e di sfamare le altre api e loro stesse.

I risultati delle prove di laboratorio indicano come dose orale acuta (LD50) risulta compresa tra 40,9 e > 81 ng/ape (Schmuck, 1999; Schmuck *et al.*, 2001, 2003); mentre per la tossicità cronica è stato indicato un valore di NOEC per l'imidacloprid di 20 ppb. Infine, il valore di NOEC misurato in laboratorio riguardo l'apprendimento associativo è risultato di 10 ppb.

Successivamente sono stati eseguiti i test in campo e semi-campo per investigare gli effetti a breve e lungo termine dei residui di imidacloprid nella dieta delle api in condizioni simili a quelle presenti in natura.

In questi studi le api sono state alimentate per periodi prolungati esclusivamente con diete con imidacloprid. Similmente sono stati condotti test sugli effetti cronici dovuti all'assunzione di polline di girasole o di mais coltivati con semi conciatati. Per simulare condizioni di esposizione simili a quelle naturali, le colonie di api sono state poste accanto a campi di girasole o di colza i cui semi avevano subito la concia con imidacloprid. In tutti questi studi, sono stati monitorati la mortalità delle api, le api disperse, l'attività di foraggiamento, il comportamento delle api, lo sviluppo della colonia, lo stato della covata e la variabilità delle scorte di polline e nettare. In altri test effettuati in campo, utili per esaminare gli effetti sulla comunicazione intraspecifica, sono state esaminate le risposte di piccoli nuclei di api, alcuni che non avevano subito il trattamento (testimoni) e altri che avevano assunto la soluzione zuccherina trattata.

Dagli studi effettuati in campo, volti a valutare gli effetti della soluzione contaminata sulla comunicazione intraspecifica sulle bottinatrici, è stato indicato un valore per il NOEC di 10 ppb. Alla concentrazione di 20 ppb le api percepiscono il contaminante e rispondono rifiutando di alimentarsi. A 50 ppb e a valori più elevati, l'attività di foraggiamento diminuisce, ma non sparisce del tutto neanche a 100 ppb, inoltre le api non presentano problemi nel tornare all'alveare posto a 500 m. Per quanto riguarda la sopravvivenza delle api non si assiste ad alcuna differenza tra le api trattate e quelle testimoni. Dagli studi analitici sui campioni di nettare e polline di girasole, di colza, e di piante di mais, è stato rilevato che i livelli dei metaboliti di imidacloprid sono ben al di sotto dei 5 ppb. Dai test risulta che per i parametri monitorati, sopra elencati, non si sono verificati effetti avversi acuti o cronici per residui di imidacloprid nelle diete delle api pari a 20 ppb; pertanto risulta evidente che i semi concitati con l'imidacloprid comportano solo un trascurabile rischio per le api. Questa conclusione è supportata dai risultati di oltre 30 studi in condizioni di campo e semi-campo condotti in varie regioni del mondo (Maus et al., 2003).

In generale, i risultati delle prove di laboratorio devono essere valutati con particolare attenzione dal momento che le api sono sottoposte ad una situazione di stress artificiale dovuta alle condizioni in laboratorio. Più pertinenti e affidabili per una valutazione dei rischi correlati al composto sono le prove effettuate in semi-campo (tunnel) e condizioni di campo dove si trovano nel loro ambiente naturale e all'interno del contesto sociale della colonia.

Proprio per questo fine, sono state messe a punto delle prove in situazione di semi-campo. Per creare le condizioni intermedie tra laboratorio e campo, alcuni ricercatori hanno utilizzato un sistema composto di due tunnel, che permettesse di poter studiare gli effetti sub-letali provocati dai neonicotinoidi sulle api bottinatrici.

Sono stati utilizzati due tunnel semicilindrici ognuno dei quali è stato diviso in due scomparti identici (8 x 10 m). Questa configurazione è stata creata per due ragioni: (1) per assicurare la separazione delle api sperimentali da quelle delle colonie vicine e (2) per consentire l'osservazione dei percorsi delle api.

In ogni tunnel era presente un nucleo e una stazione di alimentazione posta all'angolo opposto.

La prova è stata eseguita nel corso di 4 giorni, a un gruppo di api è stata fornita soluzione contenente l'imidacloprid mentre nello stesso periodo, un altro gruppo non è stato trattato e fungeva da testimone di controllo. Questa procedura è stata eseguita anche per il fipronil. I due insetticidi sistemici sono stati testati a livelli 70 volte più bassi rispetto al 50% della concentrazione letale per le api (LD50 compreso tra 0,005 e 0,081 µg/ape per imidacloprid; LD50 compreso tra 0,0037 e 0,006 µg/kg per fipronil). Gli autori indicano che l'imidacloprid a 6 µg/kg (6 ppb) e il fipronil a 2 µg/kg (2 ppb) inducono una decrescita del numero di visite agli alimentatori (Colin et al., 2004). Si deve sottolineare che il numero di repliche è ridotto, sono state infatti svolte solo 3 prove e nelle tre prove i risultati sono stati contrastanti.

In un altro studio è stato considerato l'intervallo di tempo tra due visite nello stesso sito di alimentazione, questo rappresenta uno dei possibili metodi per valutare gli effetti sub-letali di un pesticida. In questi

esperimenti di campo, le api sono state marcate sul torace. Nel momento in cui la soluzione zuccherina presente nell'alimentatore veniva sostituito con una soluzione zuccherina con l'imidacloprid concentrazione (per un valore minimo di 50 µg/L) (50 ppb) di imidacloprid si assisteva ad un ritardo nel tempo di ritorno, e a concentrazioni di 4000 - 6000 µg/L (4-6 ppm) le api abbandonavano il sito il giorno stesso. Continuando a registrare le prove il giorno seguente c'era un ritorno delle api al 100% al di sotto della concentrazione di 1600 µg/L (Yang et al., 2008).

Un ulteriore studio ha considerato oltre che l'imidacloprid anche il Clothianidin, che prevedeva l'identificazione a radiofrequenza (RFID) con l'obiettivo di monitorare l'influenza delle dosi subletali di insetticidi sulle api bottinatrici su base automatizzata. Questo ha permesso di recuperare in modo efficiente dettagliate informazioni sui parametri di volo. Sono stati confrontati diversi gruppi di api alimentate con diversi dosaggi delle due sostanze assunte dalle bottinatrici in un'unica dose. Con questo approccio sperimentale sono stati monitorati gli effetti acuti delle dosi subletali dei neonicotinoidi imidacloprid (0,15-6 ng/ape) e clothianidin (0,05-2 ng/ape) in circostanze simili a quelle di campo. La sperimentazione ha permesso di ottenere informazioni dettagliate sulle fasi di foraggiamento dividendo la durata del viaggio in tre sezioni: tempo di volo per raggiungere l'alimentatore, la durata del soggiorno presso l'alimentatore, e tempo di volo per tornare all'alveare. A dosi paragonabili a quelle in campo, rilevate per nettare e polline, non sono stati osservati effetti negativi per entrambe le sostanze. Per entrambe le sostanze è stata determinata una significativa riduzione dell'attività di foraggiamento, e queste conducono a voli più lunghi di foraggiamento a dosi $\geq 0,5$ ng/ape (clothianidin) e $\geq 1,5$ ng/ape (imidacloprid) durante le prime tre ore dopo il trattamento. Per le api che tornano all'alimentatore dopo la somministrazione di 2 ng clothianidin il numero di visite si è ridotto del 74%, mentre le dosi più basse utilizzate per entrambe le sostanze, 0,15 ng (11,5 ppb) per imidacloprid e 0,05 ng per clothianidin, non ha avuto effetto sul numero di visite sull'alimentatore. Ventiquattro ore dopo la somministrazione non sono stati evidenziati effetti sul numero di visite ad eccezione di 6 ng imidacloprid e di 2 ng di clothianidin. Dosaggi di 0,5 ng (38 ppb) influiscono negativamente sul comportamento alimentare, e bassi dosaggi (0,05 ng; 3,8 ppb) possono avere effetti su alcuni aspetti del comportamento di foraggiamento, anche se non hanno avuto effetti significativi sul numero di visite di alimentazione o sul tempo foraggiamento totale. I risultati indicano un impatto più forte del clothianidin rispetto al imidacloprid (Schneider et al., 2012).

Un altro studio ha sperimentato gli effetti dell'imidacloprid su api esposte tramite una monodose a imidacloprid a concentrazioni di 100 ppb, 500 ppb e 1000 ppb. Le api non è stato permesso di tornare all'alveare subito dopo l'ingestione, ma sono state costrette a rimanere in gabbie per 20 minuti tempo sufficiente per consentire al principio attivo di entrare nei fluidi corporei delle api e manifestare il suo effetto.

Le api, dopo l'assunzione, sono state poste in tre gabbie con all'interno la soluzione trattata alle tre concentrazioni più una gabbia con le api di controllo, elemento che potrebbe avere avuto degli effetti

importanti sull'assorbimento della sostanza insetticida. I risultati di questo studio indicano che la concentrazione di 100 ppb provoca un ritardo nel comportamento di ritorno all'alveare, rispetto al controllo. Dopo l'uscita dalla gabbia, quasi la metà delle api necessita di più di cinque ore per tornare all'alveare, mentre la maggior parte delle api di controllo impiega due ore. Le concentrazioni di 500 e 1000 ppb hanno causato la completa scomparsa delle api trattate, che non sono state viste né al alveare, né presso il sito di alimentazione, per 24 ore dopo il test (Bortolotti et al., 2003).

2. SCOPI DELLA PRESENTE TESI

Nell'exkursus sulla letteratura relativa all'effetto degli insetticidi sulle api, in particolare api bottinatrici, emerge una certa nebulosità sui metodi adottati e deduzioni conseguenti.

Nella valutazione dell'esposizione di api bottinatrici a fonti inquinate si deve tener conto che la suzione non avviene una sola volta ma può avvenire in reiterati voli di bottinaggio; la quantità di soluzione zuccherina inquinata ingerita può essere quindi di gran lunga superiore al peso dell'ape. Tuttavia, l'eventuale nettare inquinato è rapidamente rigurgitato dall'ape una volta tornata all'alveare. L'effetto di un insetticida dipende pertanto dalla quantità di nettare ingurgitato, ma allo stesso tempo dalla quantità di principio attivo assunta ed assorbita; questi elementi sono impossibili da valutare in studi di laboratorio, questo ha suggerito lo svolgimento di indagini su bottinatrici in presenza di continui voli tra l'alveare e soluzioni zuccherine contaminate, avvicinandosi il più possibile a quanto avviene in natura nella raccolta su fiori contaminati.

In un precedente tesi (Fantinato, 2014) è emersa una stretta relazione tra concentrazione di insetticida offerta in soluzione zuccherina e tempi di abbandono delle soluzioni contaminate inversamente proporzionale alla concentrazione dell'insetticida; si aggiunga inoltre, che una volta che veniva ripristinata la soluzione zuccherina in alimentatori che precedentemente contenevano soluzione zuccherina addizionata con insetticida, si assisteva ad un ritorno delle api con un progressivo aumento del numero di api.

La sperimentazione riportata apriva dei quesiti che possono essere riassunti nei seguenti punti:

1. Al momento dell'abbandono delle fonti inquinate le api che visitano i siti trattati sono quelle inizialmente presenti o a queste si sono aggiunte altre api, che potrebbero influire sull'interpretazione dei dati, soprattutto una volta iniziato l'abbandono del sito
2. Le api che ritornano nei siti trattati, una volta che viene ripristinata la soluzione zuccherina negli alimentatori, sono le stesse che avevano assunto la soluzione zuccherina contaminata o sono api che hanno iniziato a visitare i siti solo nella fase di post-trattamento
3. Le api che abbandonano il sito con presenza di insetticida, si spostano verso altre fonti di cibo

Grazie alla disponibilità di erogatori verticali in cui le api sono visibili dal dorso su un unico piano, per facilitarne la fotografia ma anche per rendere possibile la marcatura di massa e il facile riconoscimento fotografico delle marcate, si è reso possibile rispondere ai quesiti qui esposti. Per avere una visione più completa di quale possa essere il destino delle api marcate, in seguito all'assunzione di soluzione inquinata, occorrerà terminare l'analisi delle riprese effettuate all'entrata dell'alveare; l'elaborazione di questi dati

permetterà di valutare se le api che non fanno ritorno sulle fonti inquinate rimangano all'interno dell'alveare o vaghino nell'ambiente o siano soggette a mortalità.

3. MATERIALI E METODI

3.1 LUOGO, TIPOLOGIA DI API E GESTIONE DELL' ALVEARE

Durante l'autunno del 2014 sono state effettuate delle prove preliminari presso il Campus di Agripolis dell'Università di Padova (Legnaro (PD)) al fine di sviluppare un metodo di marcatura delle api. Durante dei precedenti lavori di tesi, infatti, è stato sviluppato un sistema sperimentale per valutare la risposta delle api in presenza di fonti inquinate nell'ambiente, tuttavia per fare delle valutazioni più precise su quali siano gli effetti degli insetticidi sul comportamento delle api (in questo caso del neonicotinoide clothianidin) si è ritenuto opportuno lavorare su api marcate in quanto questo offre maggiori possibilità di indagini. Sono stati utilizzati due alveari, l'alveare 1, orientato verso sud, è stato collocato a circa 10 m a sud rispetto alla serra di entomologia, mentre l'alveare 2, posizionato a 200 metri di distanza rispetto al primo, in direzione sud-est, è stato orientato verso ovest (Figura 3.1).



Figura 3.1 Disposizione alveari.

L'alveare 1 era una colonia di *Apis mellifera* di razza ligustica mentre l'alveare 2 era un ibrido. La presenza e consistenza del volo delle bottinatrici è stata monitorata quotidianamente. Il collocamento davanti all'arnia di una struttura con doppia rete, per evitare predazione di uccelli, ha permesso di svolgere un controllo quotidiano della mortalità. Messo a punto il sistema di marcatura, durante l'estate del 2015 sono state svolte delle prove utilizzando un alveare di api ibride. L'alveare è costituito da uno sciame raccolto nel maggio del 2015. Trasportato a Legnaro l'alveare è stato collocato all'interno dell'azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo", nei pressi di un saliceto.

3.2 DESCRIZIONE ALIMENTATORI

Le api sono state abituate a visitare degli alimentatori, utilizzati in un lavoro di tesi precedente (Fantinato, 2014); questi alimentatori garantiscono facilità per le api nel prelievo della soluzione zuccherina contenuta al loro interno e nel contempo permettono una precisa e rapida raccolta dati mediante una fotocamera.

Gli alimentatori sono stati ricavati da fiasche per colture cellulari in polistirene trasparente (Cellarm®) (Figura 3.2). Sono stati eseguiti 9 fori di 1,3-1,5 mm di diametro distanti 1 cm ciascuno alla base di una faccia laterale delle fiasche. Gli alimentatori sono stati posti in campo a gruppi di tre, impilati uno sopra l'altro, mentre una fiasca, priva di fori, era posta come base dei tre alimentatori per offrire alle api la stessa superficie di appoggio, evitando di favorire i due alimentatori posti superiormente. Gli alimentatori sono stati posizionati su strutture alte circa 80 cm, aventi come piano di appoggio una rete metallica rigida, che evitava che eventuali perdite di soluzione si accumulassero e concentrassero alla base degli alimentatori, con il rischio di richiamare un numero elevato di api.

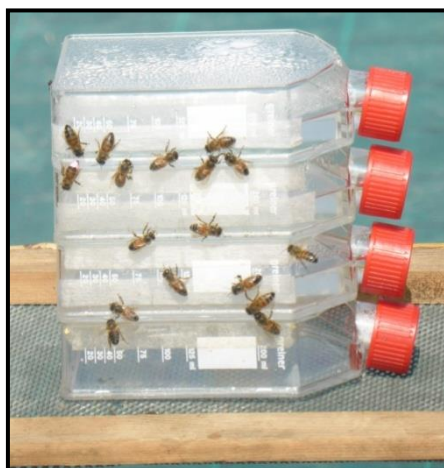


Figura 3.2 Alimentatori (fiasche e supporto in rete)

Le api sono state nutrite con soluzione zuccherina costituita da acqua (di acquedotto) e zucchero; durante lo svolgimento delle prove, la soluzione zuccherina è stata impiegata a differenti concentrazioni 1/4, 1/5, 1/6, di saccarosio/acqua, peso/peso. La concentrazione della soluzione è stata utilizzata come regolatore del numero di visite di api sulle postazioni. Nel caso vi fosse un numero ridotto di api che visitavano gli alimentatori, per la presenza di altre fonti alimentari ricche nell'ambiente circostante (es. fioritura di robinia, tiglio), si aumentava la concentrazione della soluzione zuccherina per avere un numero adeguato di visite che permettesse di svolgere le prove sperimentali; al contrario, nel caso in cui il numero di api presente sugli alimentatori fosse troppo elevato, per carenza di altre fonti alimentari nelle vicinanze, si

diminuiva la concentrazione zuccherina utilizzata. La preparazione della soluzione avveniva misurando il peso delle due componenti con una bilancia di laboratorio.

Per la preparazione delle soluzioni con il neonicotinoide Clothianidin si partiva da una soluzione madre alla concentrazione di 100 ppm. Tale soluzione acquosa è stata preparata pesando un'aliquota di clothianidin puro al 99.7% (Fluka Analytical Pestanal utilizzata per la calibrazione della strumentazione analitica) e dopo averla portata a volume è stata opportunamente sonicata. La soluzione madre è stata conservata in frigorifero a temperatura di 5°C all'interno di un matraccio in vetro.

Il neonicotinoide in soluzione zuccherina è stato utilizzato a diverse concentrazioni: 20, 40, 80, 160 ppb. Per prelevare il volume di soluzione madre, da versare nel volume finale della soluzione, è stata usata una micropipetta Gilson. Nel periodo di svolgimento delle prove sono state svolte verifiche sia sulla soluzione madre per accertare eventuali alterazioni durante la conservazione, sia sulle soluzioni a diverse concentrazioni esposte in campo per verificare eventuali contaminazioni o errori sistematici.

3.3 DESCRIZIONE DEGLI SCHEMI SPERIMENTALI

Prima di procedere con la descrizione delle prove è importante definire alcuni termini specifici utili per una facile e rapida comprensione delle prove svolte.

- **Postazione:** l'insieme di tre alimentatori (più uno di appoggio) e il rispettivo supporto con l'eccezione del sito 2 nel quale ciascuna postazione era composta da due coppie di tre alimentatori;
- **Sito:** l'insieme di una o più postazioni, in questa tesi la maggior parte dei siti erano costituiti da due postazioni, tranne che nel caso del sito 1. Si è arrivati alla scelta di utilizzare due postazioni dopo numerose prove svolte con differenti numeri di postazioni. L'utilizzo di un sito con due postazioni si è dimostrato ottimale per quelli che sono gli obiettivi di questa tesi. Il gruppo di api che visita la postazione si può ritenere rappresentativo della popolazione, in questo modo si ha la possibilità di raccogliere dati più precisi e dettagliati.

Per le sperimentazioni sono stati utilizzati quattro schemi sperimentali, due nelle prove dell'autunno 2014 e due nell'estate del 2015.

Sito 1

Il sito 1 era costituito da sei postazioni situate ad ovest rispetto all'alveare 1. Le postazioni erano distanziate di 1.5 m l'una dall'altra e numerate progressivamente a partire da ovest (W0) (Figura 3.3).

In questo schema sperimentale erano tre le postazioni trattate e tre quelle fungenti da testimone. Il trattamento ha riguardato tre postazioni contigue mentre le tre rimanenti rappresentavano il controllo.

Questo schema è stato utilizzato nelle prove con il Clothianidin in soluzione zuccherina alla concentrazione di 160 ppb.



Figura 3.3.Schema sperimentale 1.

Sito 2

Il sito 2 era costituito da due siti rispettivamente A e B distanti tra loro 5 metri, ma alla stessa distanza dall'alveare circa 15 metri a pochi metri dalla serra di entomologia. In questo caso un postazione veniva trattata, mentre l'altra fungeva da testimone. Ogni postazione era situata all'esterno di una gabbia realizzata con un tessuto a maglie strette di colore bianco, ciascun sito era costituito da due postazioni poste a pochi centimetri una dall'altra, ed entrambe appoggiate su una rete metallica rigida collocata al di sopra di un tubo in cemento alto circa 1 metro.

Sito 3

Il sito 3 era costituito da due postazioni ognuna delle postazioni presentava 3 alimentatori. Le postazioni erano rispettivamente distanti tra loro 20 metri circa e entrambi erano poste a 50 metri dall'alveare. Le due postazioni erano collocate sotto i salici presenti nelle vicinanze dell'alveare riducendo in questo modo il rischio che api di altri alveari presenti nella zona nei loro voli di ricognizione trovassero gli alimentatori (Figura 3.4).

Sito 4

Il sito 4 era costituito da due postazioni, rispettivamente distanti tra loro 100 metri circa e entrambi a 500 metri a sud dall'alveare posizionato sotto il saliceto. I due siti erano collocati sui bordi di un campo di barbabietole confinante ad ovest con l'argine del fiume (Figura3.4).



Figura 3.4 Siti 3 e 4.

3.4 DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA DI ATTIVAZIONE E GESTIONE DEGLI ALIMENTATORI

Per attivazione si intende sia la messa in funzione iniziale del sistema sperimentale (addestramento api) sia l'attivazione giornaliera delle postazioni.

Per addestrare le api a bottinare sugli alimentatori nella posizione definitiva di ciascun sito sperimentale, si è proceduto nel seguente modo: sono stati posizionati alcuni alimentatori contenenti soluzione zuccherina satura sul predellino dell'arnia e, una volta che le api hanno riconosciuto l'alimentatore come una nuova fonte di cibo, sono stati allontanati progressivamente dall'arnia fino al raggiungimento della posizione finale. Per rendere più rapido il riconoscimento della posizione successiva, nella fase di spostamento si cercava di mantenere alcune api sull'alimentatore evitando di scuoterlo.

L'avviamento giornaliero delle prove avveniva nel tardo mattino e consisteva nel riempimento degli alimentatori con la soluzione zuccherina ad una concentrazione dipendente dalle altre fonti alimentari presenti in quel periodo nell'ambiente circostante. Terminata l'operazione di riempimento, si procedeva al posizionamento degli alimentatori nelle rispettive postazioni.

A circa mezz'ora dall'attivazione, il tempo necessario per stabilizzare il numero di api, nelle postazioni che fungevano da trattato, veniva sostituita la soluzione zuccherina negli alimentatori con una soluzione zuccherina contenente il neonicotinoide, a seconda delle prove la soluzione zuccherina poteva essere ripristinata anche nella postazione controllo oppure raggiunto il tempo prefissato di esposizione si ritiravano gli alimentatori da entrambe le postazioni.

Durante la fase di sostituzione, si è cercato di uniformare il disturbo causato alle api nelle postazioni. Al momento del posizionamento dell'insetticida all'interno dell'alimentatore, si svolgeva la contemporanea

sostituzione negli alimentatori presenti nella postazione testimone solo con soluzione zuccherina. A seguito della sostituzioni si procedeva ad un lavaggio rapido di tutte le postazioni con acqua, tramite un nebulizzatore, per eliminare eventuali fuoriuscite sulle superfici esterne degli alimentatori o sulla griglia di supporto.

Al termine della fase giornaliera di campionamento, venivano raccolti gli alimentatori per evitare sia un eccessivo accumulo di risorse nell'alveare sia perdite di liquido il giorno seguente, dovute all'escursione termica con dilatazione dell'aria negli alimentatori.

Ogni giorno gli alimentatori raccolti, al termine delle prove, venivano svuotati dalla soluzione rimasta al loro interno, ed effettuati tre lavaggi per ciascun contenitore e lasciati ad asciugare. Inoltre, con un intervallo di circa quindici giorni, si eseguiva un lavaggio con soda caustica (NaOH) in scaglie per eliminare eventuale biofilm presente ed altre impurità presenti sulla superficie interna ed esterna degli alimentatori.

Nei giorni in cui non si svolgevano le prove, si posizionavano ugualmente gli alimentatori con soluzione zuccherina alla stessa concentrazione in tutte le postazioni al fine di evitare la diminuzione o l'abbandono da parte delle api bottinatrici.

Mentre il giorno successivo ad ogni prova in cui era stato effettuato il trattamento, veniva ristabilita la situazione iniziale con lo stesso rapporto saccarosio/acqua in entrambi i siti e venivano effettuate foto ogni 2-10 minuti circa per la durata di due o tre ore; onde avere un controllo della situazione per verificare se era presente un effettivo calo di viste dovuto al trattamento precedente.

Per ogni concentrazione sono state svolte numerose prove per diminuire le possibili influenze esterne (condizioni climatiche, numero di api presenti nell'alveare e presenza di altri interferenti quali le vespe e le formiche). In tal modo è stato possibile ottenere un numero elevato di ripetizioni omogenee.

3.5 LA MARCATURA DI MASSA

In questa tesi riveste grande importanza l'innovativo metodo di marcatura delle api, rispetto ai metodi utilizzati nelle precedenti studi, che ha permesso di meglio comprendere gli effetti dovuti al Clothianidin seguendo il comportamento di gruppi numerosi di api riconoscibili.

Per l'operazione di marcatura sono state utilizzate delle miscele colorate contenenti: bianchetto (biossido di titanio, solvente e disperdente), smalto per unghie (nitrocellulosa, acetato di butile, toluene).

Le api sono state marcate utilizzando un puntale da pipetta con funzione di erogatore.

Le api venivano marcate mentre assumevano la soluzione zuccherina dagli alimentatori; esse venivano marcate sulla parte dorsale del torace o dell'addome. L'operazione di marcatura durava in media dalle due alle tre ore e avveniva il giorno prima della prova stabilita. Tutte le api che si posavano sugli alimentatori per bottinare venivano marcate allo stesso modo tramite una macchia circolare, il sito trattato e il sito

testimone presentavano un colore diverso, nella maggior parte dei casi è stato usato il colore rosa e verde, perché non c'era la necessità di distinguere ogni ape individualmente come avveniva nelle ricerche precedenti; l'interesse era focalizzato ad avere una risposta di gruppo sulle api bottinatrici. Tale operazione richiedeva una marcatura di almeno 100-200 api circa per sito a seconda della concentrazione della soluzione zuccherina e delle variabili ambientali ed atmosferiche che si presentavano nei giorni precedenti alle prove. Durante la marcatura sono state effettuate alcune pause per permettere alle api presenti di continuare ad approvvigionarsi senza subire stress che implicassero l'abbandono parziale delle postazioni. Solo in alcuni casi venivano appositamente marcate delle api in modo particolare per renderle distinguibili dalla massa perché in futuro analizzando nuovamente alcuni dati si potessero ottenere nuove informazioni come i tempi di ritorno dall'alveare al sito.

Per avere la certezza che le api appartenessero al nostro alveare, oltre alle osservazioni effettuate sulle postazioni per ogni prova, è stata posta una telecamera di fronte all'alveare, che ha permesso di confermare la provenienza delle api marcate. Ciò può essere utile per ottenere dei confronti in rapporti percentuali tra le api marcate e quelle non marcate di incerta provenienza. Tali dati sono ancora in corso di elaborazione.

3.6 METODO DI COSTRUZIONE DEI GRAFICI.

I risultati, presentati nel capitolo 4, sono stati divisi in funzione della concentrazione di Clothianidin utilizzata, e successivamente descritti nei sotto-paragrafi in base all'epoca in cui si sono svolte le prove. Questa metodologia ci permette di comprendere meglio come i numerosi e variabili parametri abbiano influito sul comportamento delle api. Oltre ad analizzare gli effetti nelle diverse stagioni dell'anno, sono state effettuate prove a diverse distanze dall'alveare.

Per ciascuna concentrazione di insetticida utilizzata nelle prove, vengono riportati i grafici dei quali in questa premessa si descrivono le caratteristiche per facilitarne la lettura. Nei grafici le rette verticali continue di colore nero indicano il momento in cui è stata collocata la soluzione zuccherina contenente l'insetticida; in alcuni grafici è presente una seconda retta verticale tratteggiata che indica il momento in cui sono state ripristinate le soluzioni zuccherine senza insetticida, negli alimentatori delle postazioni trattate. Nella maggior parte dei grafici sono presenti almeno tre serie di punti che indicano l'andamento del numero di api contate sugli alimentatori, ciascuna serie di punti ha permesso di ottenere una linea polinomiale: la linea di colore nero è sempre riferita alle api non marcate; sono poi presenti una linea che è riferita alle api marcate nel sito stesso (queste sono denominate api dominanti) e una linea che rappresenta l'andamento delle api marcate in un'altra postazione. Per molte delle prove effettuate, vengono riportati i grafici riguardanti: la postazione trattata con l'insetticida, e l'altra postazione che

fungeva da testimone nel giorno del trattamento; per la maggior parte delle prove nella quale una postazione veniva trattata si presentano anche i grafici riferiti ai rilievi svolti al giorno successivo, quando in entrambe le postazioni gli alimentatori erano caricati con soluzione zuccherina.

Per quanto riguarda la concentrazione di 20ppb di Clothianidin si presenta una sola prova perché tale concentrazione è stata sperimentata in tesi precedenti, e ciò aveva consentito di evidenziare che le dosi critiche sono 40 e 80 ppb. Al di sotto dei 40 ppb si ottengono risposte lunghe e non totali; mentre per concentrazioni maggiori le risposte sono quasi immediate. In questa tesi sono state testate le risposte alle seguenti concentrazioni di Clothianidin: 20 ppb; 40 ppb; 80 ppb; e alcune prove preliminari, effettuate anche per verificare il nuovo metodo di marcatura, a 160 ppb.

3.6.1 Raccolta e gestione dati.

L'informazione da raccogliere durante le prove era il numero di api bottinatrici presenti contemporaneamente su ogni postazione. Questa informazione veniva raccolta fotografando gli alimentatori con un fotocamera digitale Panasonic Lumix DMC-TZ40. I rilievi iniziavano verso le ore 14:00 e terminavano verso le ore 18:00 circa. Le osservazioni venivano effettuate, per ogni postazione, con una frequenza che poteva variare a seconda della prova dai 2 ai 10 minuti circa. Durante i rilievi si cercava di creare il minimo disturbo alle api. In seguito le foto sono state analizzate al computer, le api sono state suddivise in più categorie: api del colore predominante nel sito trattato ; api non marcate ; api del colore predominante nel sito non trattato. Nelle foto del sito sperimentale 2 le api delle due postazione vicine sono state sommate e come dato finale da inserire nel grafico è stata presa la media tra le due postazioni. Negli altri siti sperimentali, che presentavano una singola postazione, sono stati considerati il numero assoluto di api per ciascuna postazione per la realizzazione dei grafici. In ogni foto sono state considerate e quindi conteggiate solo le api che erano appoggiate sulla superficie verticale dei 3 alimentatori; inoltre sono state raccolte tutte le sigle identificative di ogni foto e i rispettivi orari in cui sono state scattate. Tutti i dati provenienti dall'analisi delle fotografie sono stati elaborati con MS Excel.

3.6.2 Precisazioni sull'analisi statistica.

Le curve rappresentative del numero di api nel tempo (nei grafici inseriti nella parte risultati) corrispondono a polinomiali di quarto grado.

Gli intervalli fiduciali, presenti in precedenti tesi (Fantinato, 2014), non sono stati riportati in attesa di elaborazioni più appropriate in corso di analisi. Le bande di errore riportate nelle figure 4.49 - 4.57 (salvo diversa precisazione) si riferiscono all'errore standard.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Prove preliminari di marcatura con 80 e 160 ppb nell'autunno 2014.

Nell'autunno del 2014 è stata svolta una prova nel sito 1, le api in questo caso venivano per la maggior parte da alveari presenti nelle vicinanze posti ad una distanza di almeno 300 metri, impiegando una concentrazione di Clothianidin a 160 ppb nella soluzione zuccherina, per verificare la risposta delle api e mettere a punto un metodo di marcatura efficiente. I grafici, sopra riportati, rappresentano ciascuno la media di api non marcate per postazione; erano presenti 3 postazioni in presenza dell'insetticida e 3 postazioni non trattate. Le api marcate non sono state evidenziate nei grafici a causa della loro esigua numerosità, il metodo di marcatura in quel periodo era ancora nelle sue fasi preliminari e necessitava di alcuni perfezionamenti.

Nella Figura 4.1 si può notare come l'abbandono, da parte delle api non marcate di ignota provenienza, delle postazioni trattate con 160 ppb sia quasi immediato. Il trattamento, iniziato nel minuto 61, è durato 40 minuti; il picco di presenza di api si è avuto pochi minuti dopo l'immissione dell'insetticida e il calo avviene subito dopo, nell'arco di 35 minuti la media cala da 14 a 2 per toccare il minimo poco dopo il ripristino della sola soluzione zuccherina. Passati circa 150 minuti dal ripristino della soluzione, le api tornano nelle postazioni ma in numero minore rispetto all'inizio della prova attestandosi verso la media di 4 api per postazione.

La figura 4.2 rappresenta la media dei testimoni, cioè le postazioni nelle quali gli alimentatori contenevano solo la soluzione zuccherina. Si può chiaramente notare come il numero medio di api non marcate per postazione rimanga pressoché costante intorno al valore 8 per l'intera durata della prova che si è svolta nell'arco di 5 ore.

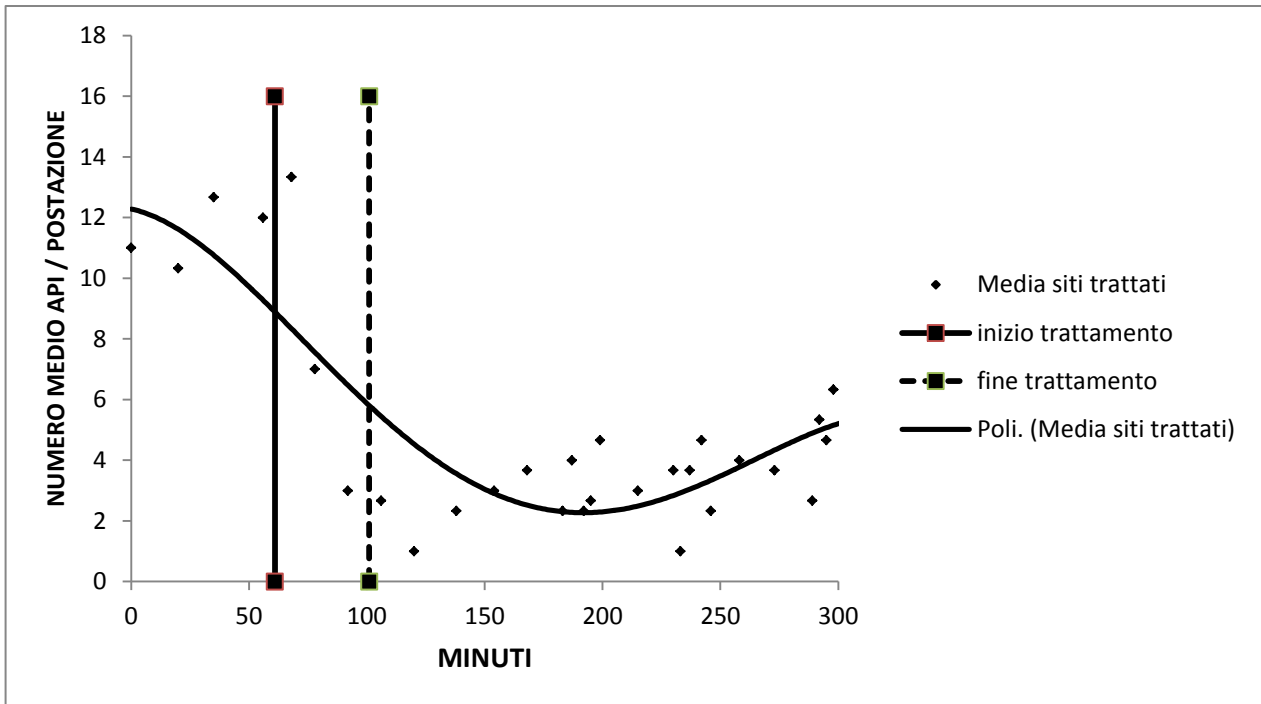


Figura 4.1. Sito 1, (distanza superiore ai 300 metri dall'alveare, 16.09.14) in presenza di Clothianidin 160 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate.

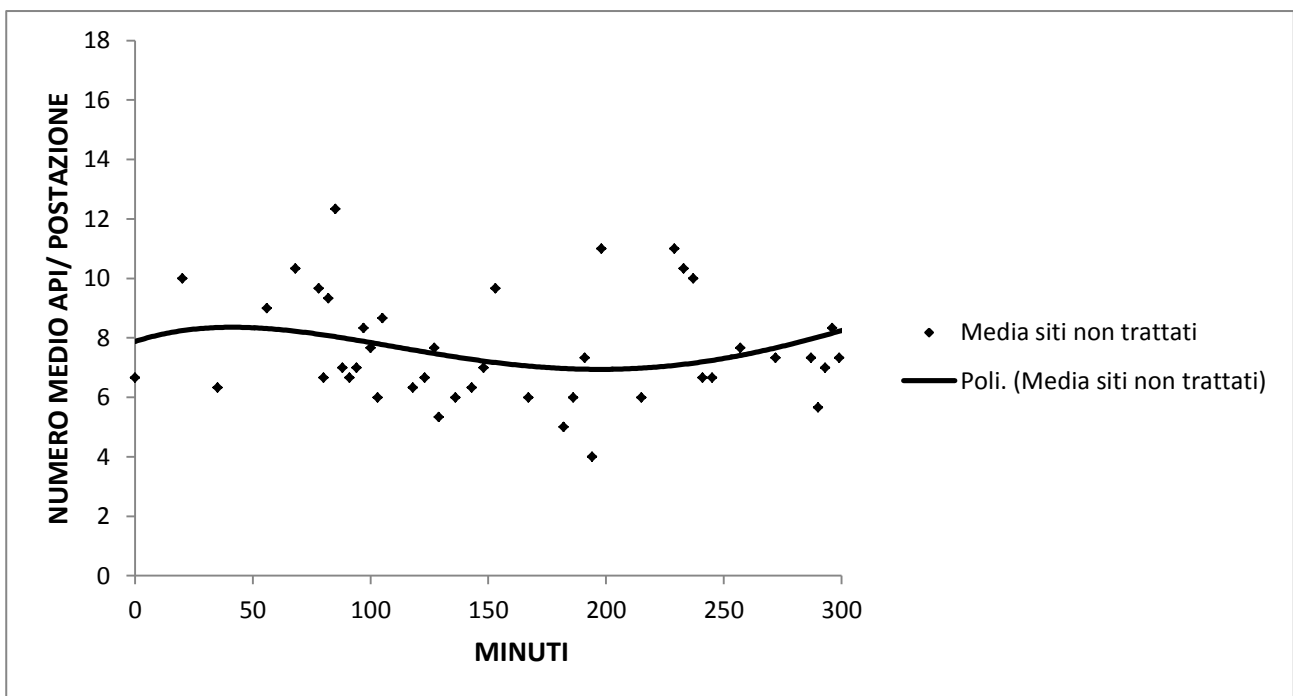


Figura 4.2. Sito 1, (distanza superiore ai 300 metri dall'alveare, 16.09.14) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate.

Sempre nell'autunno del 2014 è stata svolta un'altra prova preliminare nello stesso sito dove era stata eseguita la prova a 160 ppb, in questo caso con una concentrazione di 80 ppb nella soluzione zuccherina. Anche in questo caso le api dominanti nelle postazioni erano di origine ignota, mentre le api marcate erano

ancora in numero esiguo. A differenza della prova precedentemente descritta, in questa viene considerato il numero di api su una singola postazione.

Nella figura 4.3 è rappresentata la situazione della postazione con la presenza dell'insetticida a 80 ppb. L'inizio del trattamento con l'insetticida inizia al minuto 0, contemporaneamente allo scatto della prima foto, il ripristino della soluzione zuccherina avviene dopo 30 minuti; si può evidenziare, grazie alla curva, come all'inizio si verifichi un progressivo aumento del numero di api per poi assistere dopo circa mezz'ora dall'inizio del trattamento ad un calo abbastanza rapido del numero di api, in questo caso il dimezzamento del numero di api sulla postazione trattata si ha dopo circa 40 minuti.

Una volta ripristinata la soluzione zuccherina le api non marcate tornano a visitare la postazione dopo circa altri 40 minuti, e si stabilizzano poco al di sopra della soglia di dimezzamento.

Nella figura 4.4 viene riportata la situazione nella postazione del testimone (assenza di insetticida), a differenza della postazione che ha subito il trattamento, il numero di api si mantiene costante intorno alle 16 api in media.

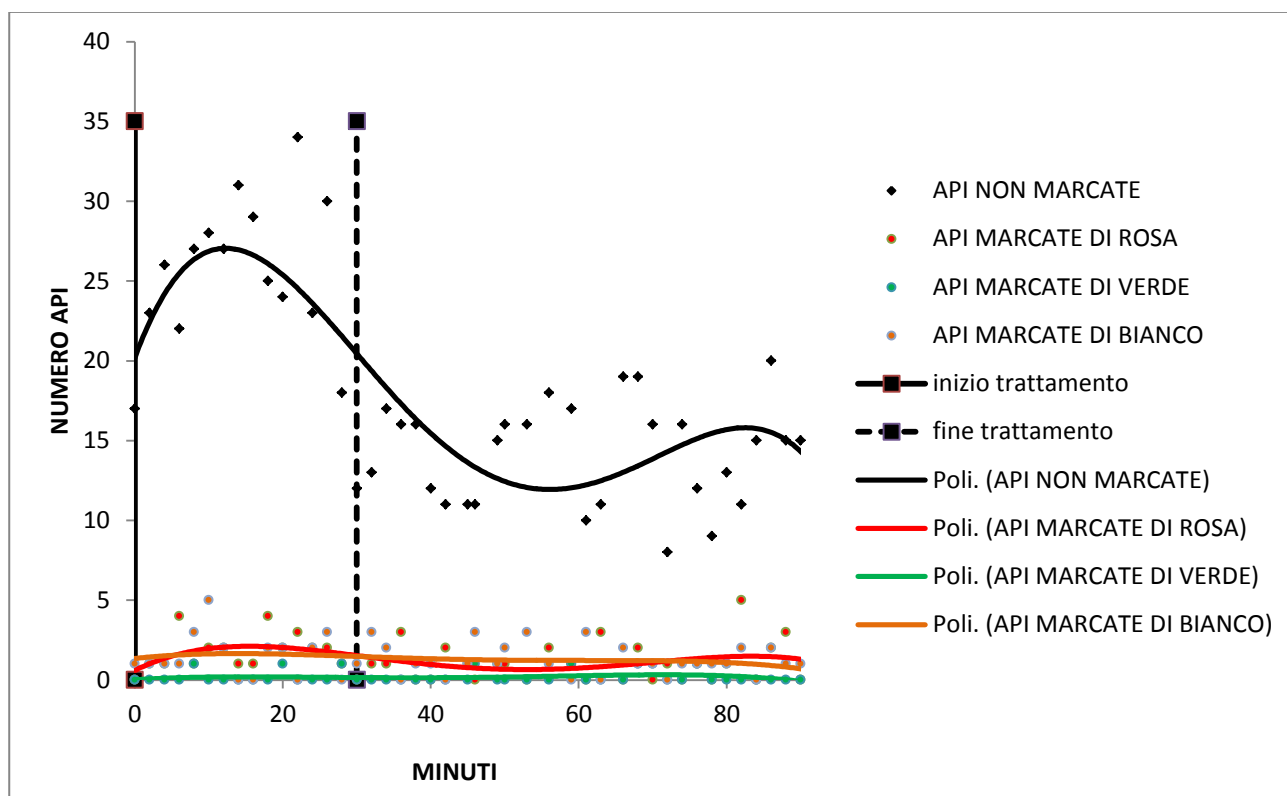


Figura 4.3. Sito 1, (distanza superiore ai 300 metri dall'alveare, 19.09.14) in presenza di Clothianidin 80 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate.

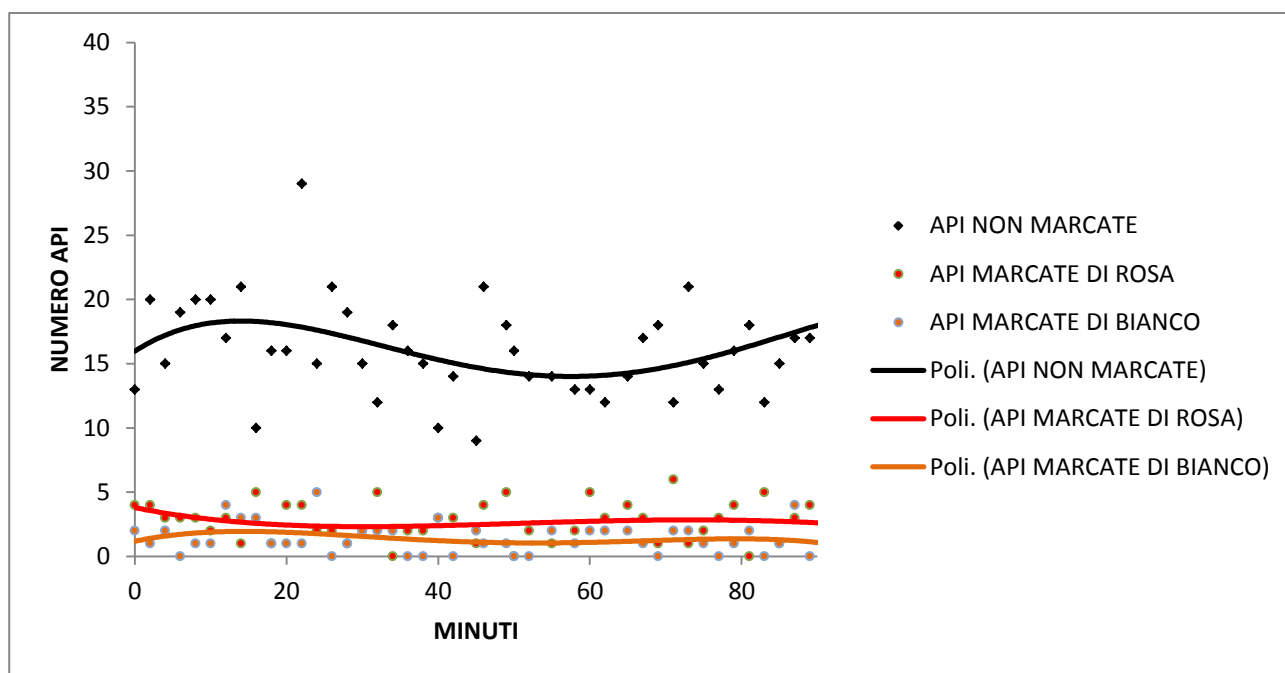


Figura 4.4. Sito 1, (distanza superiore ai 300 metri dall'alveare, 19.09.14) in assenza di Clothianidin
Il colore nero indica api non marcate.

4.2 Prove con concentrazione di insetticida di 20 ppb.

Per la concentrazione a 20 ppb è stata effettuata una sola prova perché tale concentrazione era già stata verificata in precedenti tesi, ma è stata comunque eseguita per dare una visione globale della risposta delle api all'insetticida. Come si può vedere dai grafici le api marcate rappresentano la grande maggioranza delle api che visitano le postazioni, a differenza delle prove descritte nel paragrafo precedente quando le api marcate erano un numero esiguo rispetto alla api totali.

La prova si è svolta nella seconda metà di agosto 2015 nel sito 3, quello a 50 metri dall'alveare.

Dalla figura 4.5 che rappresenta la postazione che ha subito il trattamento, si può vedere che il calo nel numero di api marcate è avvenuto progressivamente in modo costante fino a giungere, a 240 minuti dall'inizio della prova, ad attestarsi attorno a cinque api negli ultimi rilievi. La durata del trattamento ha riguardato quasi la totalità della prova.

Come si può notare dal grafico del testimone, Figura 4.6, effettuata in contemporanea in una postazione a 25 metri da quella trattata, il numero di api marcate di rosa, quelle dominanti in questa postazione, si mantiene costante tra le 10 e le 15 senza evidenziare diminuzioni, pur variando nel numero a causa delle condizioni climatiche che sono in grado di influenzare il numero di visite delle api nelle postazioni. Si nota anche una lenta crescita delle api non marcate verso la fine della prova, ciò è dovuto all'individuazione del sito da parte di queste.

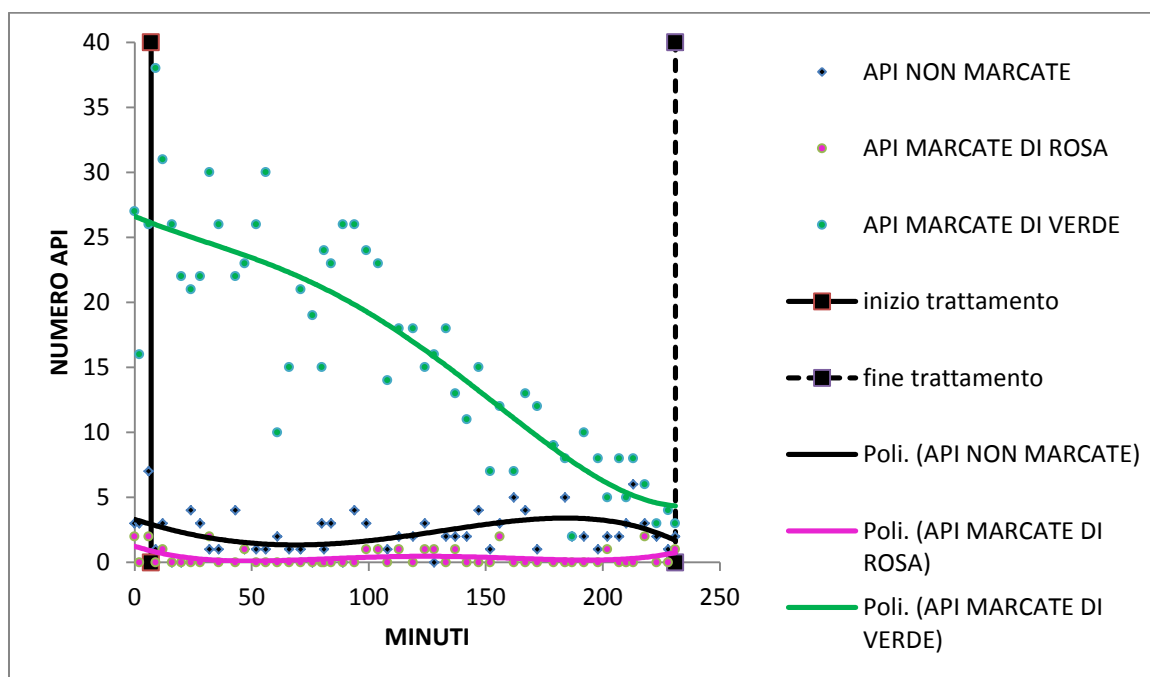


Figura 4.5. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 20.08.15) in presenza di Clothianidin 20 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosso indica api marcate in un'altra postazione.

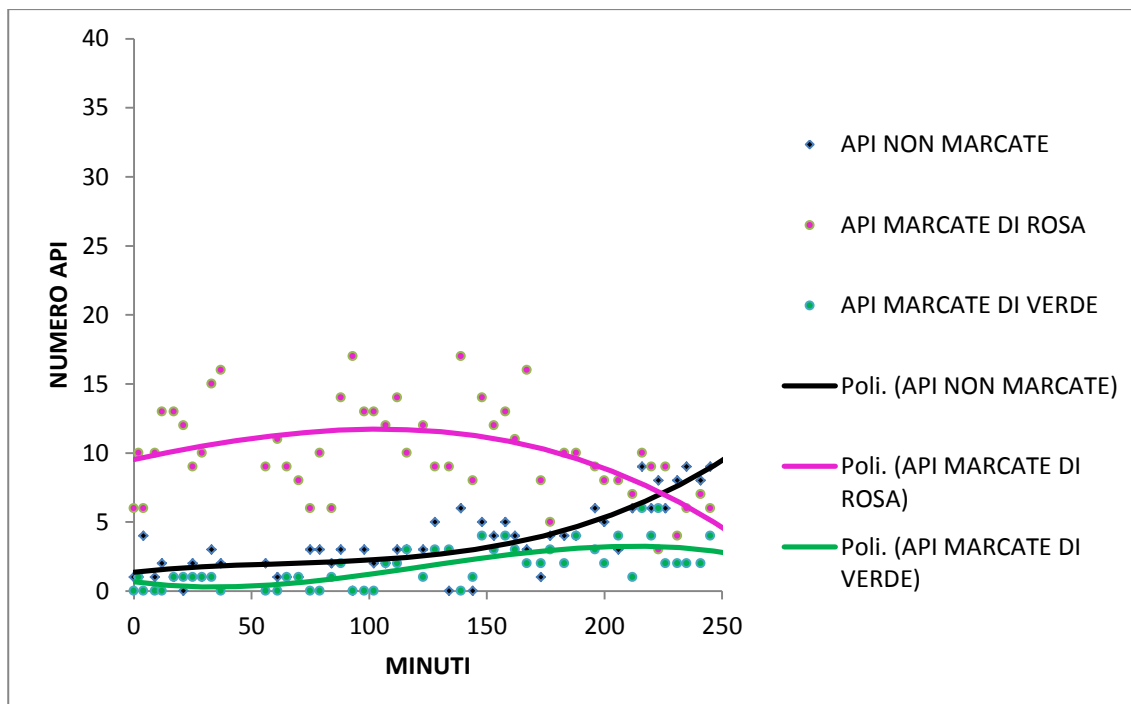


Figura 4.6. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 20.08.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosso indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

Nella figura 4.7 viene presentato il grafico di controllo della postazione che era stata trattata il giorno prima. Si nota che il numero di api marcate di verde (dominanti) nella fase iniziale è di poco più elevato rispetto al giorno precedente, e si mantiene costante durante la prova, stessa cosa succede alle api non marcate. Nella figura 4.8 si riporta il grafico che fa riferimento alla postazione di controllo del testimone, in questo caso il numero delle api nella postazione è simile al giorno precedente, anche se verso la fine della prova si assiste ad un calo, dovuto in questo frangente al disturbo provocato dal rinnovo della soluzione zuccherina in prossimità della conclusione della prova.

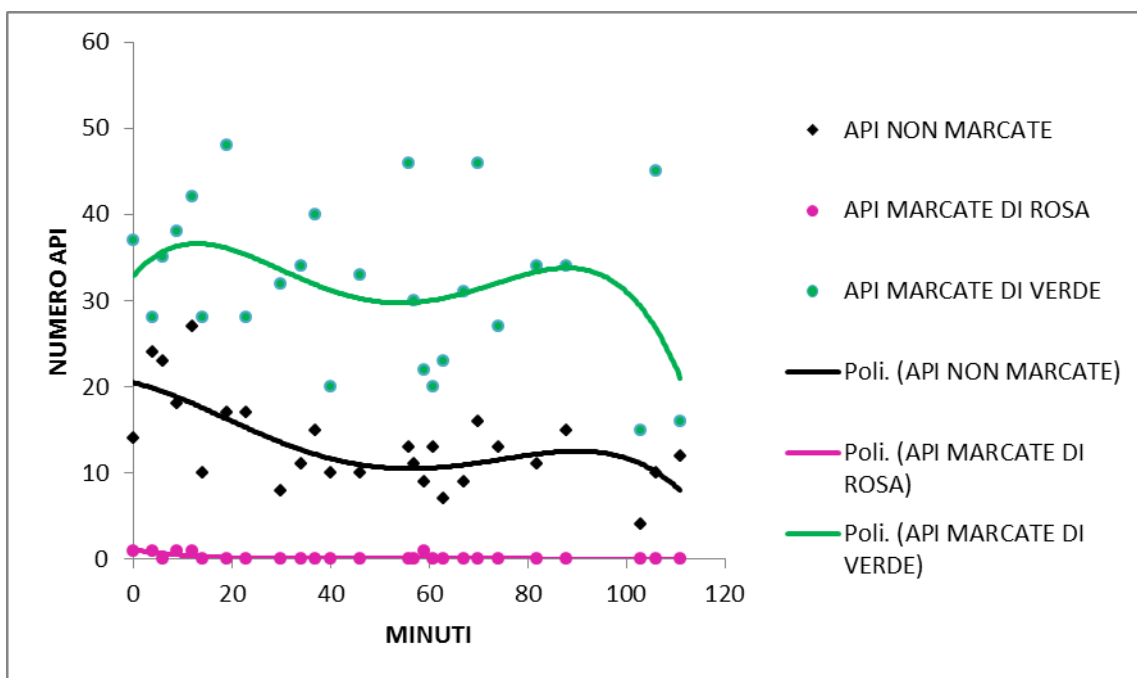


Figura 4.7. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 21.08.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosso indica api marcate in un'altra postazione. Postazione di controllo del trattato.

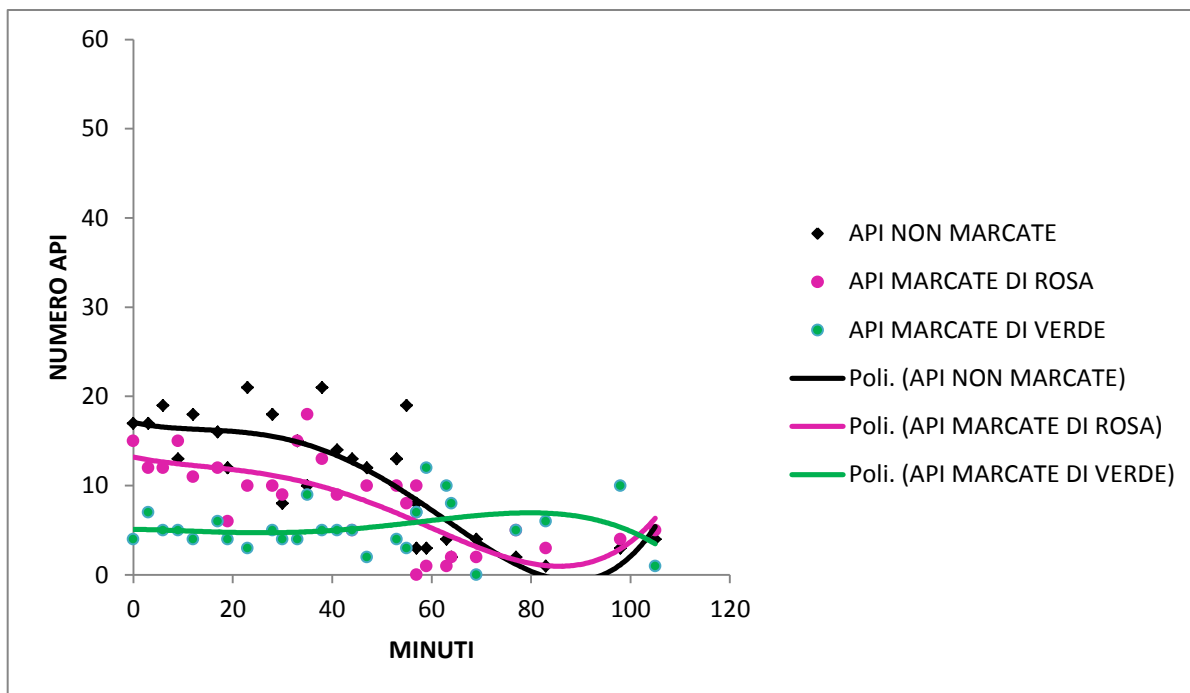


Figura 4.8. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 21.08.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosso indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. Postazione di controllo del testimone.

4.3 PROVE CON CONCENTRAZIONE DI INSETTICIDA DI 40 ppb.

Le prove eseguite alla concentrazione di 40 ppb di Clothianidin sono suddivise in 2 prove svolte nell'autunno 2014 e 4 prove svolte nell'estate 2015.

4.3.1 Prove con concentrazione di insetticida di 40 ppb autunno del 2014.

Le prove con 40 ppb si sono svolte negli ultimi giorni di settembre e primi giorni di ottobre nel sito 2 posizionato a 15 metri dall'alveare. I grafici in seguito mostrati rappresentano la media delle api presenti nelle due postazioni, posizionate a una decina di centimetri una dall'altra. In queste prove non sono stati eseguiti i controlli delle postazioni nel giorno successivo.

Nella figura 4.9 si può evidenziare, dai rilievi fotografici effettuati ogni 2 minuti, come le api, dopo aver raggiunto il numero massimo di 35 in media a 10 minuti dall'immissione dell'insetticida, iniziano a calare abbastanza velocemente. Il numero di api marcate di rosa continuano a calare dimezzandosi dopo 35 minuti circa, e toccando il minimo dopo circa 50 minuti dall'inizio del trattamento. Con il ripristino della soluzione zuccherina, dopo 30 minuti di trattamento, tornano lentamente a visitare le postazioni, ma senza raggiungere i valori iniziali. Il calo e poi la lenta ripresa è confermata anche per la curva riferita alle api non marcate.

Come è evidenziato dalla figura 4.10, nella postazione controllo, il comportamento delle api marcate e non marcate è simile, infatti in loro numero non presenta cali ed è costante per tutta la durata della prova.

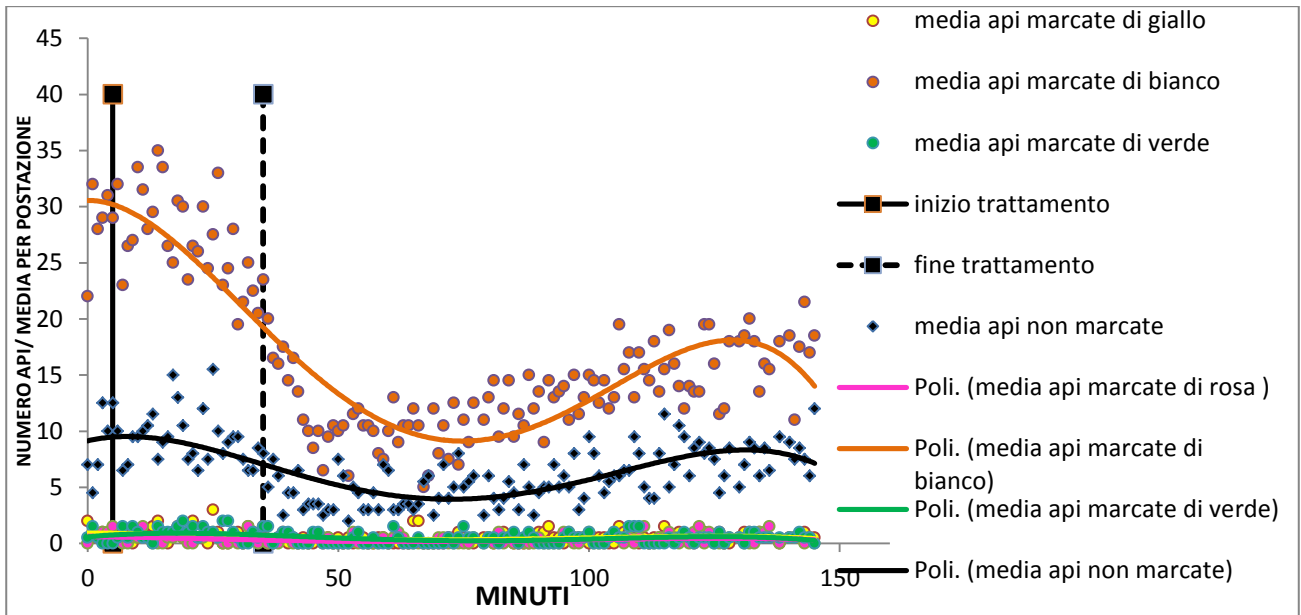


Figura 4.9. Sito 2, (15 metri dall'alveare, 30.09.14) in presenza di Clothianidin 40 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore bianco indica api marcate nella stessa postazione.

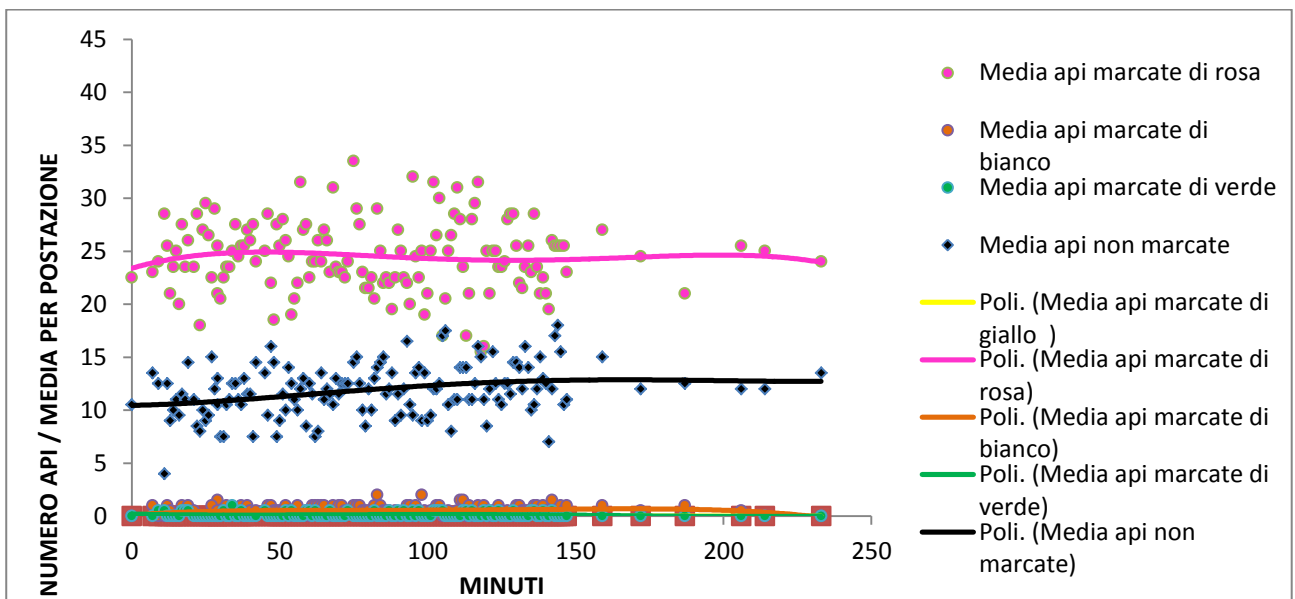


Figura 4.10. Sito 2, (15 metri dall'alveare, 30.09.14) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore bianco indica api marcate nella stessa postazione

Dalla figura 4.11 si osserva un aumento del numero medio di api marcate di rosa nei primi 50 minuti in cui non era presente il Clothianidin. Il picco massimo si raggiunge dopo 10 minuti dall'inizio del trattamento, in seguito inizia un calo abbastanza rapido delle visite fino alla completa scomparsa di tutte le api dopo circa 125 minuti dall'inizio della prova. Il trattamento è durato 50 minuti, il dimezzamento si è verificato a 35 minuti circa.

Dal grafico del testimone, figura 4.12, si nota come in assenza di insetticida il numero sia delle api marcate sia di quelle non marcate si mantenga costante nelle visite per l'intera prova.

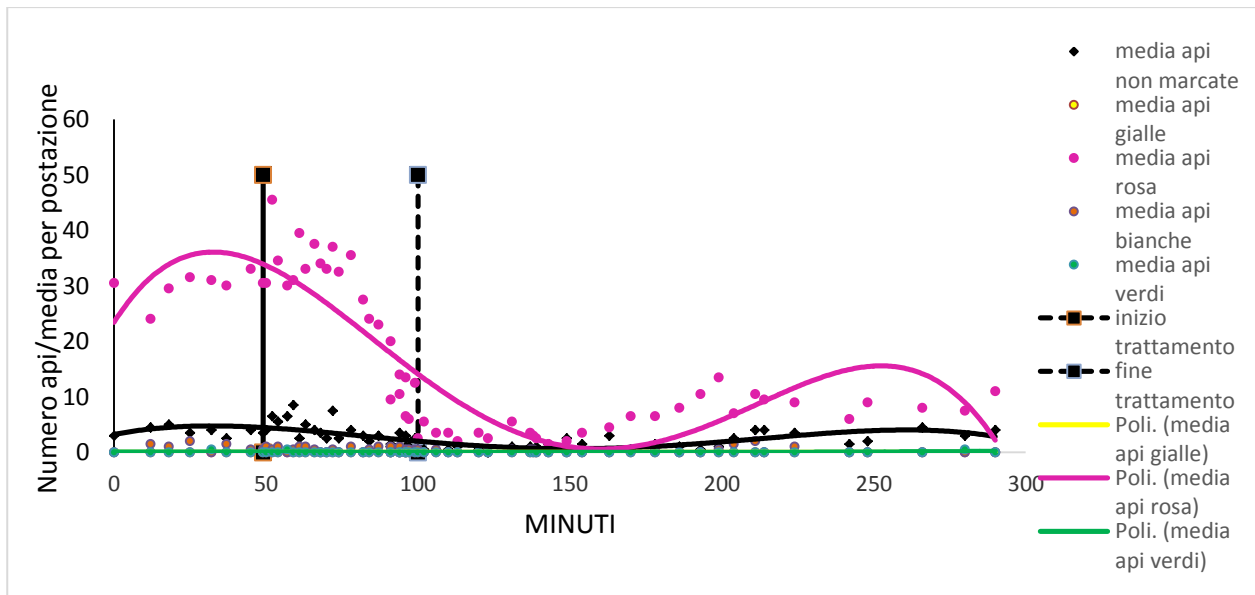


Figura 4.11. Sito 2, (15 metri dall'alveare, 03.10.14) in presenza di Clothianidin 40 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione.

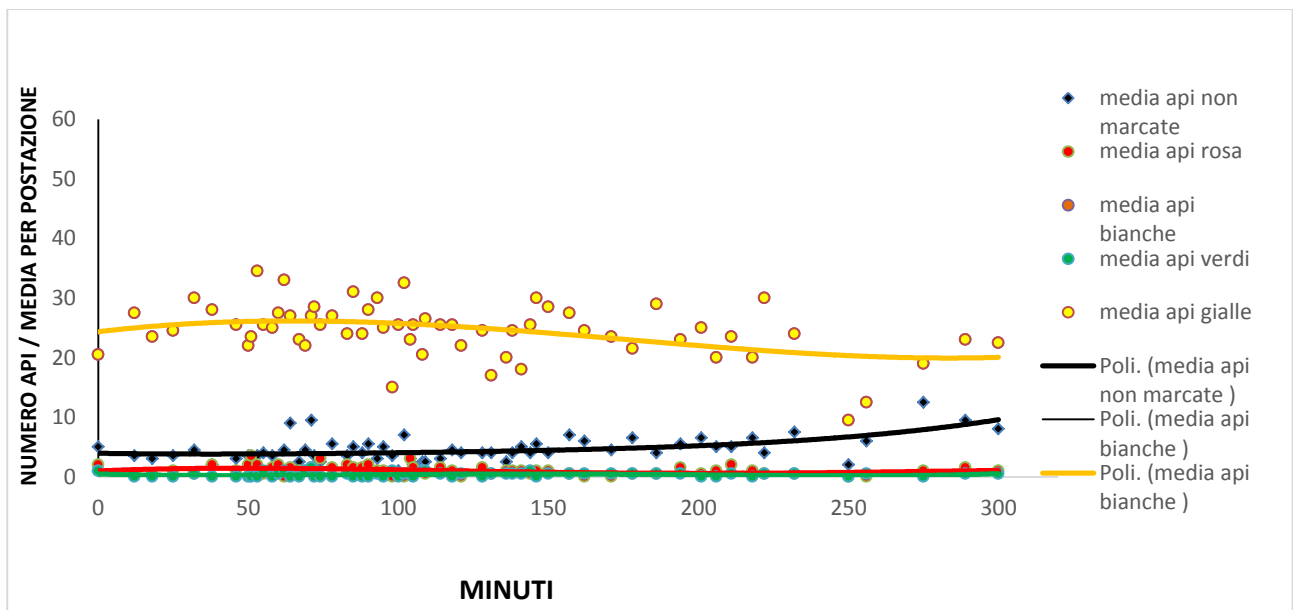


Figura 4.12. Sito 2, (15 metri dall'alveare, 03.10.14) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore giallo indica api marcate nella stessa postazione.

4.3.2 Prove con concentrazione di insetticida di 40 ppb estate del 2015.

Quattro prove si sono svolte nell'estate 2015, le prime tre prove nel sito 3 a 50 metri dall'alveare mentre l'ultima nel sito 4 a 500 metri dall'alveare. Per ogni prova eseguita è stato effettuato il controllo del trattato e del testimone il giorno seguente; inoltre per la prova del 7 luglio 2015 viene riportato anche il secondo giorno di controllo.

Come mostrato dalla figura 4.13 la durata del trattamento è di un'ora, comincia dopo 20 minuti dall'inizio della prova. In questo caso si assiste, rispetto alle prove effettuate nell'autunno 2014, ad una diminuzione del numero di api in tempi più lunghi; il dimezzamento delle visite avviene solo un'ora dopo dall'immissione dell'insetticida, inoltre non si assiste ad un azzeramento delle visite. Anche il recupero delle visite si dimostra altrettanto lento.

Nella figura 4.14 viene presentato il testimone; le curve riferite alle api rosa dominanti nel sito e quelle non marcate presentano un andamento parallelo e tendono leggermente ad aumentare verso la conclusione della prova.

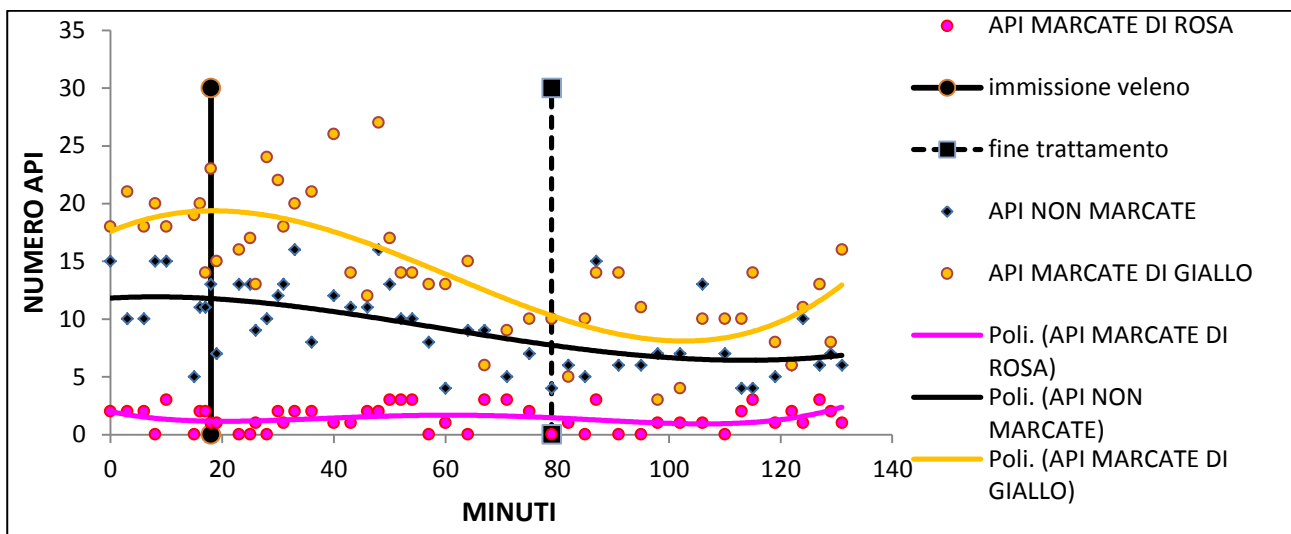


Figura 4.13. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 25.06.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore giallo indica api marcate nella stessa postazione. Il colore viola indica api marcate in un'altra postazione.

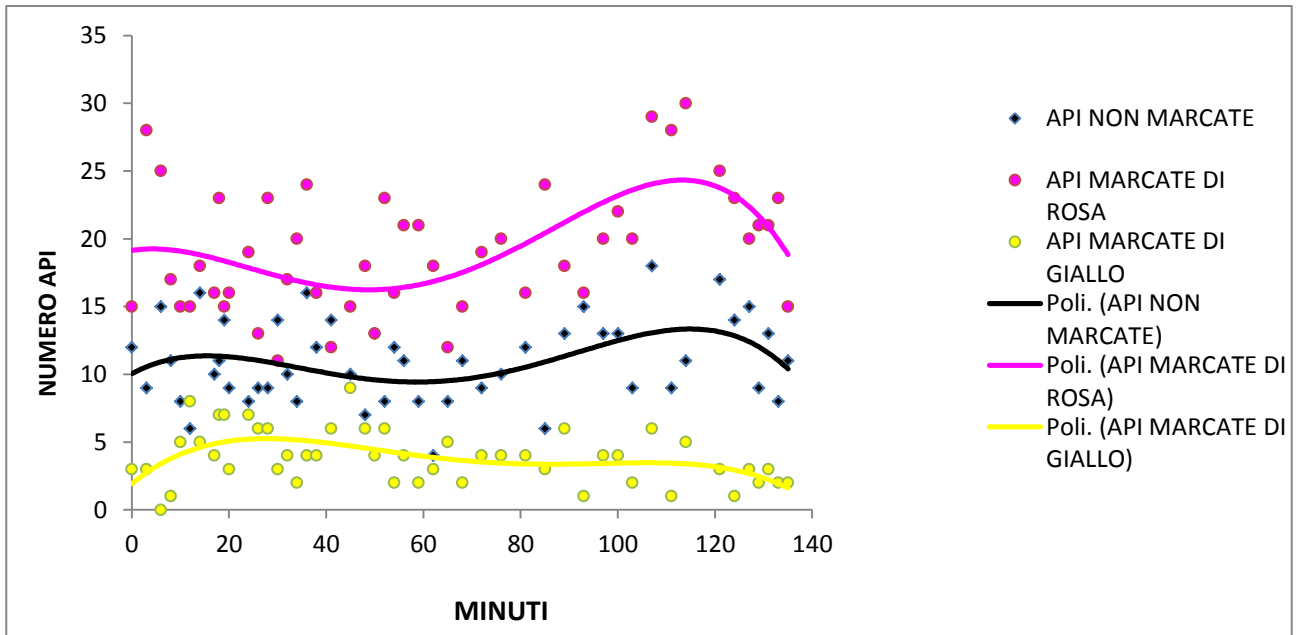


Figura 4.14. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 25.06.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore viola indica api marcate nella stessa postazione. Il colore giallo indica api marcate in un'altra postazione.

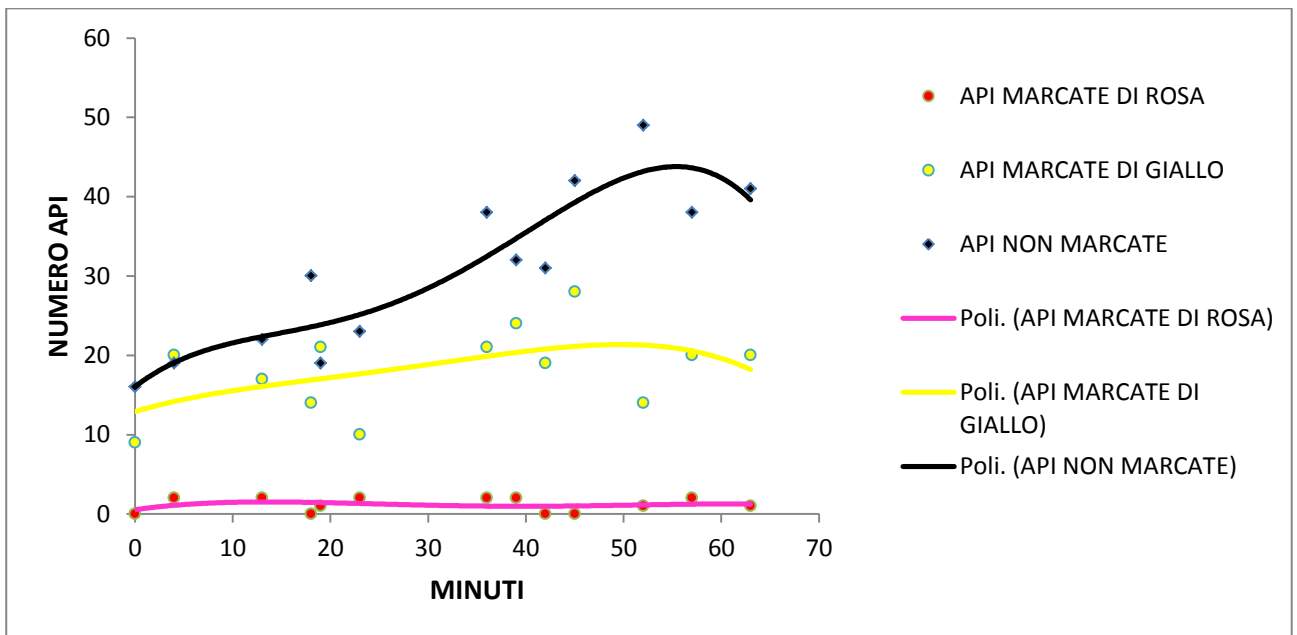


Figura 4.15. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 26.06.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore giallo indica api marcate nella stessa postazione. Il colore viola indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del trattato.

Le figure 4.15 e la 4.16 rappresentano il giorno successivo rispettivamente della postazione trattata e quella del testimone. In entrambi i casi il numero di api dominanti in ciascuna postazione rimane stabile per tutta la durata della prova attestandosi a 13 api circa presenti in ogni postazione.

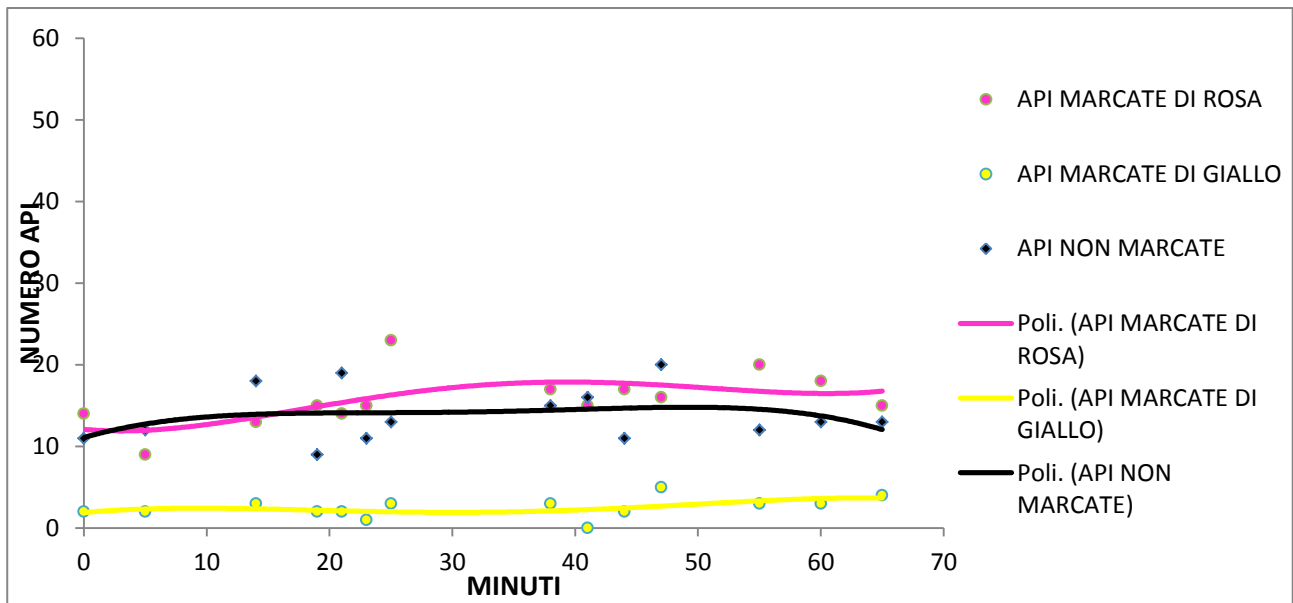


Figura 4.16. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 26.06.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore viola indica api marcate nella stessa postazione. Il colore giallo indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del testimone.

Nella figura 4.17 si nota chiaramente la risposta delle api all'insetticida, il trattamento inizia a 20 minuti dal primo rilievo e dura per 140 minuti, il picco di visite viene raggiunto dopo 20 minuti di trattamento e poi inizia il calo, il dimezzamento viene raggiunto dopo 30 minuti dall'immissione dell'insetticida e la totale scomparsa delle api marcate avviene dopo 115 minuti. Dopo 150 minuti di prova viene ripristinata la soluzione zuccherina, in seguito le api tornano a visitare la postazione solo parzialmente, infatti, nelle prime fasi della prova il numero di api è di circa 38 mentre nelle fasi finali oscilla attorno a 5.

Il testimone, figura 4.18 conferma, come nelle prove precedenti, che le api si mantengono costanti in numero per l'intero svolgersi della prova. Si può inoltre evidenziare la fedeltà delle api alla postazione. Le api che cambiano postazione per bottinare sono sempre minoritarie rispetto quelle dominanti nel sito, nonostante le postazioni si trovino a solo 20 metri una dall'altra.

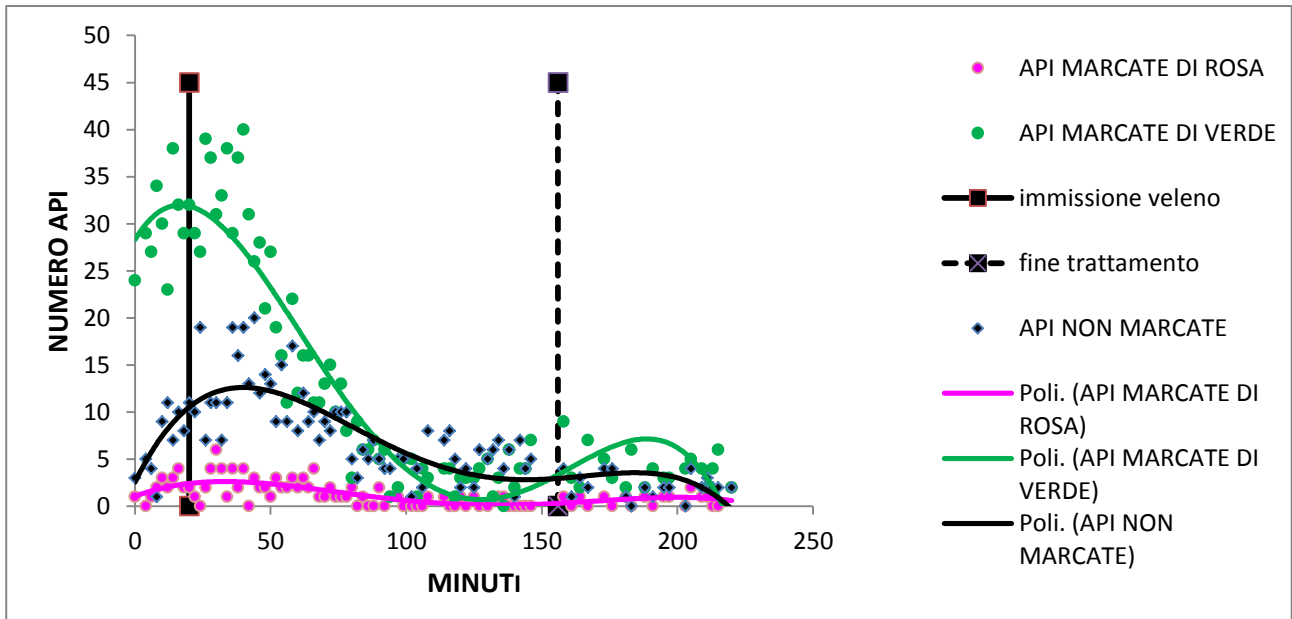


Figura 4.17 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 03.07.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore viola indica api marcate in un'altra postazione.

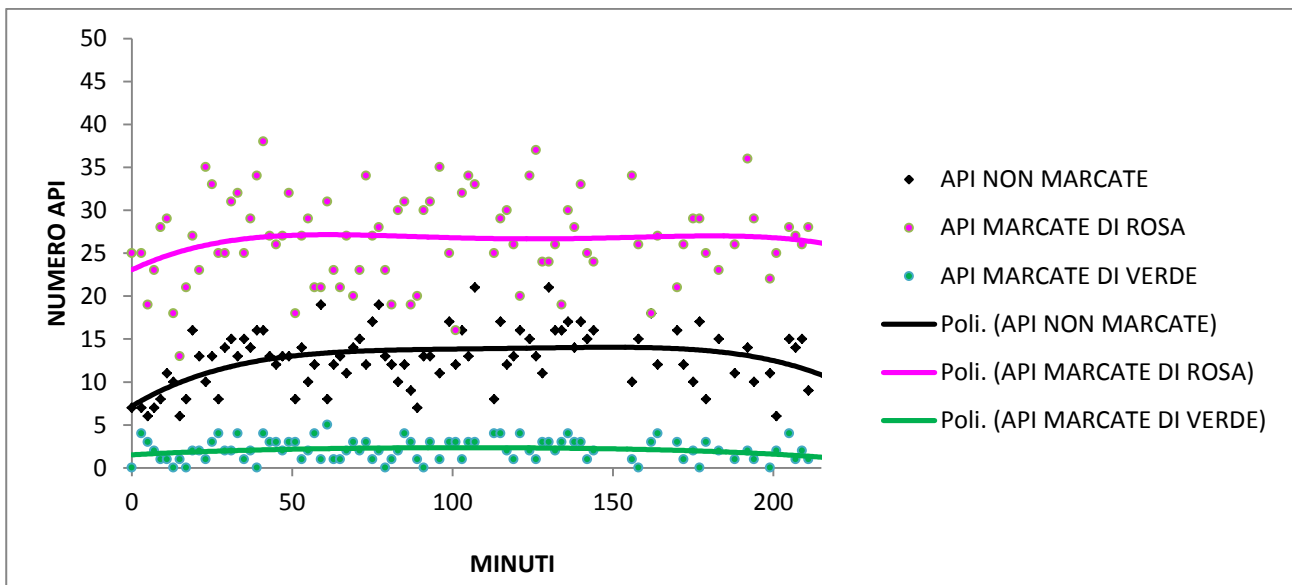


Figura 4.18. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 03.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore viola indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

Le figure 4.19 e la 4.20 rappresentano le situazioni di controllo della postazione trattata e quella del testimone. Analizzando le due postazioni non si notano sostanziali differenze; dai rilievi si percepisce che nonostante la postazione sia stata trattata il giorno prima, le api marcate di verde tendono a crescere nel tempo così come succede per le api rosa, che non avevano subito il trattamento.

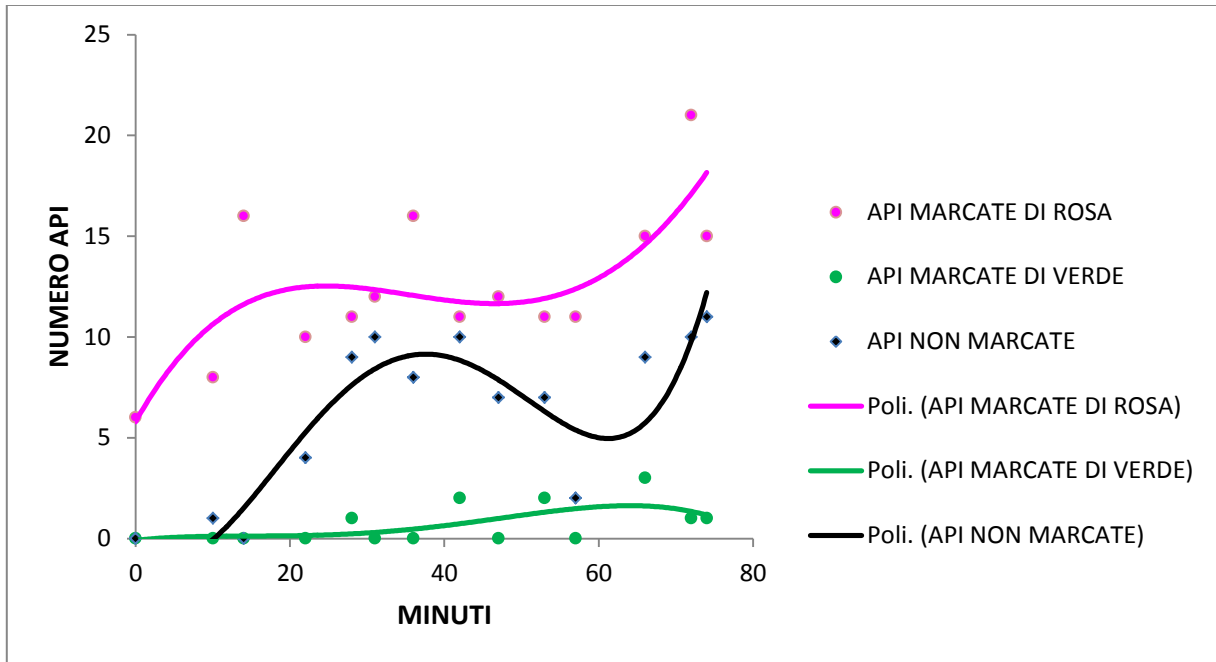


Figura 4.19 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 04.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore viola indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del trattato.

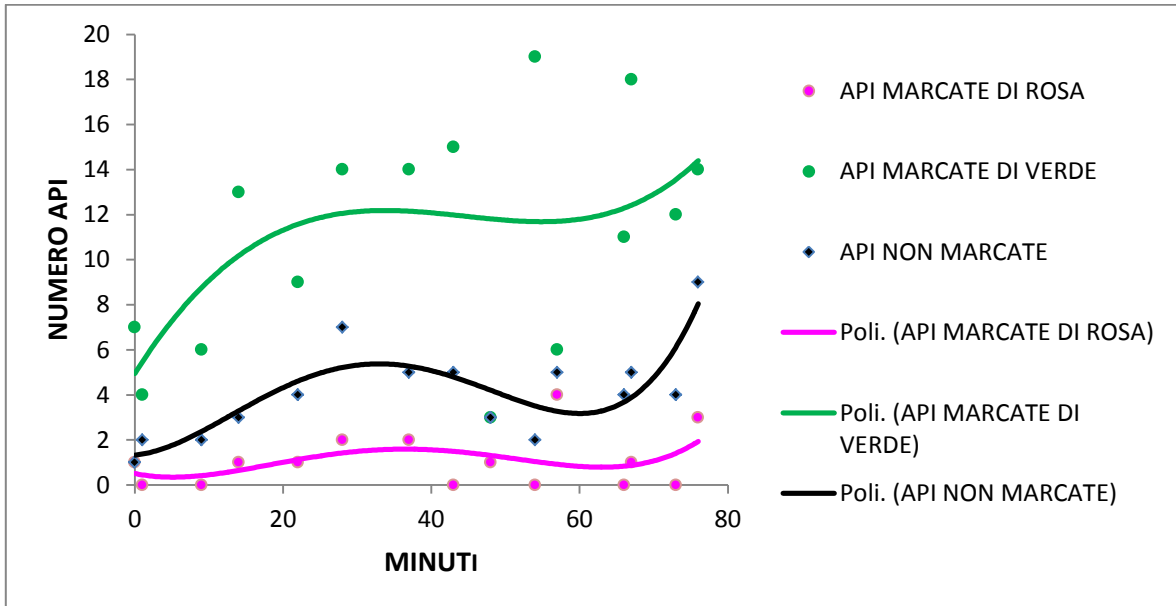


Figura 4.20. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 04.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore viola indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del testimone.

Dopo 8-9 rilievi effettuati ogni 2 minuti si può osservare dal grafico, figura 4.21, l'inizio del calo di visite che termina con l'abbandono del sito da parte di tutte api marcate dopo 175 minuti di trattamento, effettuato

per la quasi totalità della prova. Nel periodo centrale della prova si nota un assestamento delle visite delle api marcate intorno al valore di 5 api. Questo comportamento può essere spiegato con l'esistenza di alcune api, dette esploratrici, che hanno il compito monitorare e cercare nuovi fonti per bottinare.

Come si nota dalla figura 4.22, che rappresenta la postazione testimone, il numero di api marcate si mantiene più o meno costante per l'intera durata della prova. È necessario ricordare che le api in entrambi i siti partivano dallo stesso numero, infatti le api tendono ad occupare i siti con la presenza di soluzione zuccherina con "popolazioni" di entità simile, al fine di ottimizzare la raccolta; seppur ci possano essere delle lievi differenze, nel corso si è scelto di trattare la postazione con un numero di api più elevato tra le due.

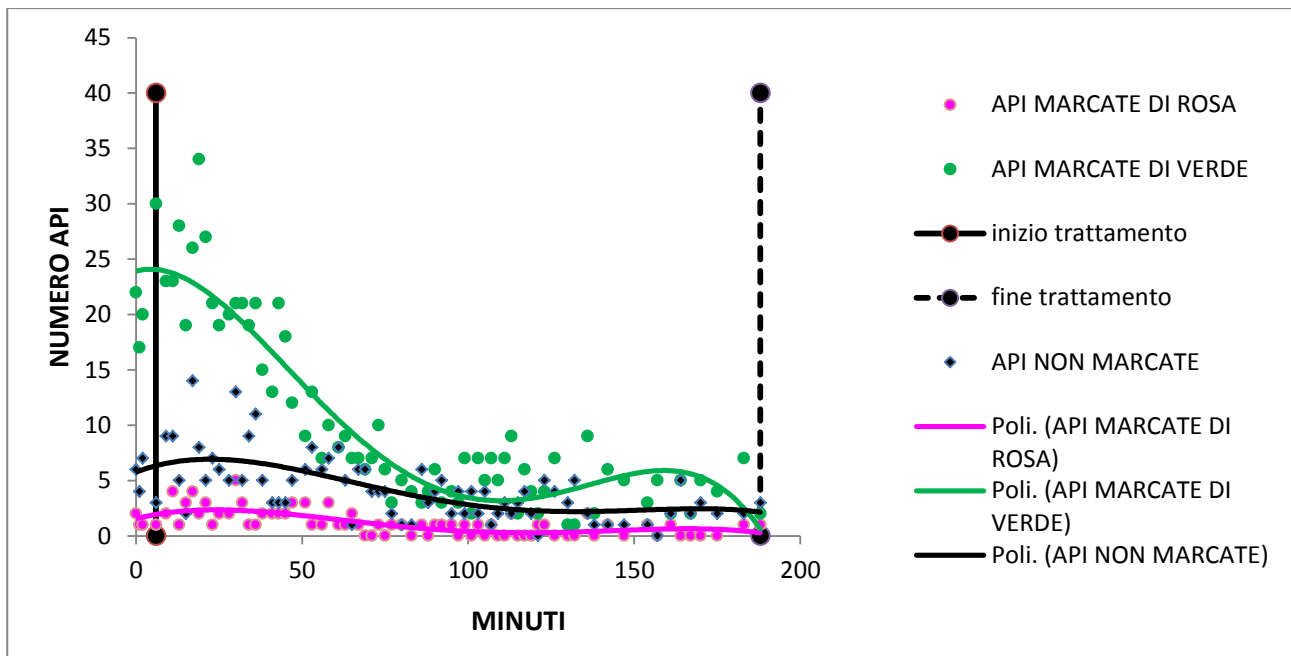


Figura 4.21 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 07.07.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore viola indica api marcate in un'altra postazione.

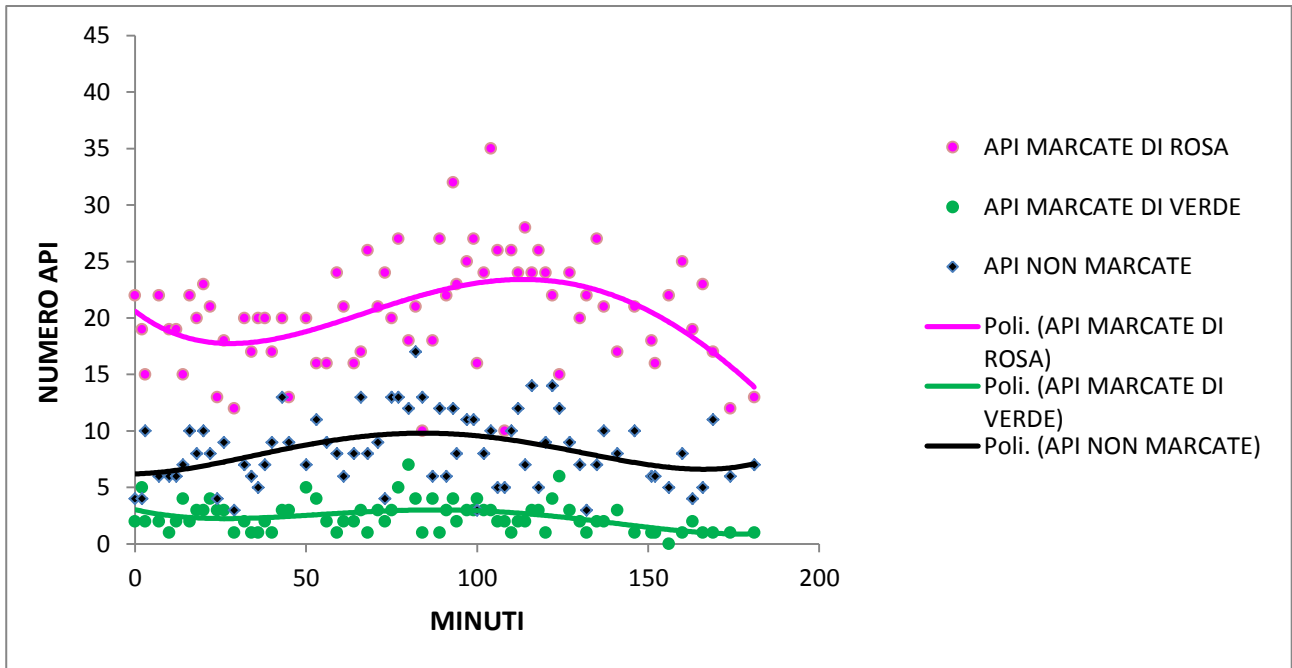


Figura 4.22. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 07.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore viola indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

Anche in questo caso il ritorno delle api il giorno successivo è evidente, come ci indicano le figure 4.23 e 4.24, i controlli del trattato e del testimone testimoniano una crescita progressiva del numero di api, che passano dalle 5 api iniziali a più di 20 dopo 100 minuti circa.

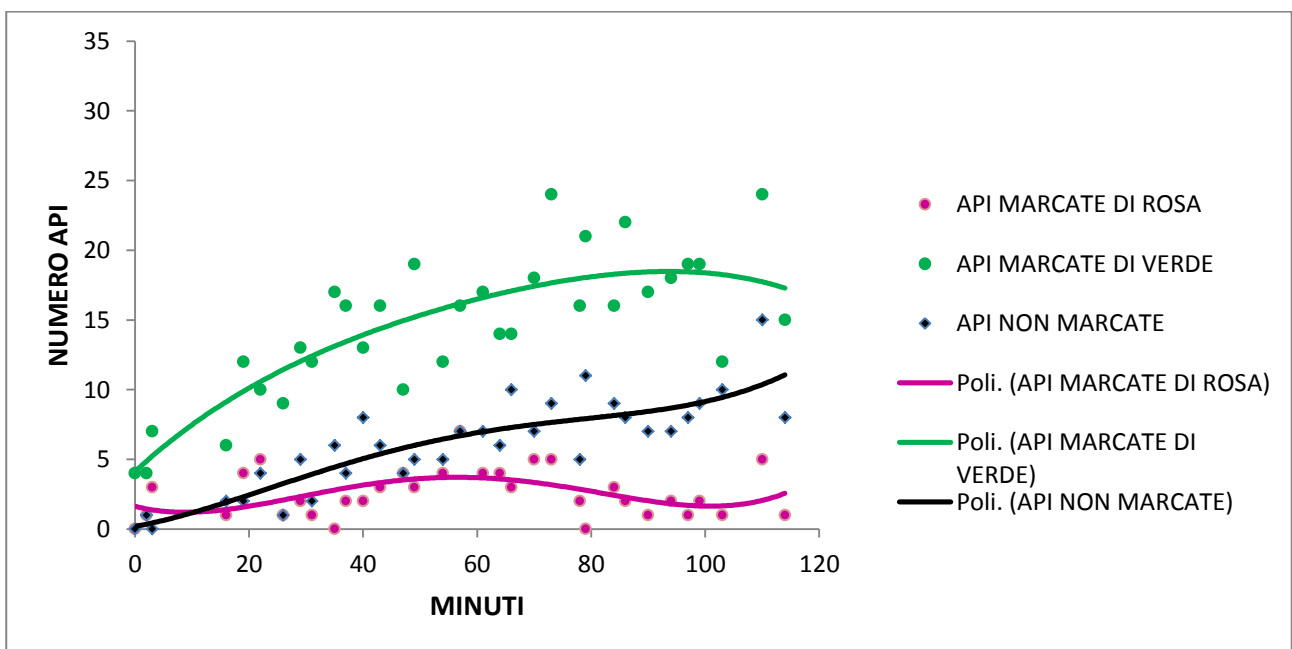


Figura 4.23 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 08.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore viola indica api marcate in un'altra postazione. Postazione di controllo del trattato.

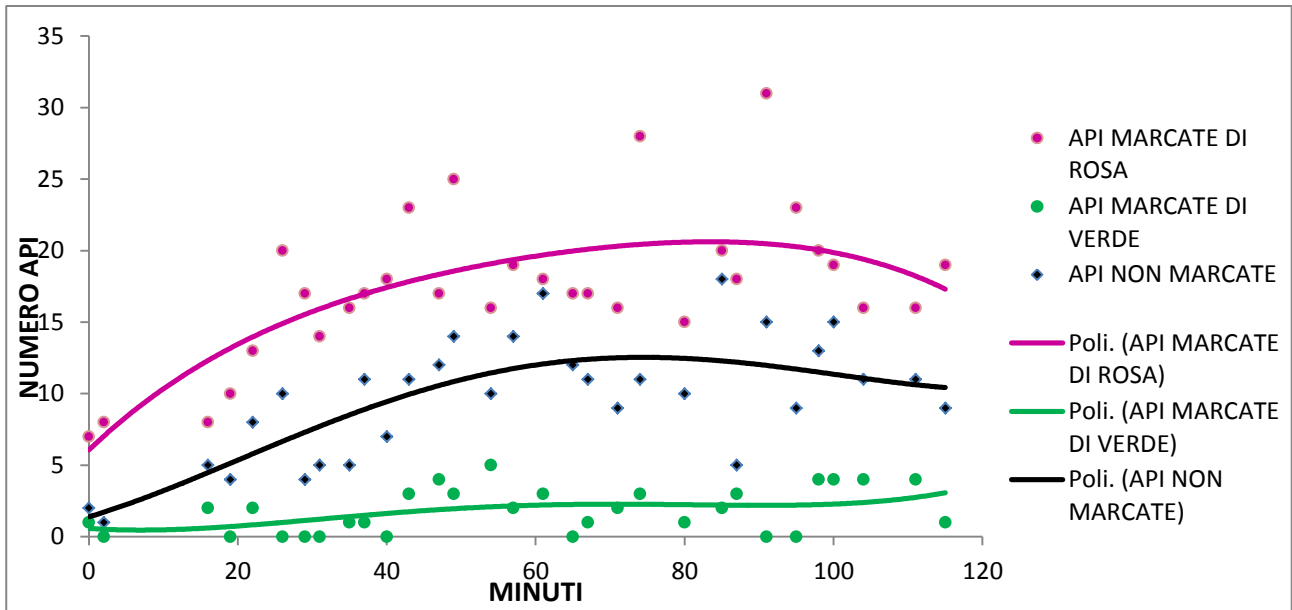


Figura 4.24. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 08.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore viola indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. Postazione di controllo del testimone.

In questa prova è stato effettuato anche il controllo di entrambi i siti per il secondo giorno successivo al trattamento, figure 4.25 e 4.26. Questo ulteriore controllo non aggiunge molte informazioni riguardo al trattamento; ma ci conferma la presenza di api nelle postazioni a cui non è più stato applicato il trattamento.

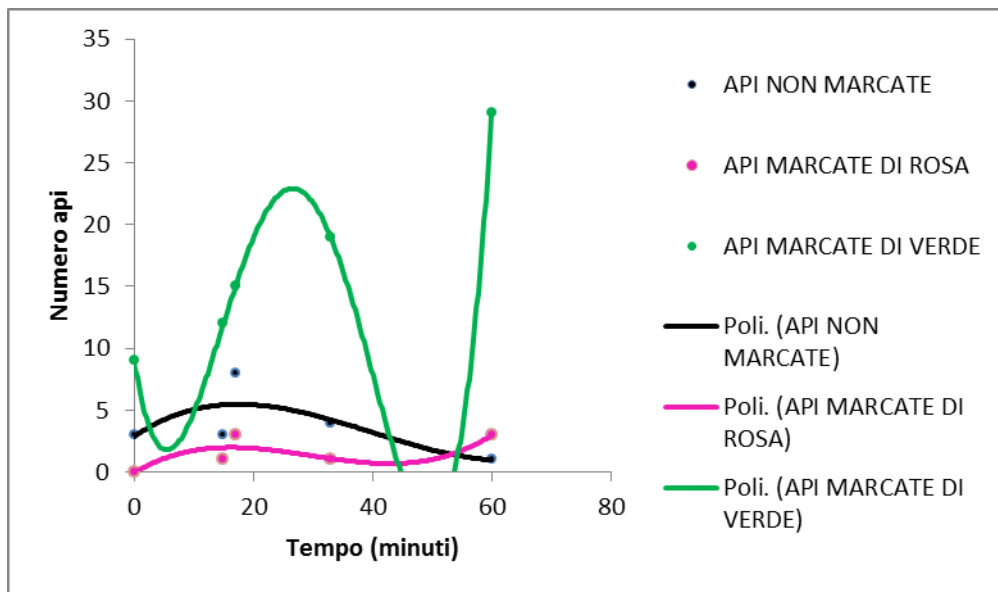


Figura 4.25 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 09.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore viola indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo due giorni dopo del trattato.

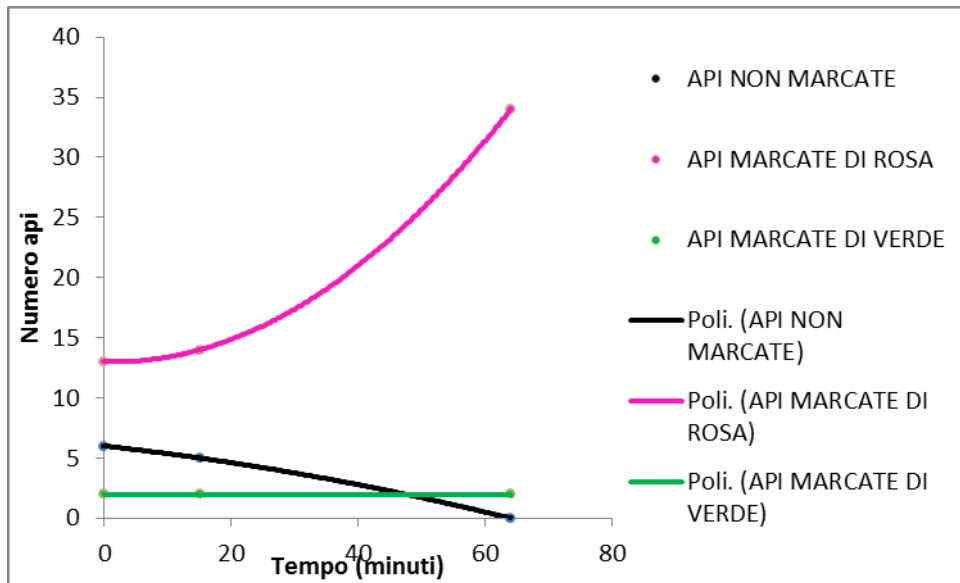


Figura 4.26. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 09.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore viola indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo due giorni dopo del testimone.

Nella figura 4.27 è riportato il grafico della postazione trattata, della prova effettuata nel sito 4, in cui le postazioni si trovano a 500 metri dall'alveare e distano tra di loro circa 100 metri. Dopo 20 minuti dall'inizio della prova è stata sostituita la semplice soluzione zuccherina con quella contenente l'insetticida. A 20 minuti dall'inizio del trattamento si assiste ad un drastico calo del numero di api marcate, con un dimezzamento dopo 45 minuti circa mentre il valore minimo si ha dopo circa 100 minuti di trattamento. La figura 4.28, che rappresenta la postazione del testimone, evidenzia il mantenimento costante delle api marcate e dimostra come ad una certa distanza dall'alveare inizino a verificarsi fenomeni di competizione per la conquista della fonte nutritiva da parte di api non marcate, sono in questo caso api provenienti da altri alveari. Le api non marcate crescono in numero con il trascorrere dei minuti, fino alla completa conquista della postazione.

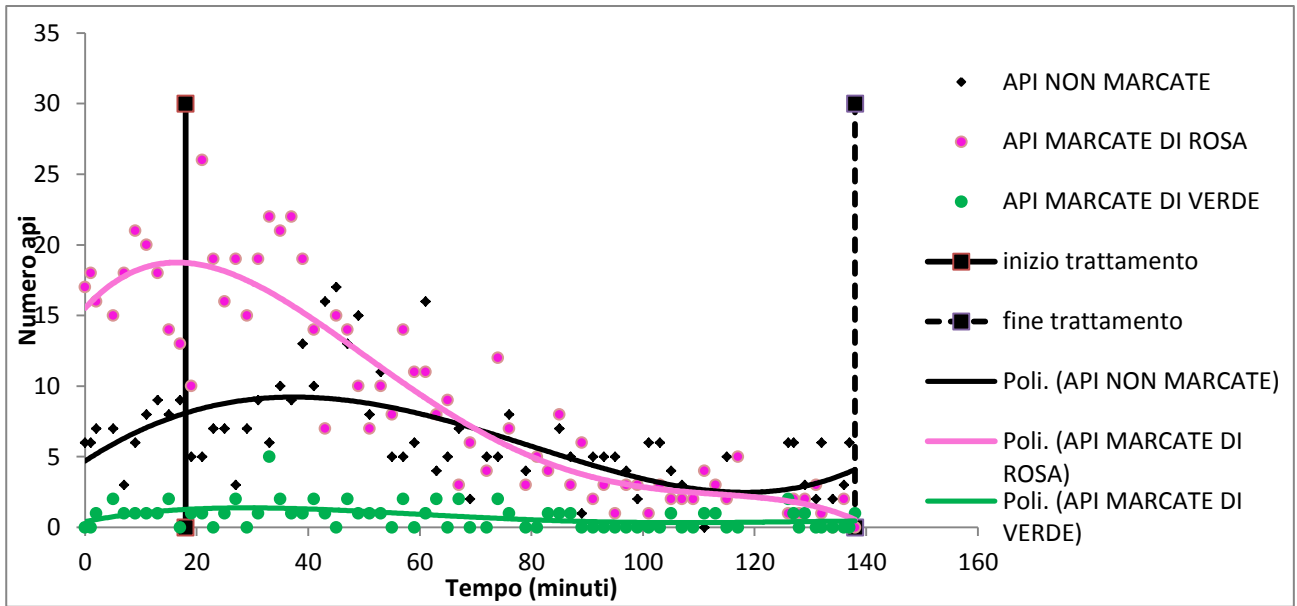


Figura 4.27 Sito 4, (500 metri dall'alveare, 30.07.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

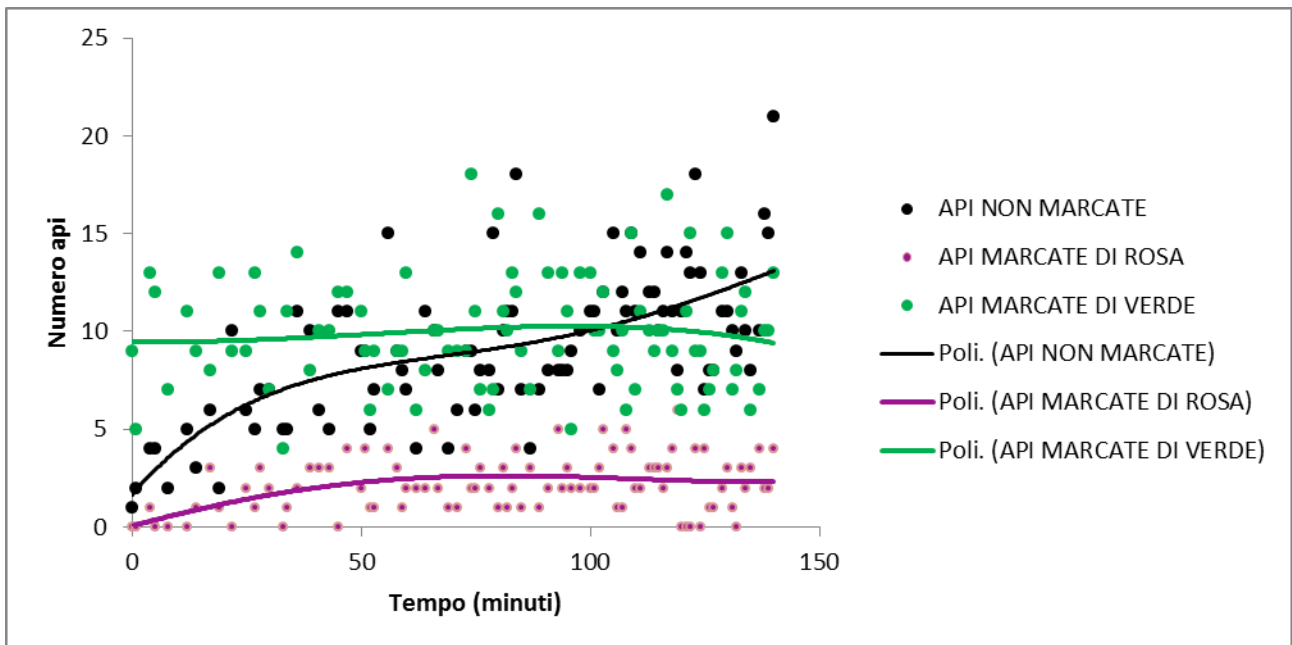


Figura 4.28. Sito 4, (500 metri dall'alveare, 30.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione.

Ancora più evidente dalle figure 4.29 e 4.30 ,rispettivamente il controllo del trattato e il controllo del testimone ,è il fenomeno della competizione : le api non marcate scacciano dal sito le nostre api marcate e crescono in modo quasi lineare abbastanza velocemente fino a raggiungere nella postazione di controllo

del trattato le 50 api dopo solo 50 minuti. Nel sito del controllo del testimone dopo un'iniziale ascesa nelle visite si assiste ad un parziale calo di tutte le api presenti nella postazione, molto probabilmente ciò è dovuto alla mancata sostituzione di un alimentatore nel quale era terminata la soluzione zuccherina.

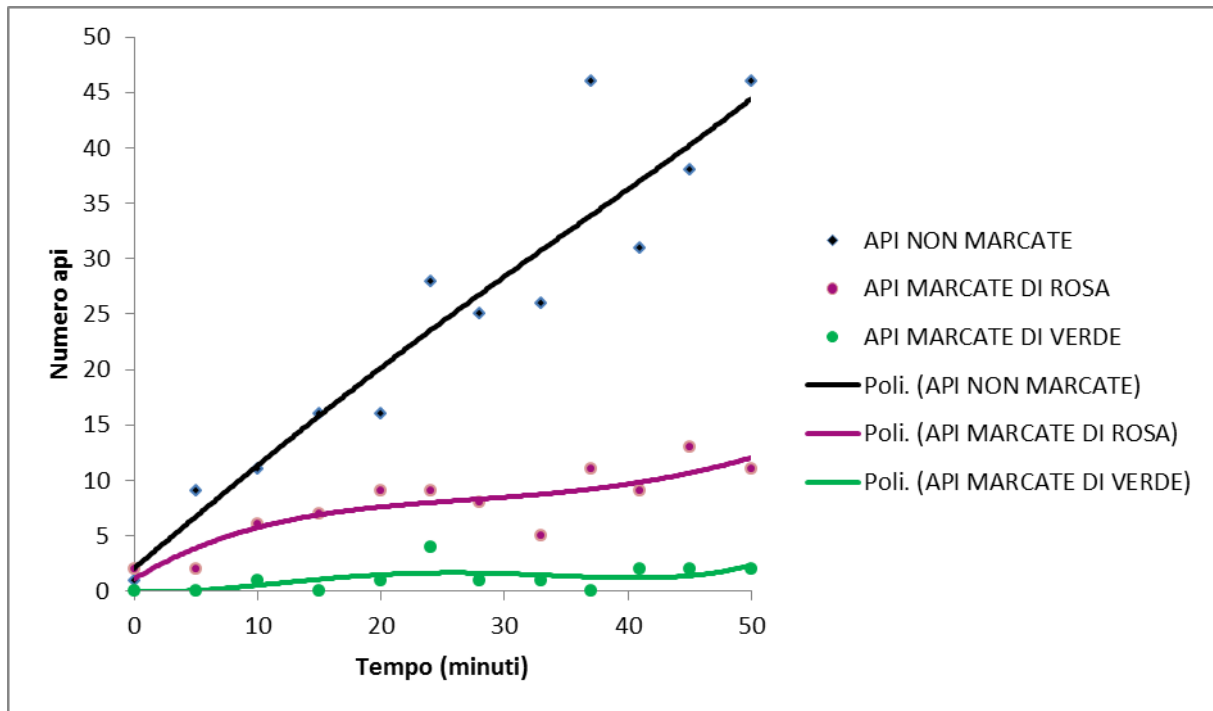


Figura 4.29 Sito 4, (500 metri dall'alveare, 31.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del trattato.

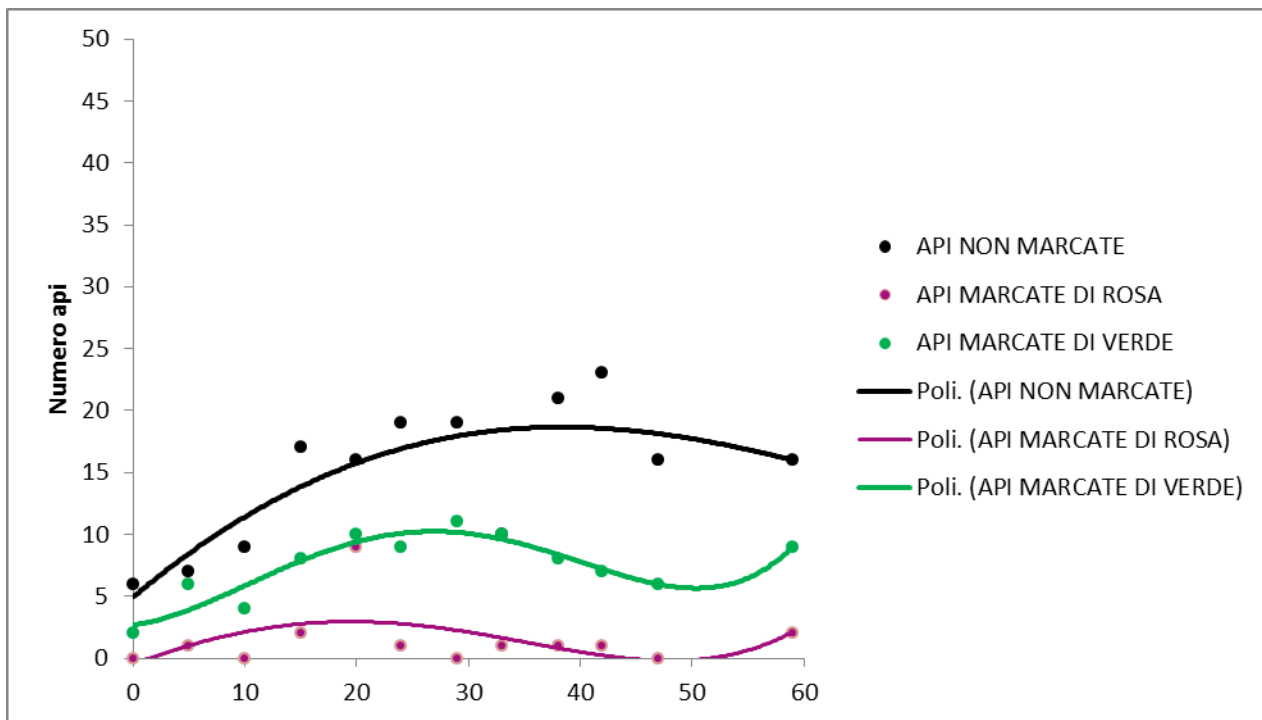


Figura 4.30 Sito 4, (500 metri dall'alveare, 31.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del testimone.

4.4 PROVE CON CONCENTRAZIONE DI INSETTICIDA DI 80 ppb.

Le prove eseguite alla concentrazione di 80 ppb di Clothianidin sono suddivise in 1 prova svolta nell'autunno 2014 e 4 prove svolte nell'estate 2015.

4.4.1 Prove con concentrazione di insetticida di 80 ppb nell'autunno del 2014.

La prima delle prove con 80 ppb si è svolta verso gli ultimi giorni di settembre nel sito 2 posizionato a 15 metri dall'alveare. I grafici in seguito mostrati rappresentano la media delle api presenti nelle due postazioni, posizionate una a una decina di metri l'una dall'altra. In questa prova è stato eseguito il controllo delle postazioni nel giorno successivo.

La figura 4.31, rappresenta la postazione trattata, in questo caso il trattamento iniziato al minuto 100 dura 45 minuti. Pochi minuti dopo l'inizio del trattamento si assiste ad un crollo quasi verticale nel numero di api marcate che arrivano a 0 api dopo 50 minuti circa. Nel giro di 4-5 controlli (15 minuti circa) si passa da 18 api a 2-3 api marcate; in corrispondenza del calo delle api marcate si verifica un aumento delle api non marcate, sono api che probabilmente non avevano ancora sperimentato l'insetticida.

Nella figura 4.32, il testimone ci conferma come nelle altre prove, che nel sito non trattato l'andamento delle api rimane costante, oppure tende ad un leggero aumento.

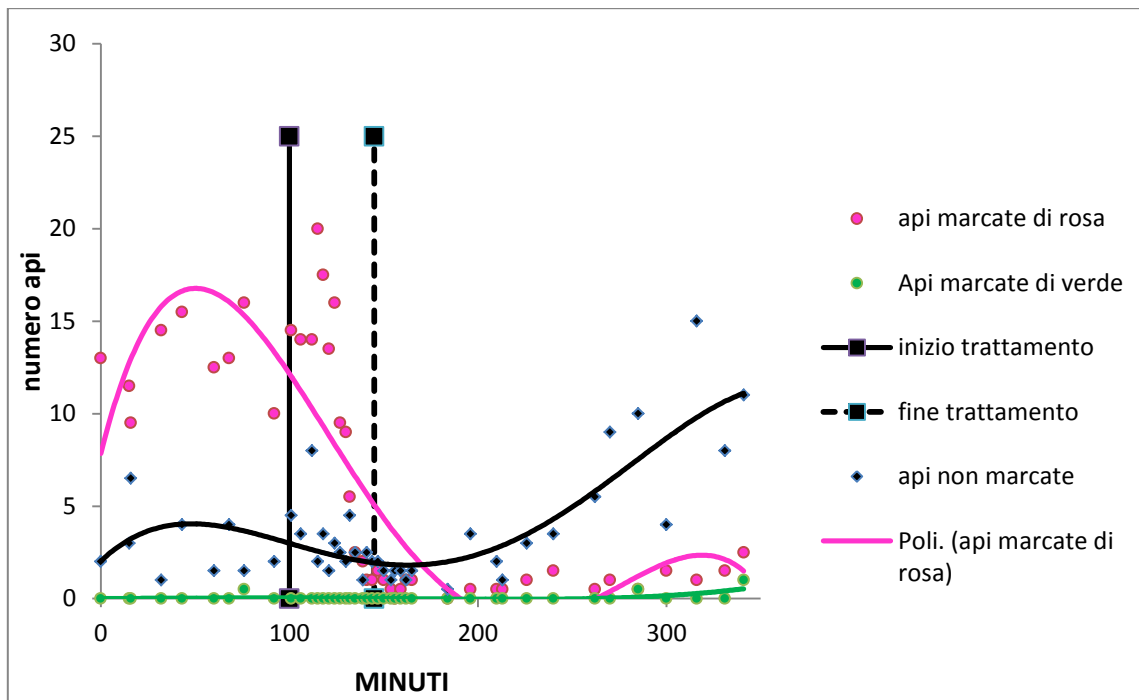


Figura 4.31 Sito 2, (15 metri dall'alveare, 26.09.14) in presenza di Clothianidin 80 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

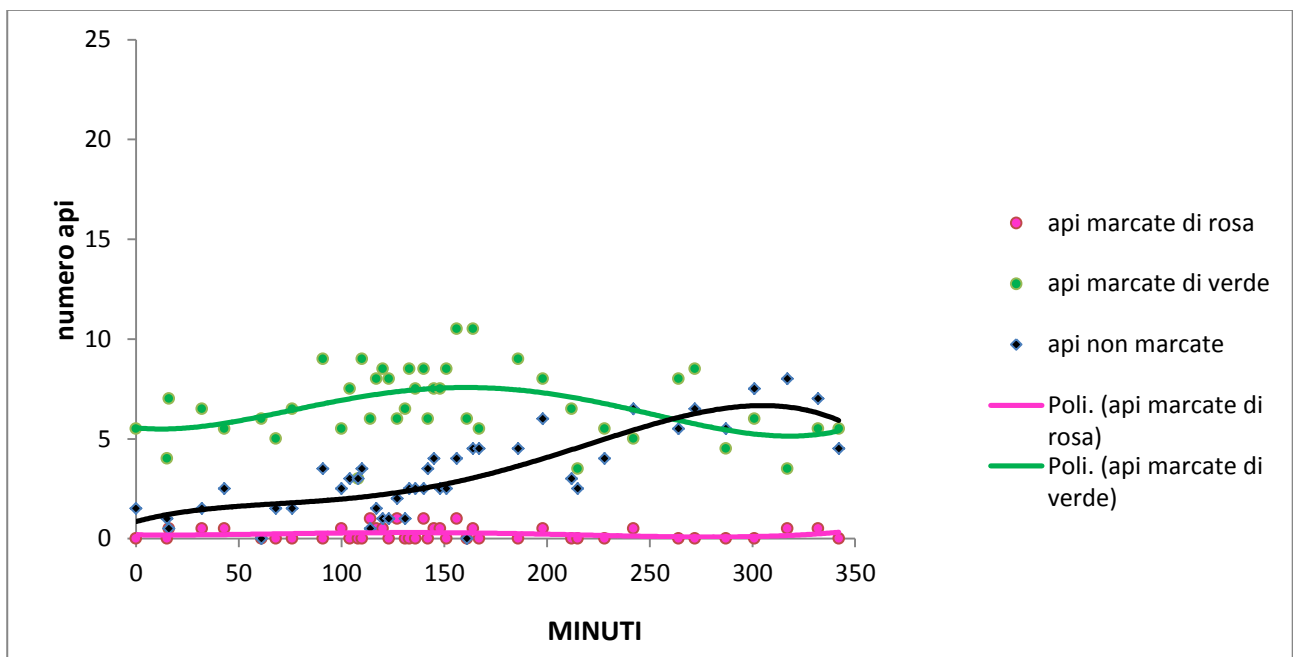


Figura 4.32 Sito 2, (15 metri dall'alveare, 26.09.14) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione.

Come si può notare dalla figura 4.33, che riferisce alla postazione di controllo del trattato, il giorno successivo si assiste a una mancata ripresa delle visite da parte delle api marcate che avevano subito il trattamento; ciò sta a indicare che la concentrazione di 80 ppb di Clothianidin ha provocato un effetto avverso sulle api che non visitano in numero elevato la postazione il giorno successivo seppur gli alimentatori contengano solo la soluzione zuccherina. Questa condizione non avviene nelle api non marcate, che probabilmente il giorno precedente hanno scoperto la postazione a trattamento già ultimato, perciò queste si mantengono costanti intorno al numero di 20 api per postazione per l'intera durata della prova.

Mentre nella postazione di controllo del testimone, figura 4.34, le api che erano state marcate sono paragonabili in media al giorno precedente con piccolo aumento verso la fine della prova; e le api non marcate si portano dalla media di 10 api per postazione nelle fasi iniziali per giungere al picco finale di 40 api per postazione probabilmente altre api sono state richiamate sulla postazione dall'alveare.

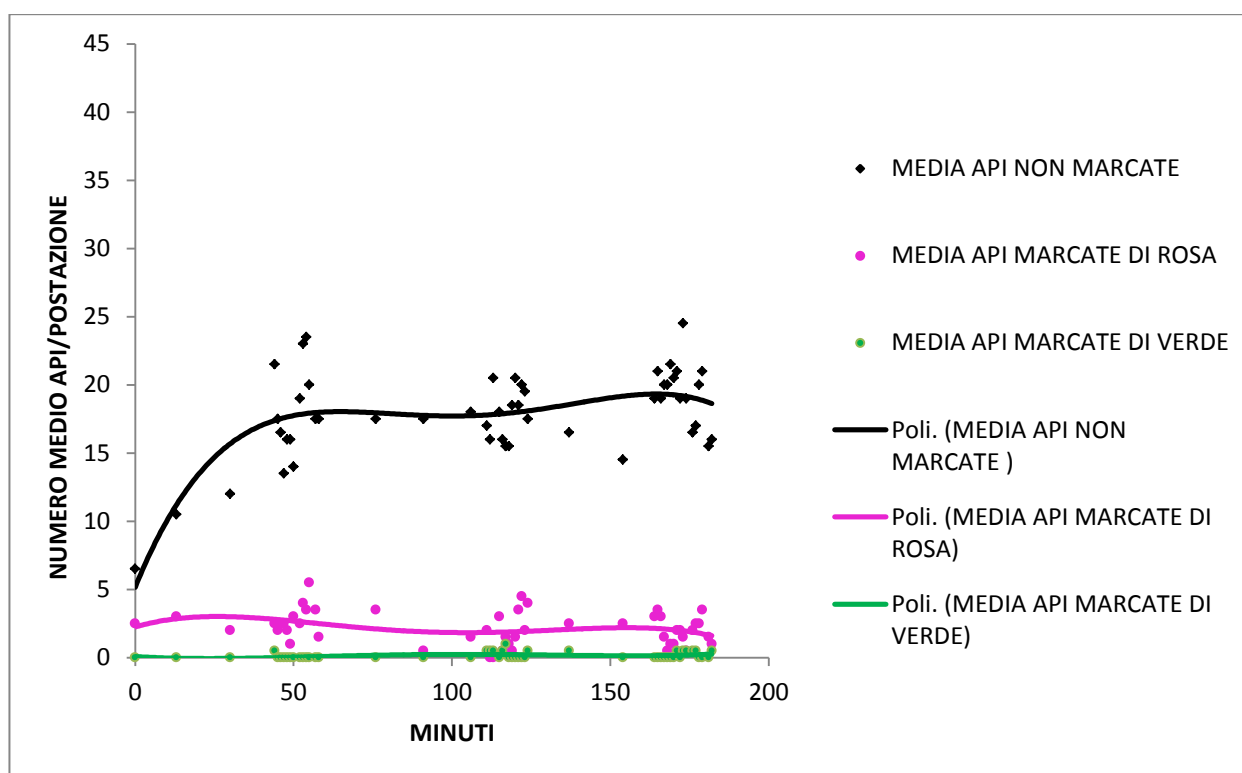


Figura 4.33 Sito 2, (15 metri dall'alveare, 27.09.14) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del trattato.

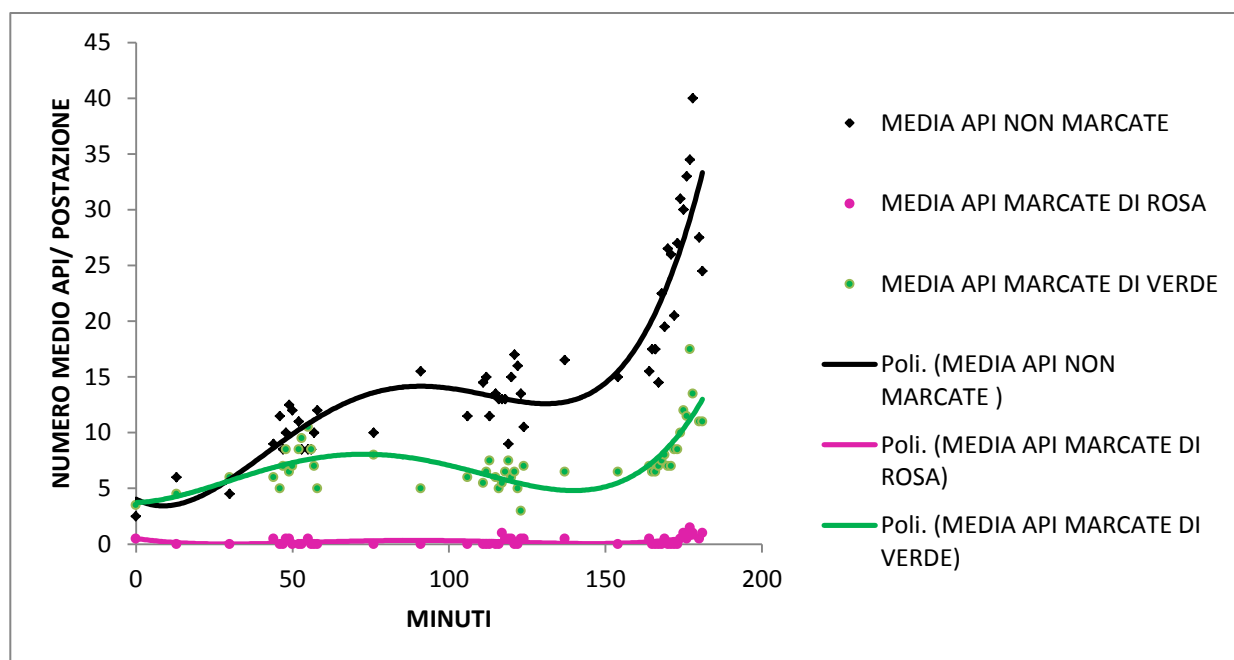


Figura 4.34 Sito 2, (15 metri dall'alveare, 27.09.14) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del testimone.

4.4.2 Prove con concentrazione di insetticida di 80 ppb estate del 2015.

Le 4 prove si sono svolte nell'estate 2015, le prime 3 prove nel sito 3 a 50 metri dall'alveare mentre l'ultima nel sito 4 a 500 metri dall'alveare. Per le prime 3 prove è stato effettuato il controllo del trattato e del testimone il giorno seguente.

Come si può notare dal grafico riportato in figura 4.35, che si riferisce alla postazione che ha subito il trattamento pochi minuti dopo l'immissione della soluzione zuccherina contenente l'insetticida a 80 ppb inizia un crollo delle visite molto rapido, le api passano da 16 a 3 in circa 30 minuti di trattamento, questo calo avviene in modo simile sia nelle api marcate sia in quelle non marcate. Solo dopo il ripristino della soluzione zuccherina, avvenuto dopo 112 minuti, si osserva un lento ritorno, e dopo circa 120 minuti il numero di api si avvicina a quello iniziale. Ciò che si può notare in confronto alle prova eseguita in autunno è che il ritorno in estate sembra essere più veloce e consistente, forse a causa delle migliori condizioni climatiche e dalla maggior presenza del numero di api presenti nell'alveare.

Nella figura 4.36, che rappresenta il testimone, l'andamento delle api marcate e non marcate tende a crescere lentamente durante il corso della prova, registrando le normali fluttuazioni nell'andamento delle visite dovute alle condizioni climatiche e al tempo trascorso dalle api per giungere all'alveare e tornare alla postazione.

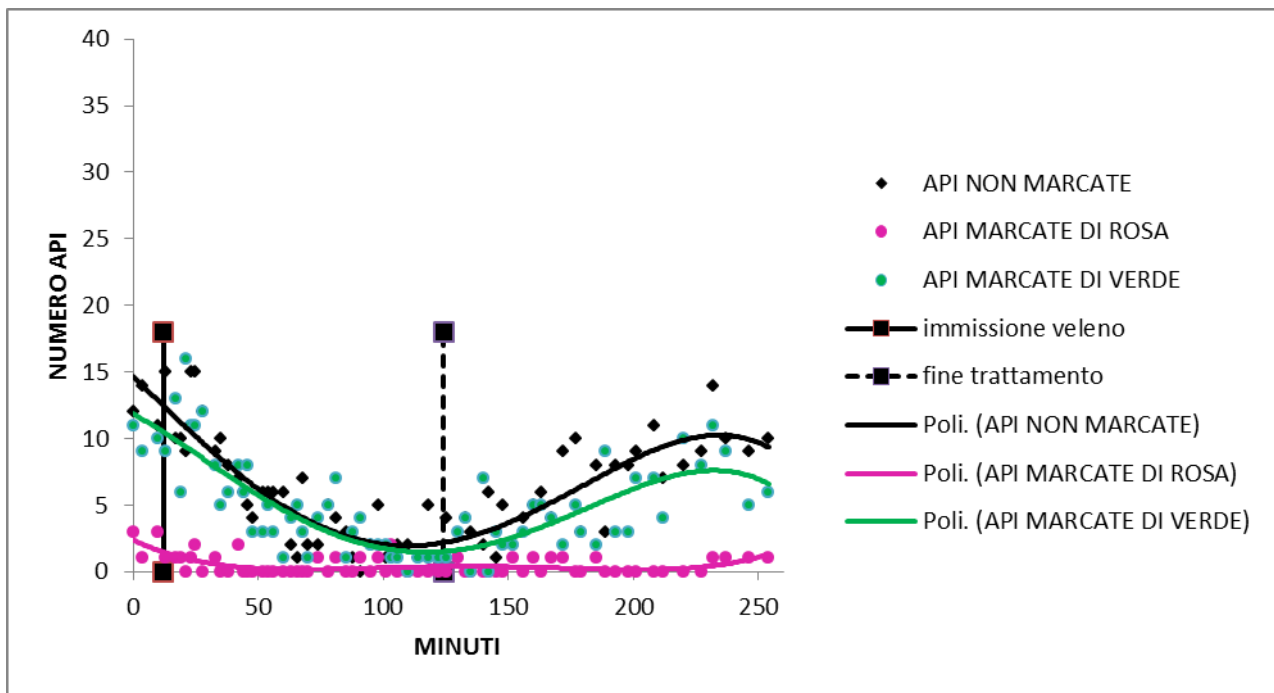


Figura 4.35 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 10.07.15) in presenza di Clothianidin 80 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione.

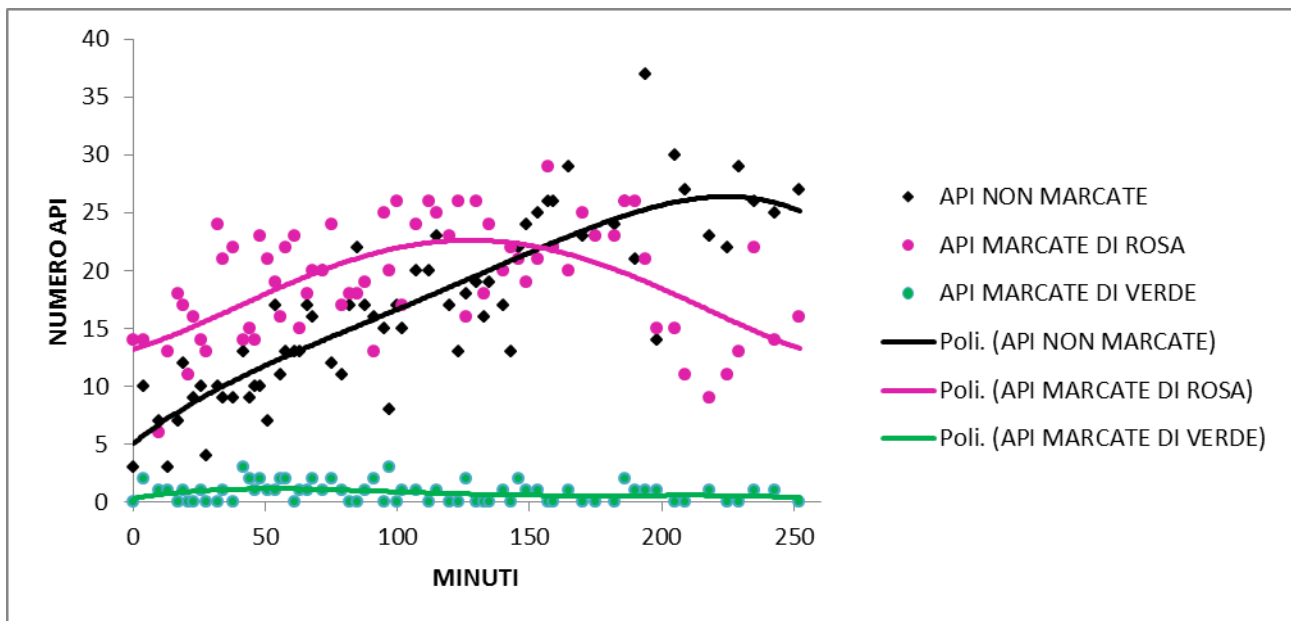


Figura 4.36 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 10.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

Dalle figure 4.37 e 4.38, rispettivamente la postazione di controllo del testimone e del trattato, si intuisce chiaramente che la concentrazione a 80 ppb ha provocato l'effetto di far calare il numero di visite delle api marcate nella postazione che il giorno precedente aveva subito il trattamento mentre nella postazione del

testimone le api marcate si mantengono in maniera costante poco al di sotto del giorno precedente. La situazione è invece diversa per le api non trattate che non calano in nessuna delle due postazioni e presentano un andamento simile nel numero di api e con gli stessi tempi di oscillazione in entrambe le postazioni.

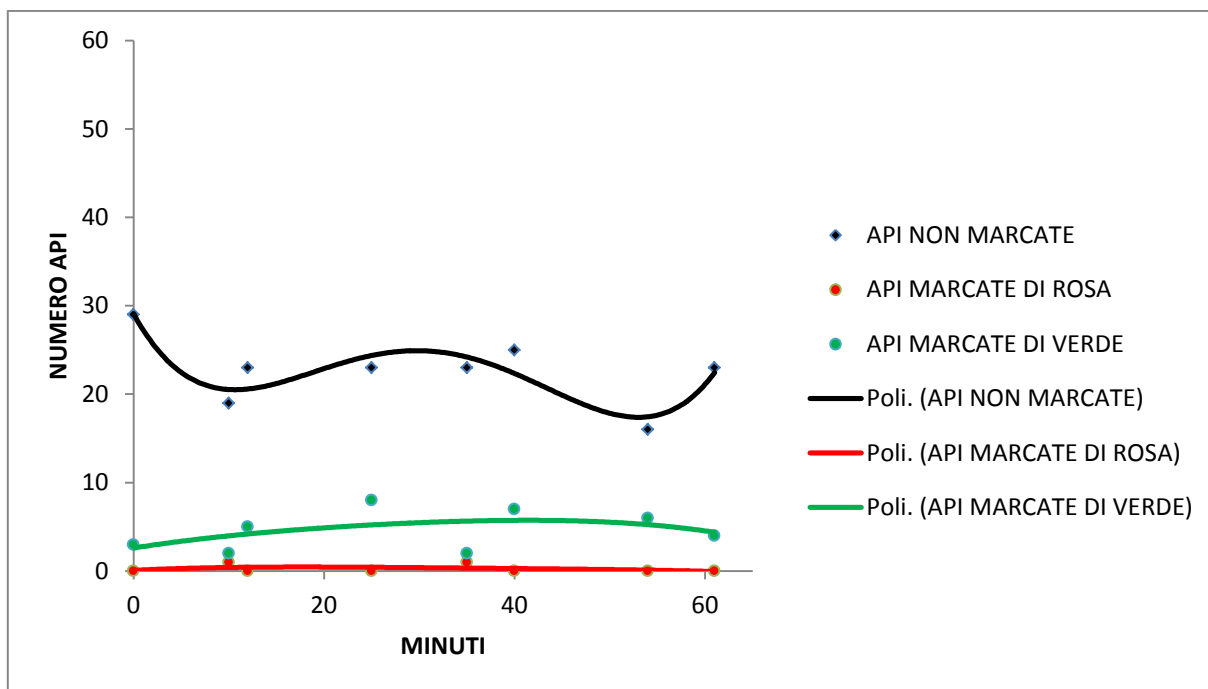


Figura 4.37 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 11.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del trattato.

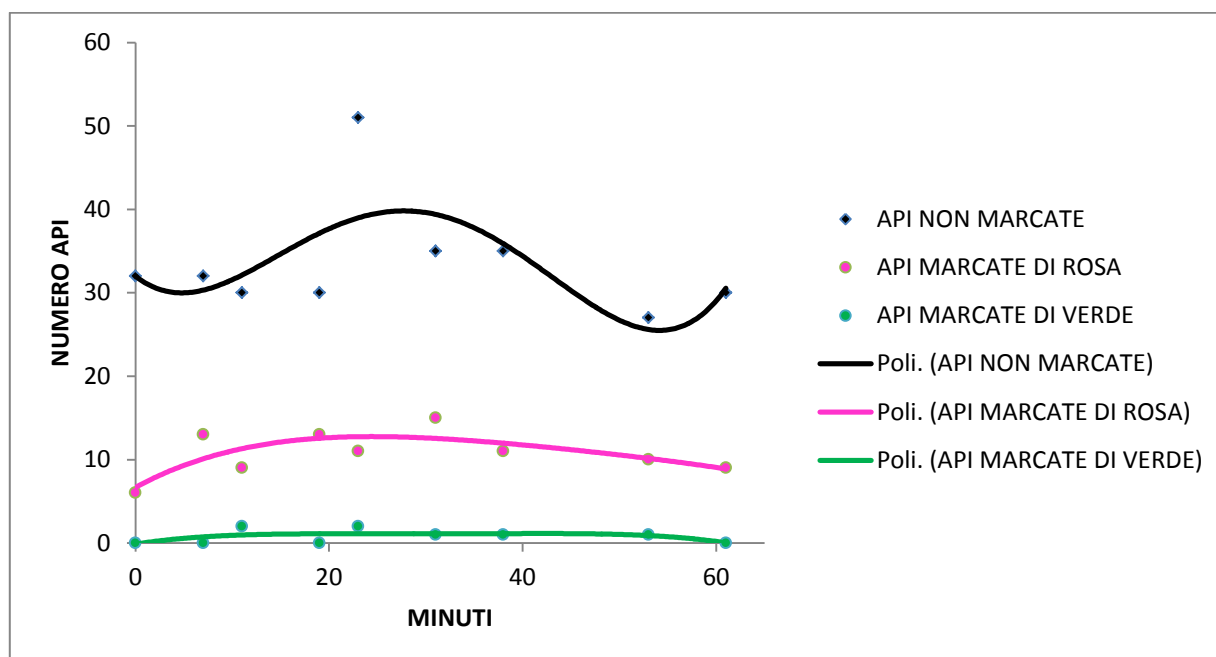


Figura 4.38 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 11.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del testimone.

Dalla figura 4.39, che rappresenta il grafico della postazione trattata, dopo l'aumento iniziale dovuto alla presenza della solo soluzione zuccherina, avviene il crollo drastico di visite da parte delle api marcate. Al momento del picco, dopo 26 minuti dall'inizio della prova, ci sono 14 api, mentre 23 minuti dall'inizio del trattamento il numero di api scende a 0 per poi tornare solo con una media di 2 api fino alla fine della prova.

Nella postazione testimone, figura 4.40, si assiste ad un aumento progressivo del numero di api anticipato per quanto riguarda la api marcate rispetto a quello che avviene per le api non marcate.

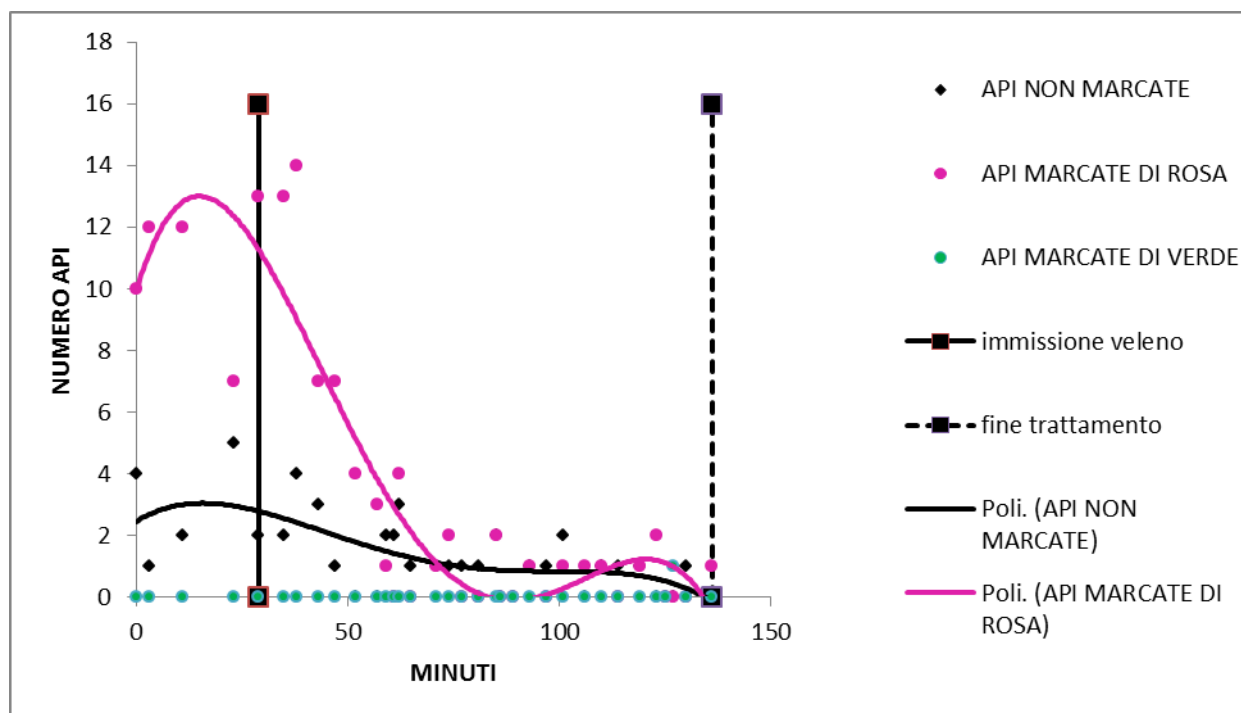


Figura 4.39 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 16.07.15) in presenza di Clothianidin 80 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

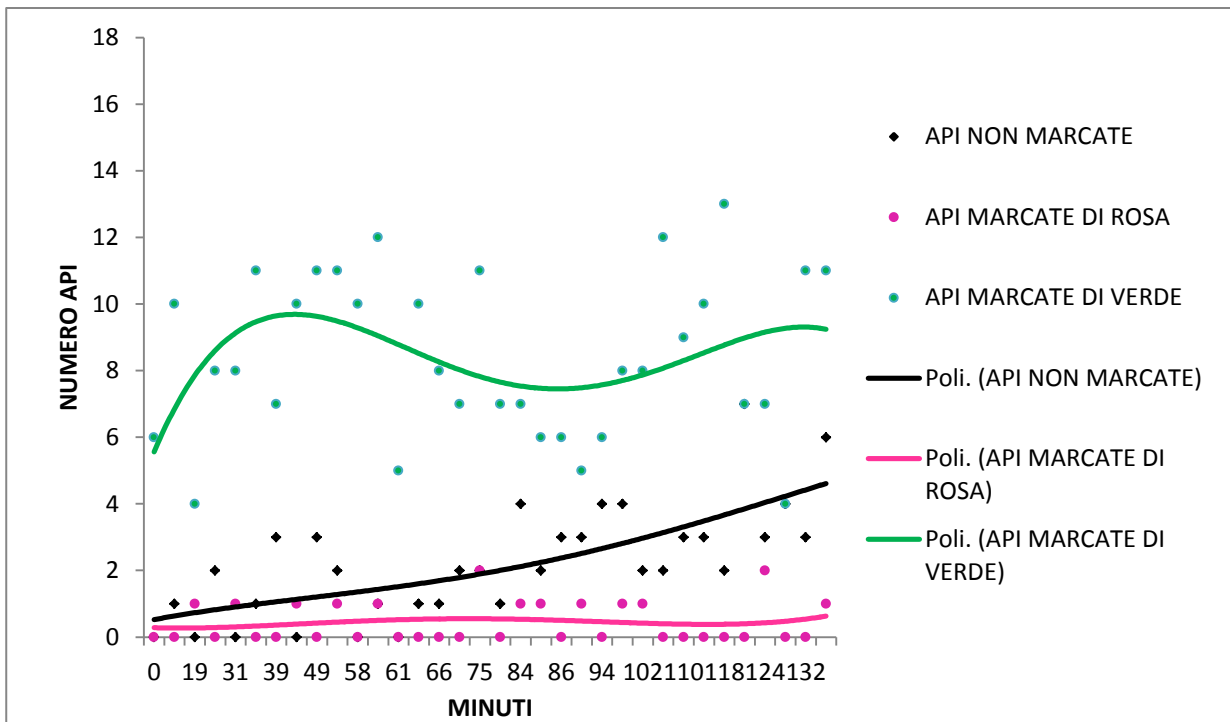


Figura 4.40 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 16.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione.

Confrontando le figure 4.41 e 4.42, rispettivamente la postazione di controllo del sito trattato e del testimone, si possono evidenziare alcune differenze. In entrambi i casi il numero di api marcate tende a risalire ma nel sito che era stato trattato la crescita è regolare e avviene più lentamente; mentre, nel sito di controllo del testimone questa risulta più veloce e consistente.

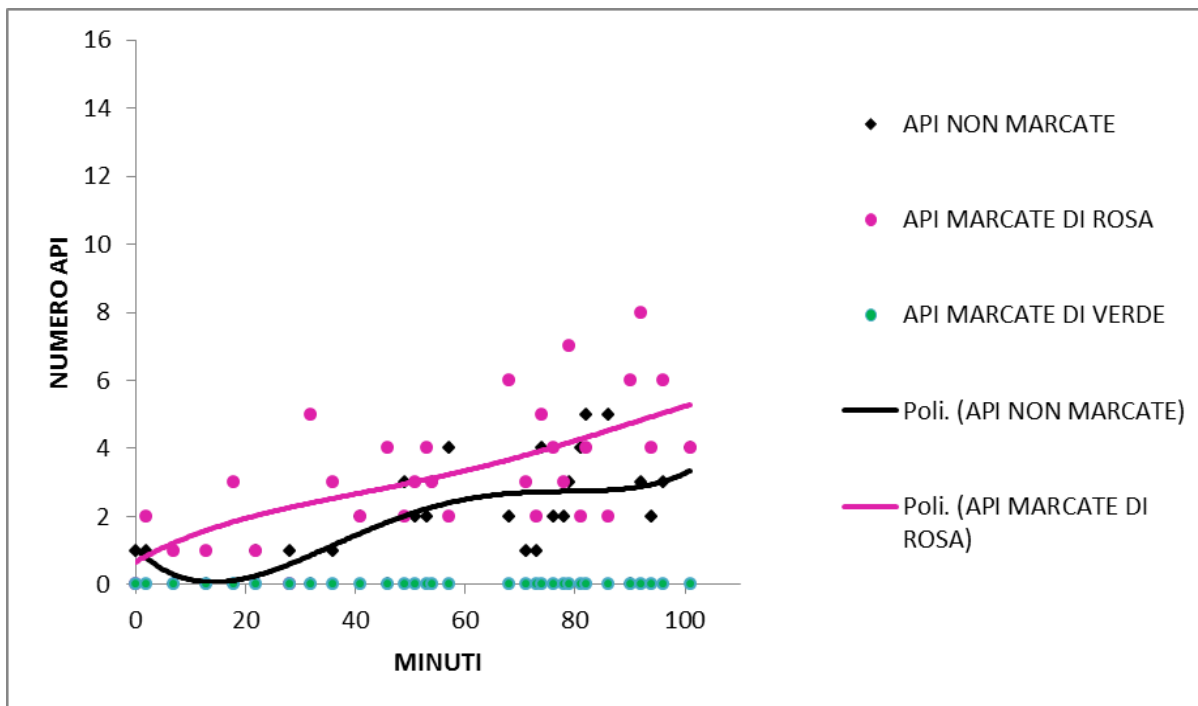


Figura 4.41 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 17.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del trattato.

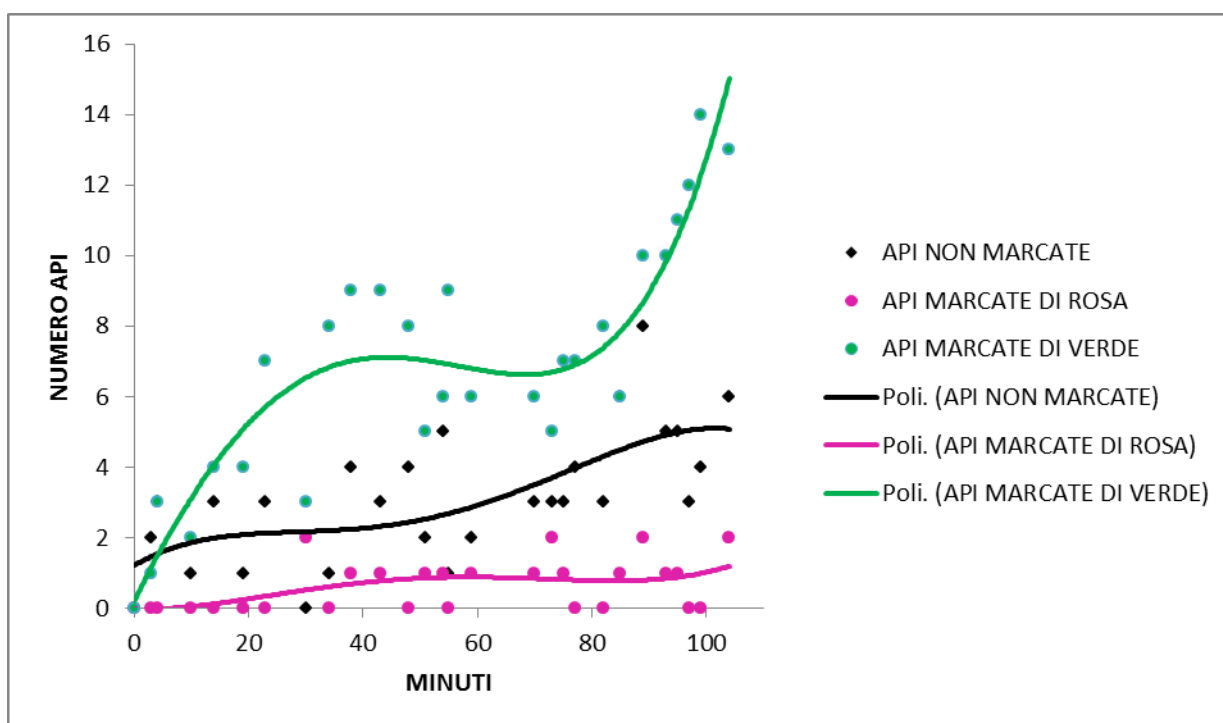


Figura 4.42 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 17.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del testimone.

Come è evidenziato dalla figura 4.43, il trattamento alla concentrazione di 80 ppb è stato mantenuto per tutta la durata della prova tranne i primi 5 minuti, per la durata complessiva di 1 ora e 55 minuti. Si notano gli effetti che questa concentrazione provoca sulle api, infatti, la curva sia delle api marcate sia di quelle non marcate dopo 15 minuti di trattamento mostra un calo, e un dimezzamento nel numero dopo 10 minuti dall'immissione dell'insetticida e abbandonano completamente la postazione dopo 55 minuti. Dopo un'ora dal completo abbandono della postazione sono presenti al massimo 2 o 3 api. Completamente diversa è la situazione del testimone, figura 4.44, le api marcate e non marcate rimangono costanti per tutta la durata della prova.

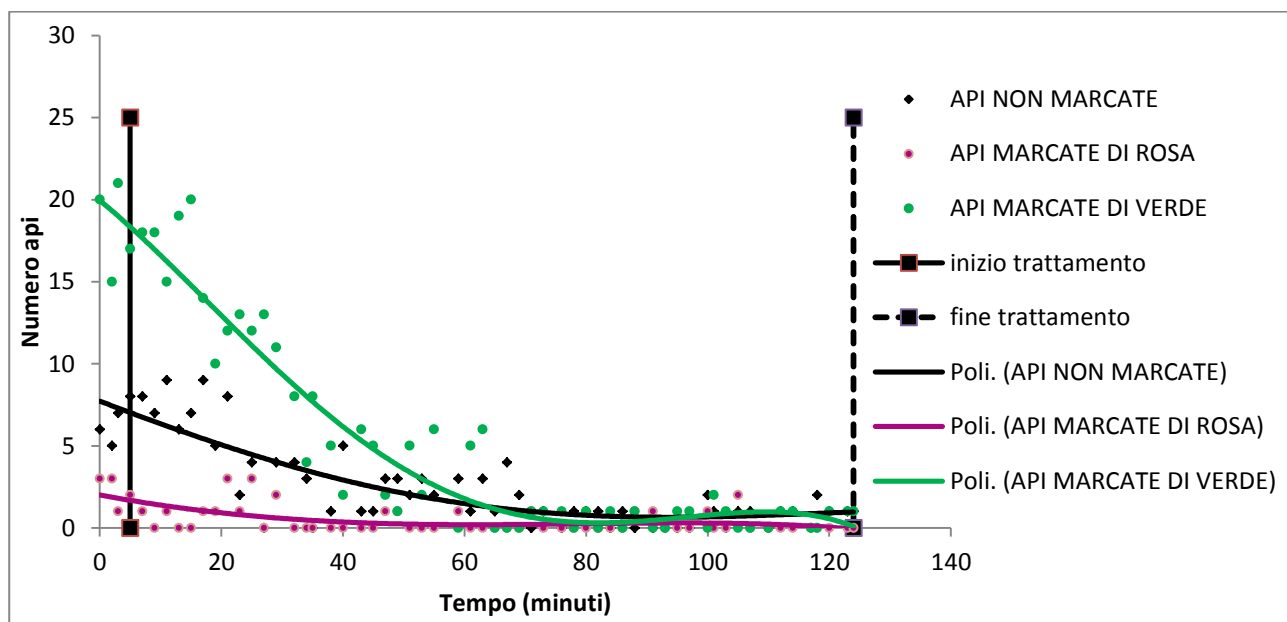


Figura 4.43 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 24.07.15) in presenza di Clothianidin 80 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione.

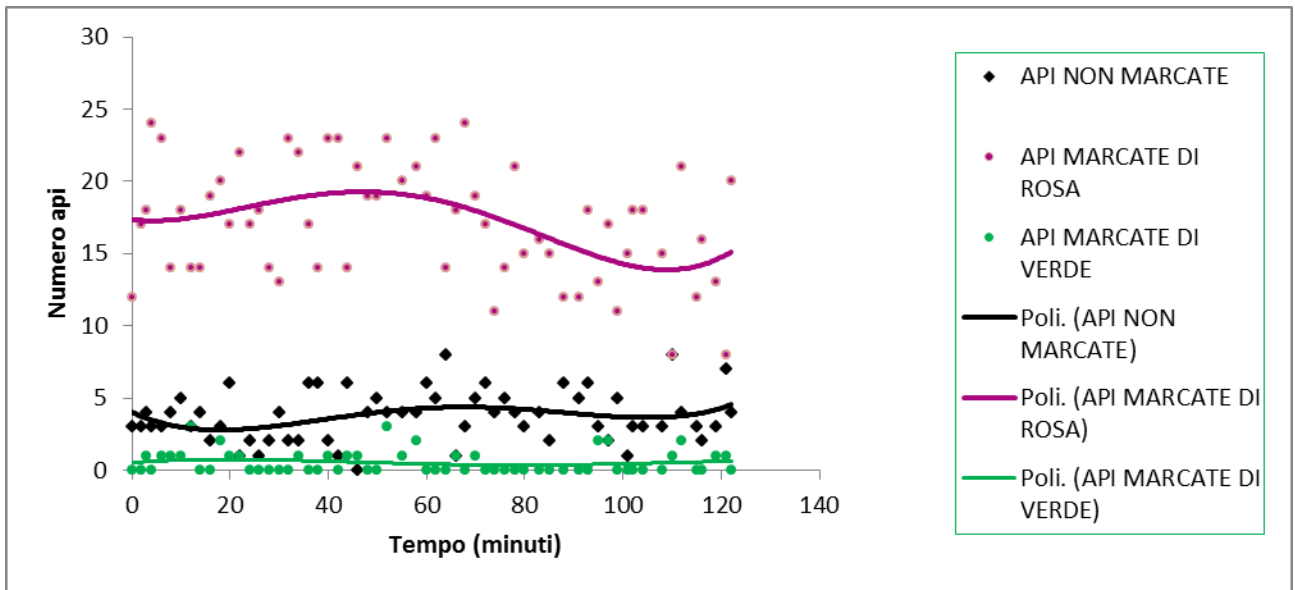


Figura 4.44 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 24.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

Nelle figure 4.45 e 4.46 sono riportati i grafici riferiti alle due postazioni il giorno successivo il trattamento. Si nota, come già accennato in precedenza, che le api essendo abitudinarie anche in questa occasione non si scambiano i siti di bottinaggio, ciò è evidenziato grazie al metodo di marcatura. Inoltre non si assiste all'abbandono della postazione il giorno dopo, almeno per quanto riguarda le prove effettuate durante l'estate.

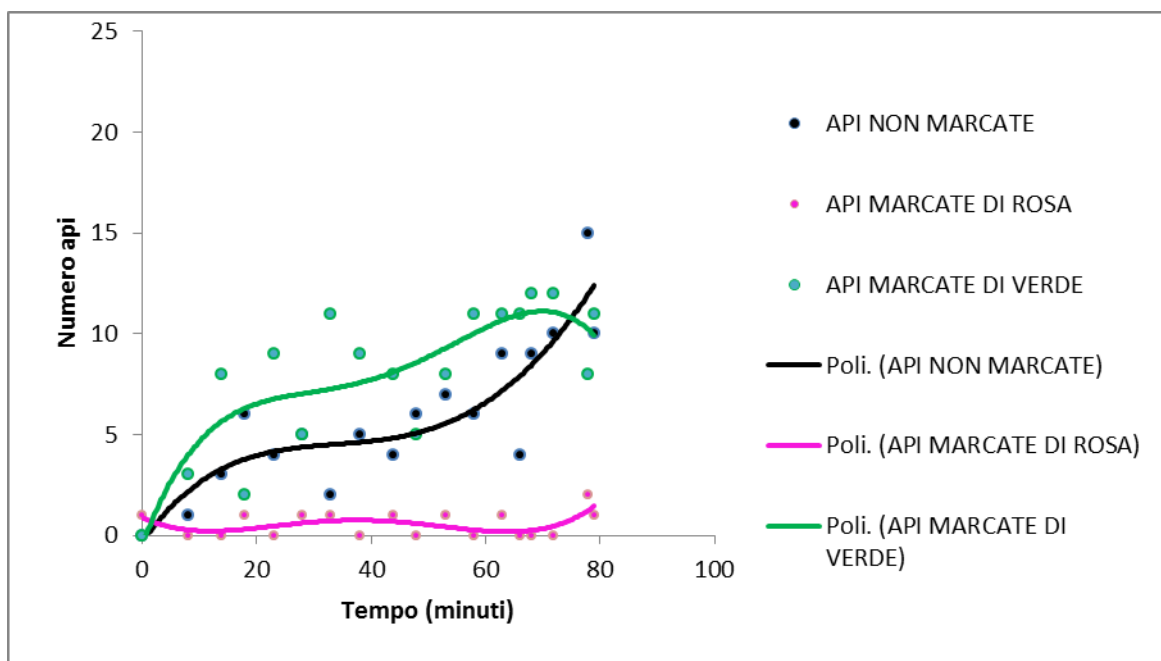


Figura 4.45 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 25.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione. Postazione di controllo del trattato.

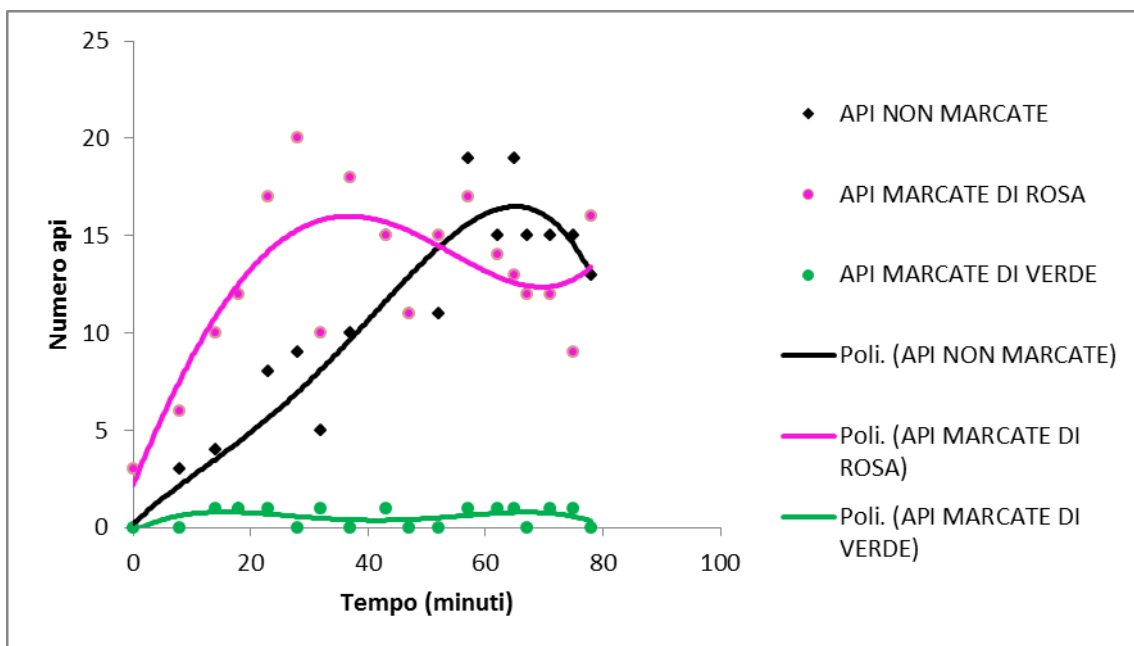


Figura 4.46 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 25.07.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione. . Postazione di controllo del testimone.

La figura 4.47, riferita alla postazione trattata, mostra che il numero di api cala dopo mezz'ora dall'inizio della prova e dopo 30 minuti di trattamento tutte le api hanno abbandonato il sito.

La situazione è diversa nella figura 4.48, riferita alla postazione del testimone, in questo caso l'andamento del numero di api che visitano la postazione è costante per l'intera prova. Rispetto alle prove con 40 ppb la differenza più evidente è il calo molto più netto nella postazione trattata.

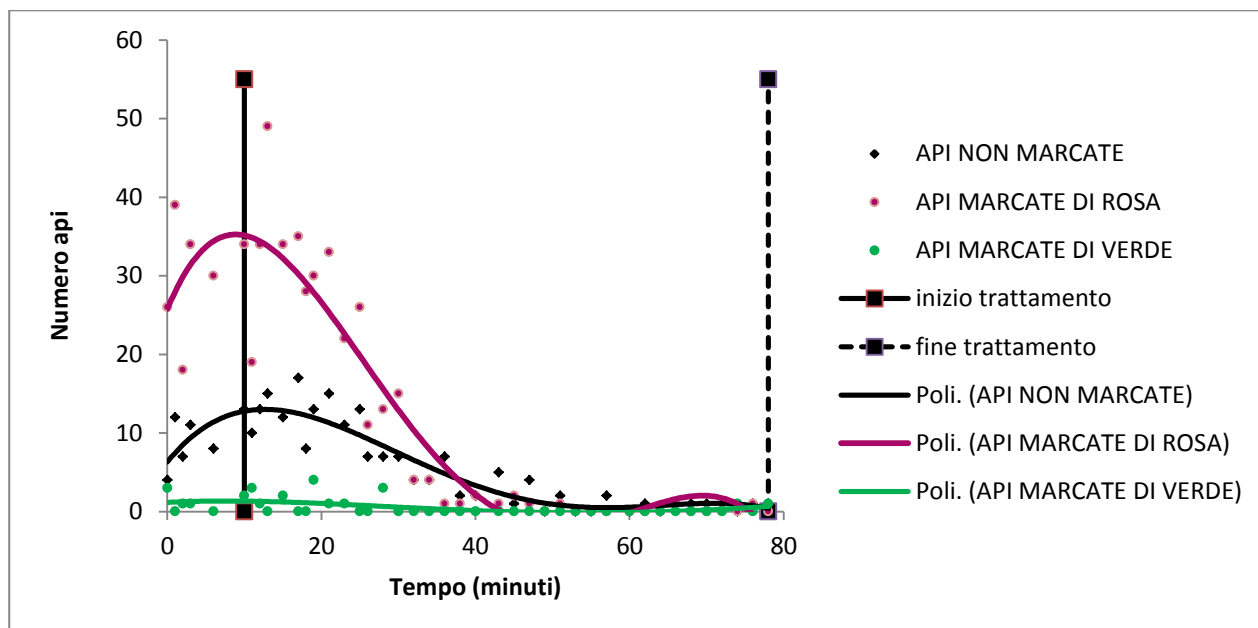


Figura 4.47 Sito 4, (500 metri dall'alveare, 05.08.15) in presenza di Clothianidin 80 ppb. La retta verticale continua indica il momento dell'immissione dell'insetticida. La tratteggiata indica il ripristino della soluzione zuccherina. Il colore nero indica api non marcate. Il colore rosa indica api marcate nella stessa postazione. Il colore verde indica api marcate in un'altra postazione.

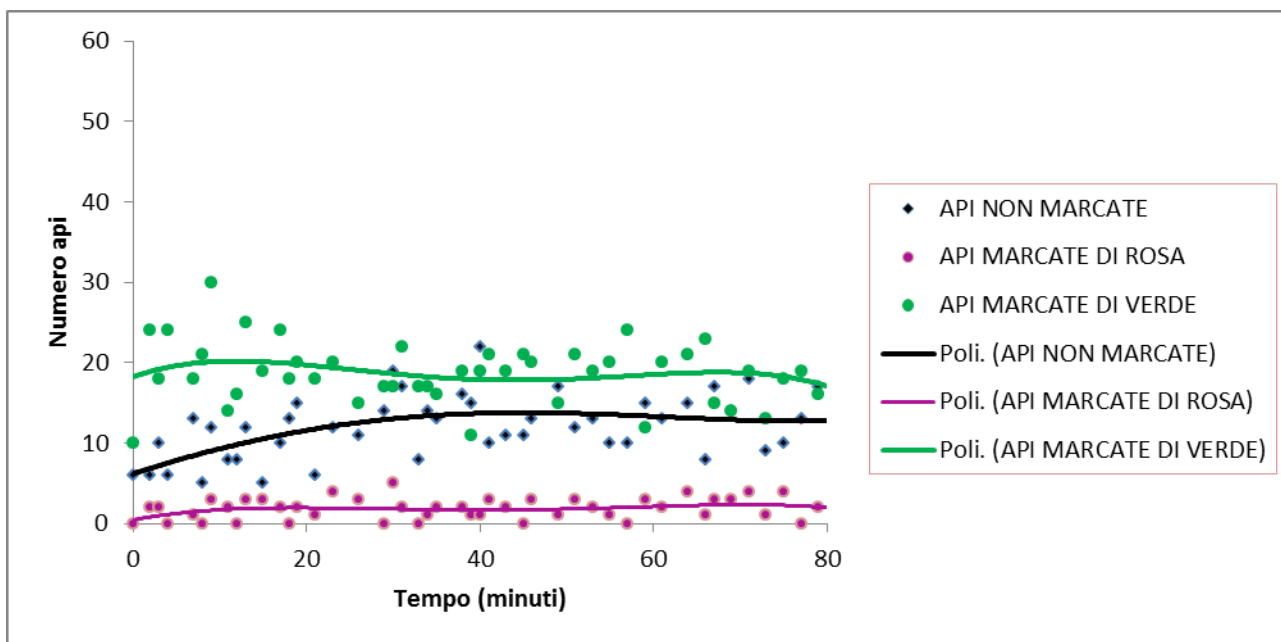


Figura 4.48 Sito 3, (500 metri dall'alveare, 05.08.15) in assenza di Clothianidin. Il colore nero indica api non marcate. Il colore verde indica api marcate nella stessa postazione. Il colore rosa indica api marcate in un'altra postazione.

4.5 ANDAMENTO DEL NUMERO DI API NELLE FASI DELLA SPERIMENTAZIONE.

Al fine di avere un quadro più chiaro sull'andamento del numero di visite delle sole api marcate, in questo paragrafo verranno presentati il numero medio di api marcate per rilievo dominanti nella postazione nelle tre fasi della sperimentazione: fase pre-trattamento, fase trattamento e fase post-trattamento.

È necessario premettere, che il criterio per scegliere la postazione che sarebbe diventata la postazione trattata nel giorno del trattamento è stato il numero maggiore di visite delle api nella postazione durante i primi rilievi fotografici. Automaticamente, alla postazione che aveva ricevuto meno visite, è stato assegnato il ruolo di postazione del testimone. Questo è il motivo per cui, nella maggior parte dei grafici, la postazione trattata parte da un numero maggiore di api.

Di seguito, sono riportati i criteri con cui sono stati scelti i 3 periodi: pre-trattamento; trattamento; post-trattamento.

Il pre-trattamento prende in considerazione la media del numero di api marcate dominanti nella postazione trattata e in quella del testimone, a partire dall'inizio dei rilievi, fino al decimo minuto dopo l'inizio del trattamento con la soluzione zuccherina contenente il Clothianidin. Come indicato nella legenda, le colonne dell'istogramma di colore rosso fanno riferimento alla media di api marcate nella postazione trattata; mentre, le colonne in blu si riferiscono alla postazione del testimone.

I rilievi, che fanno parte del periodo del trattamento, partono dal rilievo in cui si assiste al dimezzamento della media del numero di api sulla postazione trattata fino al termine del trattamento, che in alcuni casi coincideva con il termine della prova.

I rilievi, che fanno parte del periodo chiamato post-trattamento, sono tutti i rilievi dell'intera prova riguardanti le api marcate dominanti, in entrambe le postazioni, effettuata il giorno successivo al trattamento.

Le prove sono riportate nello stesso ordine utilizzato precedentemente per gli altri grafici, in base alla concentrazione dell'insetticida (20 ppb; 40 ppb; 80 ppb) e al periodo autunnale o estivo in cui la prova si è svolta.

In questo modo si è voluto verificare, prima, quali effetti ha provocato il Clothianidin durante il trattamento, ma anche la consistenza nella presenza delle api il giorno seguente lo svolgimento di una prova. A seguito del ripristino della soluzione zuccherina, priva di insetticida, nel giorno seguente si osserva un ritorno delle api marcate nella postazione del trattato rispetto a quella testimone via via più basso all'aumentare della concentrazione.

4.5.1 Prove con concentrazione di insetticida di 20 ppb.

Dall'osservazione del grafico ,figura 4.49, si può osservare che il numero medio di api all'inizio nella fase pre-trattamento era più elevato nella postazione trattata. Durante il trattamento a 20 ppb di Clothianidin si assiste ad un calo nel numero di visite delle api, ciò porta quasi ad eguagliare il numero di api presenti nelle due postazioni. Nel giorno successivo, la situazione si presenta simile alla fase pre-trattamento: le api marcate dominanti nella postazione trattata tornano in massa e aumentano rispetto al giorno prima, mentre nella postazione testimone le api si mantengono costanti durante i 3 periodi. I risultati ci inducono a pensare che la concentrazione di 20 ppb presente in una fonte nutritiva non ha provocato effetti permanenti ed evidenti nel comportamento delle api bottinatrici.

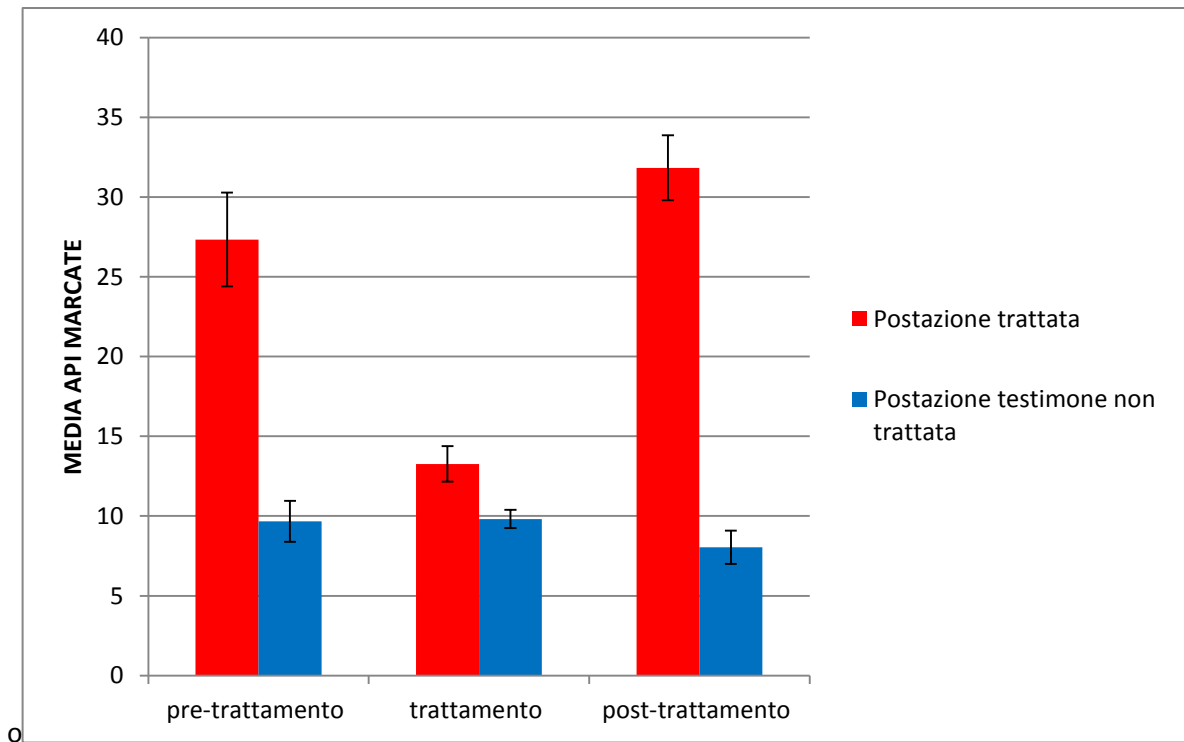


Figura 4.49. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 20.08.15) in presenza di Clothianidin 20 ppb. Esperimento del 21.08.15 in assenza di Clothianidin.

4.5.2 Prove con concentrazione di insetticida di 40 ppb. estate del 2015.

I 4 grafici, (figure 4.50, 4.51, 4.52, 4.53), ci forniscono informazioni simili, nonostante le prime 3 prove si siano svolte nel sito 3 a 50 m dall'alveare, e la quarta nel sito 4 a 500 m .

Alla concentrazione di 40 ppb il trattamento sembra determinare delle conseguenze sulla presenza delle api il giorno successivo seppur questo non avviene in tutte le prove chiaramente. Rispetto alla concentrazione di 20 ppb nella fase trattamento le api smettono quasi di visitare la postazione e calano almeno del 60% circa rispetto ai numeri del pretrattamento. Nel giorno seguente si assiste, per quanto riguarda le api trattate, ad un ritorno totale nella prima prova, mentre nelle altre 3 le api che ritornano sono in media il 50% rispetto alla situazione di pretrattamento. Nella postazione testimone le api non trattate si mantengono costanti o crescono leggermente durante il periodo in cui le altre hanno subito il trattamento, rispetto alla situazione iniziale. Il giorno dopo mantengono un numero di visite paragonabile al giorno prima o in alcuni casi leggermente inferiore.

Si può concludere, che l'effetto del trattamento le fa calare quasi subito in modo importante, ma il giorno dopo tornano seppur mostrando mediamente una diminuzione delle presenza nella postazione trattata.

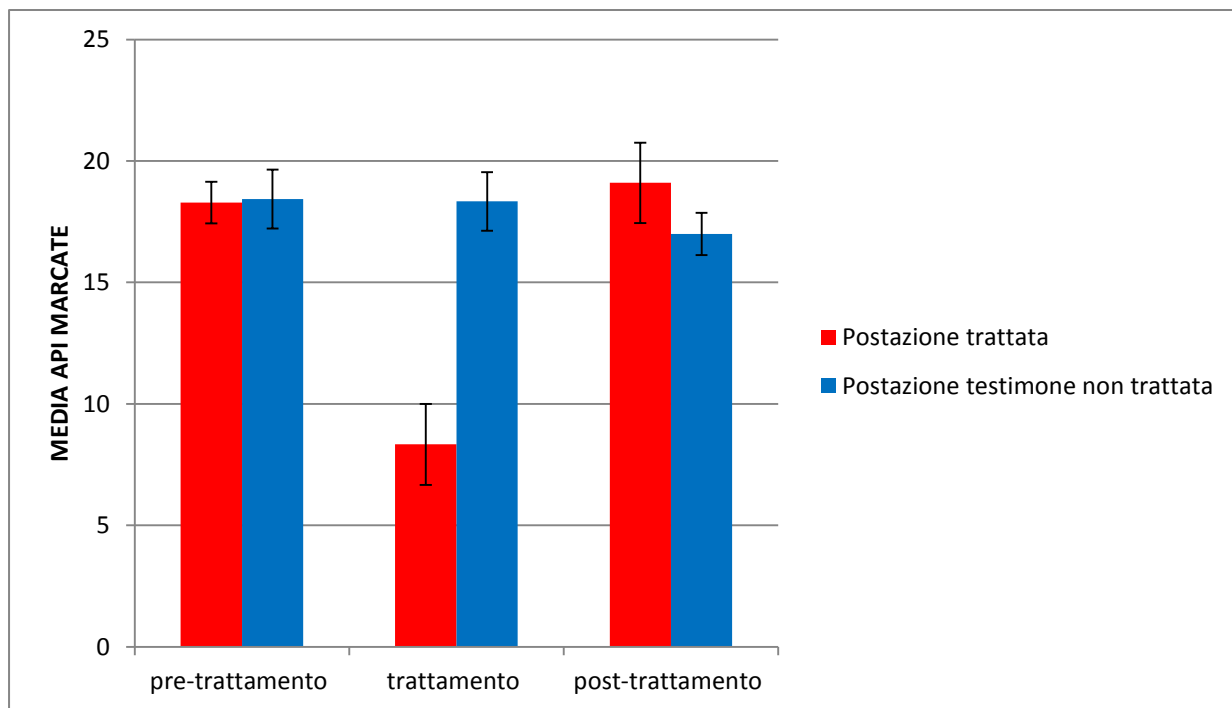


Figura 4.50. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 25.06.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. Esperimento del 26.06.15 in assenza di Clothianidin.

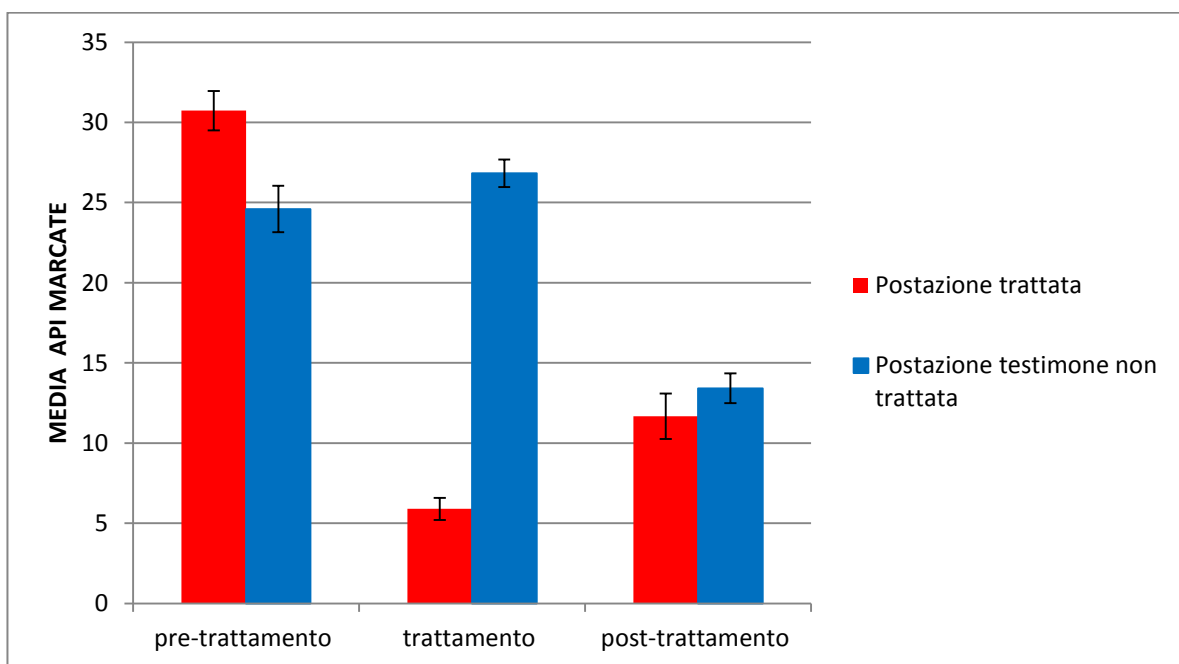


Figura 4.51. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 03.07.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. Esperimento del 04.07.15 in assenza di Clothianidin.

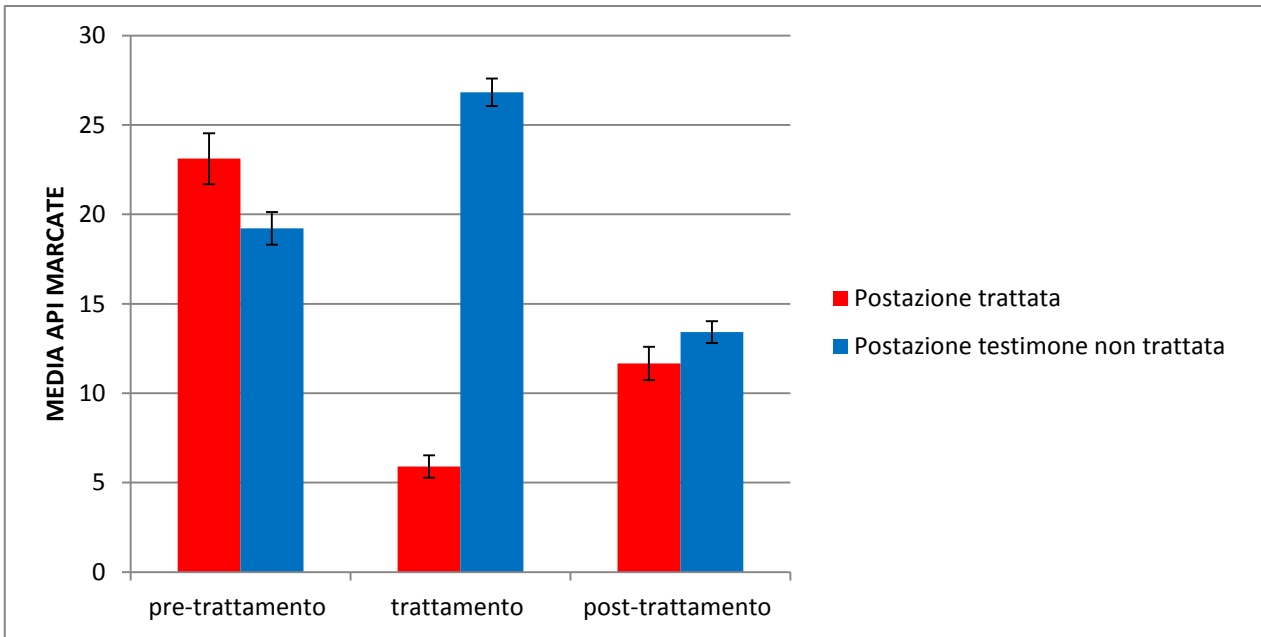


Figura 4.52. Sito 3, (50 metri dall'alveare, 07.07.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. Esperimento del 08.07.15 in assenza di Clothianidin.

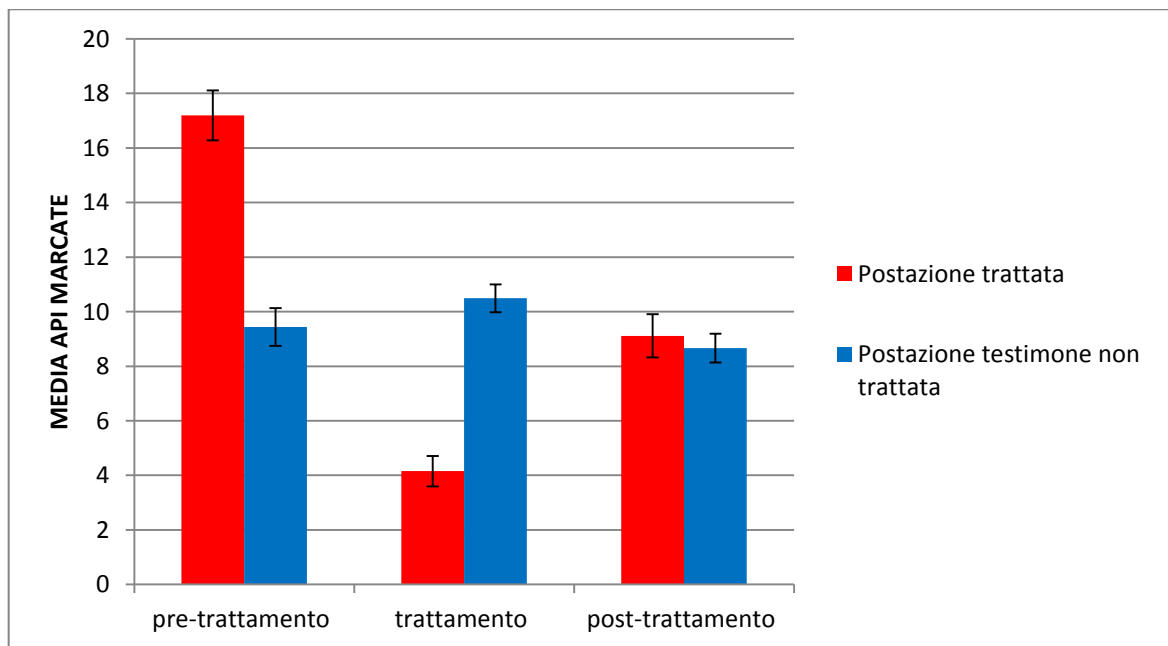


Figura 4.53. Sito 4, (500 metri dall'alveare, 30.07.15) in presenza di Clothianidin 40 ppb. Esperimento del 31.07.15 in assenza di Clothianidin.

4.5.3 Prova con concentrazione di insetticida di 80 ppb. autunno del 2014.

Alla concentrazione di 80 ppb nella stagione autunnale, figura 4.54, si nota l'evidente calo di circa il 60% nella postazione trattata durante il trattamento ed il calo anche nel giorno successivo vicino all'85% rispetto alla situazione nella fase di pretrattamento. Nella postazione testimone, invece, le api frequentano la postazione con regolarità durante le tre fasi.

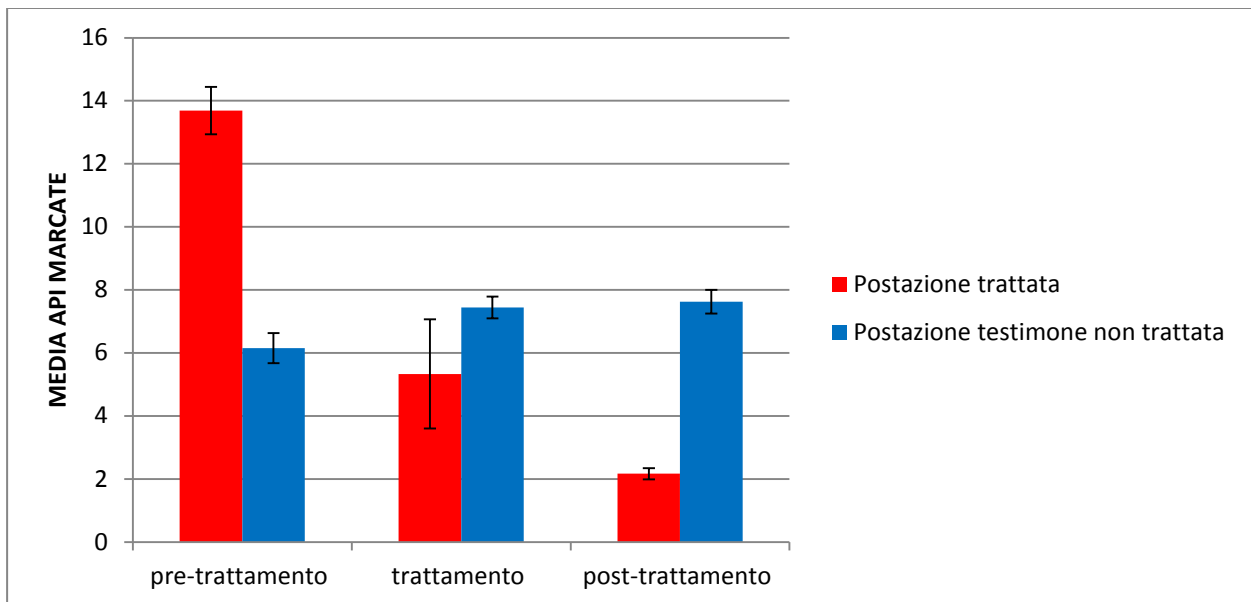


Figura 4.54 Sito 2, (15 metri dall'alveare, 26.09.14) in presenza di Clothianidin 80 ppb. Esperimento del 27.09.14 in assenza di Clothianidin.

4.5.4 Prove con concentrazione di insetticida di 80 ppb. estate del 2015.

Dalle 3 prove effettuate, (figure 4.55, 4.56, 4.57) si può vedere che durante il trattamento il calo delle api trattate è del 70% nella prima prova e del 90% circa nella seconda e terza prova, rispetto al pretrattamento. Nella fase di post-trattamento le api tornano in modo esiguo: il calo, rispetto al pretrattamento, è di circa il 50% nella prima e nella terza prova e un calo più accentuato del 70% circa nella seconda prova. Nella postazione non trattata le api bottinatrici rimangono stabili o crescono durante le fasi successive al pretrattamento. Rispetto alle prove con 40 ppb, la concentrazione di 80 ppb provoca un calo più consistente durante il trattamento e il ritorno nel giorno successivo è molto più esiguo.

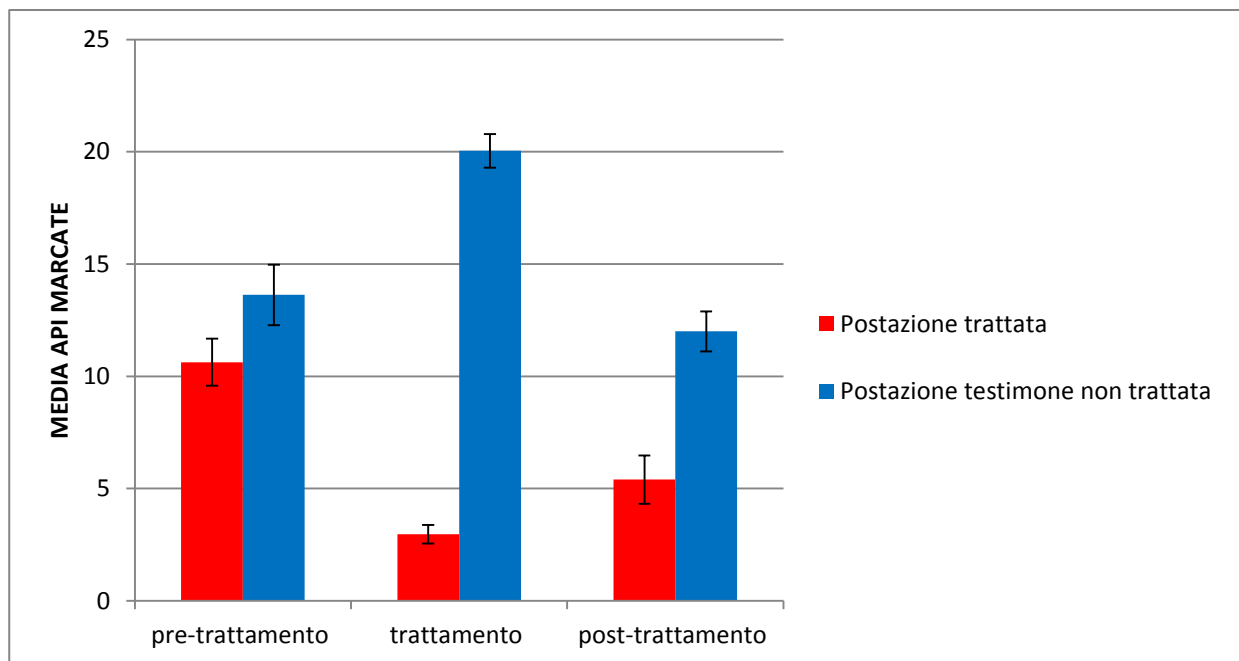


Figura 4.55 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 10.07.15) in presenza di Clothianidin 80 ppb. Esperimento del 11.07.15 in assenza di Clothianidin.

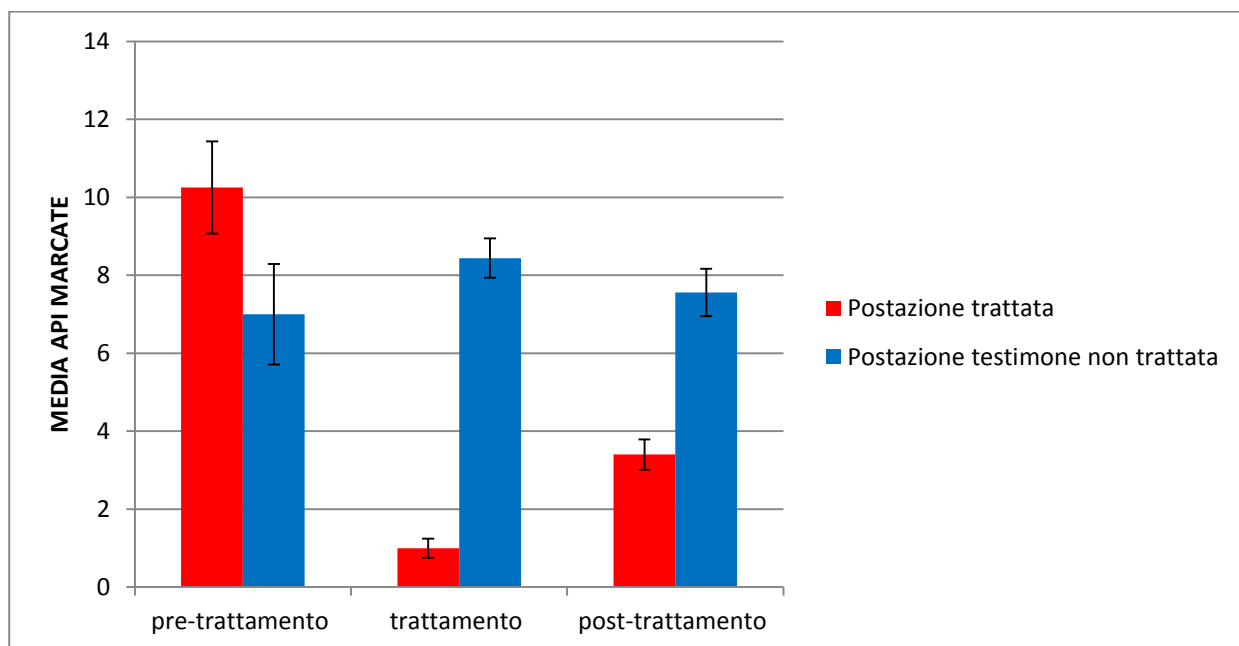


Figura 4.56 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 16.07.15) in presenza di Clothianidin 80 ppb. Esperimento del 17.07.15 in assenza di Clothianidin.

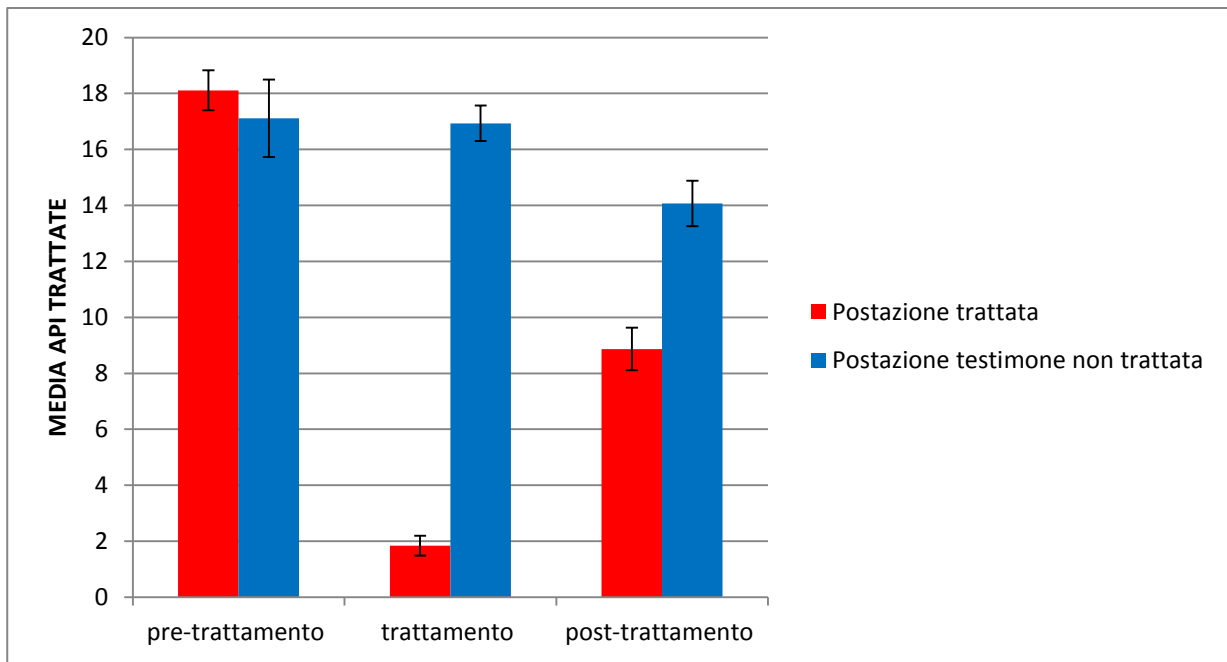


Figura 4.57 Sito 3, (50 metri dall'alveare, 24.07.15) in presenza di Clothianidin 80 ppb. Esperimento del 25.07.15 in assenza di Clothianidin.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro è focalizzato sulla possibilità di marcare in massa api bottinatrici e di valutarne il comportamento in presenza o meno di insetticidi nelle fonti nutritive.

Precedenti indagini, infatti, avevano messo in luce una stretta relazione tra insetticida nelle soluzioni zuccherine e abbandono da parte delle api della fonte “contaminata”, che avveniva in tempi inversamente proporzionali alla concentrazione, con un ritorno delle api una volta ripristinata la soluzione zuccherina senza insetticida. Il “ritorno” era evidente e veloce per le concentrazioni di Clothianidin più basse e diventava più lento e parziale con il progressivo aumento della concentrazione di insetticida.

L’adozione della marcatura di un numero esiguo di api, una decina o poco più singolarmente e individualmente riconoscibili, aveva permesso di evidenziare che alcune api visitassero gli alimentatori sia nella fase di trattamento che in quella successiva (come le prime prove descritte in questa tesi). Ma questo tipo di marcatura dava informazioni solo parziali su alcune api ma non dava la possibilità di fare alcuna considerazione sul gran numero di api che visitavano gli alimentatori.

La marcatura di massa delle api, proposta in questa tesi, ha permesso di evidenziare la fedeltà delle api al sito, le api marcate continuavano a visitare anche nei giorni successivi la stessa postazione, seppur le postazioni ad esempio nel sito 2 fossero distanti meno di una decina di metri.

La marcatura ha dato la possibilità di dimostrare che le api che abbandonano la postazione nella quale è presente l’insetticida tendono a non spostarsi sulla postazione con la sola soluzione zuccherina, dove peraltro permangono numerose le api diversamente marcate. I grafici mostrano come vi sia sempre un numero non elevato di api che visitano la postazione sulla quale non sono state marcate; nella prima prova effettuata nell’estate 2015 vi è la percentuale più alta, in questa fase le api erano state suddivise in due gruppi e dovevano ancora assestarsi tra le due postazioni, ma di regola il numero di api marcate che visitano la postazione sulla quale non sono state marcate si è attestato attorno al 5%.

Anche in presenza di allontanamenti di massa, nel volgere di qualche decina di minuti dalle postazioni con presenza di insetticida, il numero di api marcate nella postazione controllo non ha subito discostamenti significativi, non si è notata infatti una tendenza ad aumentare nel tempo pur tenendo conto, che le api gratificate dalla soluzione non contaminata potrebbero continuare a frequentare la postazione non trattata con numeri crescenti nel tempo.

In sintesi, non si assiste ad uno spostamento di api dalla postazione trattata al quella non trattata (e viceversa). La scomparsa delle api marcate dai siti avvelenati sembrerebbe definitiva e comunque coincidente con la sospensione dell’attività bottinatrice (tale aspetto merita ulteriore conferma attraverso l’analisi delle immagini sul predellino dell’alveare).

E’ stato confermato che l’abbandono delle api bottinatrici dei siti avvelenati avviene in tempi inversamente proporzionali alla concentrazione dell’insetticida senza che l’arrivo di api non marcate possa sovvertire

l'analisi dell'abbandono, ovvero l'abbandono interessa in massa le api precedentemente presenti nel sito trattato e il numero di api non marcate mostrano un comportamento simile rispetto a quelle marcate. Questo ci fa pensare che il numero di api nuove, richiamate in momenti successivi rispetto all'inizio delle prove, costituisca un numero molto ridotto.

L'abbandono delle postazioni trattate si presenta con tempi simili in tutte le prove ed inoltre i tempi sono paragonabili a quelli delle prove effettuate in altri lavori di tesi effettuati nel corso del 2013 e 2014. L'ottenimento di risultati simili con alveari diversi in più anni e ambienti è garanzia di grande solidità dei dati. Per le prove svolte a diverse distanze non sembrano evidenziare differenze nel comportamento delle api, mentre il periodo dell'anno in cui si svolgono le prove sembra avere un effetto sui tempi di risposta alla presenza dell'insetticida. Nel periodo autunnale l'abbandono delle postazioni trattate è più veloce rispetto quello che avviene in estate; le api autunnali sembrano essere quindi più sensibili all'insetticida e questo aspetto merita degli approfondimenti futuri.

La marcatura delle api ha permesso anche di analizzare cosa avviene il giorno successivo allo svolgimento di una prova di trattamento con insetticida delle due postazioni costituenti un sito.

Da tutte le prove svolte alle diverse concentrazioni si può evidenziare come un buon numero di api marcate tornino a visitare le postazioni sia quella che il giorno precedente era stata il controllo sia quella nella quale si era svolto il trattamento con insetticida; nella quasi totalità delle prove, inoltre, le marcate delle rispettive postazioni rappresentano la quota di api maggioritaria. Ci sono stati rari casi di prove svolte lontane dall'alveare nella quali api non marcate di provenienza ignota sono diventate prevalenti nelle postazioni.

Se si analizzano i dati della presenza delle api marcate nella diverse fasi (pre-trattamento, trattamento e post trattamento) si evidenziano delle differenze tra le prove effettuate a diverse concentrazioni.

Nel caso della prova effettuata con una concentrazione di 20 ppb nella postazione trattata si evidenzia un consistente calo del numero medio di api marcate, il giorno successivo nella fase post-trattamento il numero di visite raggiunge gli stessi valori che vi erano nella fase pre-trattamento. Una situazione intermedia è quella che si presenta a concentrazioni di 40 ppb; si ha innanzi tutto un calo più consistente rispetto alla concentrazione di 20 ppb nel numero medio di api che visitano gli alimentatori nella fase trattamento. Confrontando i valori della postazione trattata e quella controllo nelle fasi pre-trattamento e post-trattamento si evidenzia una ripresa parziale nel numero di api marcate nella postazione trattata; un quota di api marcate, seppur limitata, nella postazione trattata sembra essere "scomparsa". Questa scomparsa di api marcate nella postazione trattata diventa più consistente ed evidente in tutte le prove effettuate a 80 ppb. Una quota delle api, che interrompe l'attività di bottinaggio durante la fase di trattamento, sembra quindi avere delle conseguenze in seguito all'assunzione di insetticida. Possiamo solo ipotizzare quale sia il destino di queste api, in nessuna delle prove è stato evidenziato accumulo di api morte marcate davanti all'alveare, possiamo escludere che le api siano tornate all'alveare e siano morte

all'interno di questo. Un'altra ipotesi potrebbe essere quella che queste api vaghino "intontite" trovando poi la morte all'esterno dell'alveare. L'analisi delle immagini registrate all'entrata dell'alveare potrà sicuramente offrire una visione più completa di questo aspetto.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & applied acarology*, 24(3), 165-189.

Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., & Pham-Delegue, M. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology*, 58(2), 107.

Baird, S., Garrison, A., Jones, J., Avants, J., Bringolf, R., & Black, M. (2013). Enantioselective toxicity and bioaccumulation of fipronil in fathead minnows (*Pimephales promelas*) following water and sediment exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1), 222-227.

Belfrage, K., Björklund, J., & Salomonsson, L. (2005). The effects of farm size and organic farming on diversity of birds, pollinators, and plants in a Swedish landscape. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 34(8), 582-588.

Bengtsson, J., Ahnström, J., & WEIBULL, A. C. (2005). The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. *Journal of applied ecology*, 42(2), 261-269.

Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2), 107.

Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.

Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5603-5614.

Bortolotti, L., Montanari, R., Marcelino, J., Medrzycki, P., Maini, S., & Porrini, C. (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 56, 63-68.

Broznić, D., & Milin, Č. (2013). Mathematical prediction of imidacloprid persistence in two Croatian soils with different texture, organic matter content and acidity under laboratory conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(11), 906-918.

Chinery, M., Manicasteri, C., & Infanti, O. (1987). *Guida degli insetti d'Europa: atlante illustrato a colori*. Franco Muzzio.

Colin, M. E., Bonmatin, J. M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., & Vermandere, J. P. (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(3), 387-395.

Collett, T. S., Fry, S. N., & Wehner, R. (1993). Sequence learning by honeybees. *Journal of comparative Physiology A*, 172(6), 693-706.

Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., ... & Lipkin, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848), 283-287.

D. Besomi,(2014).Quanto vale il volo di un'ape?. <http://www.apicoltura.ch>

Dahle, B. (2010). The role of Varroa destructor for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 124-125.

Decourtye, A., & Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In *Insect nicotinic acetylcholine receptors* (pp. 85-95). Springer New York.

Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106.

Dobermann, A. (2012). Getting back to the field. *Nature*, 485(7397), 176-177

Doublet, V., Labarussias, M., Miranda, J. R., Moritz, R. F., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental microbiology*, 17(4), 969-983.

ECETOC, 1993b DHTDMAC: Aquatic and Terrestrial Hazard Assessment (CAS No. 61789-80-8) http://www.ecetoc.org/uploads/Publications/Publications%20Catalogue/ECETOC_Publications_Catalogue.pdf.

EFSA(European Food Safety Authority) (2013a) (2012a) STATEMENT OF EFSA Statement on the finding in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorized in Europe European Food Authority (EFSA), Parma , Italy, EFSA Journal 2012,10(6):2752.

Eiri, D. M., & Nieh, J. C. (2012). A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *The Journal of experimental biology*, 215(12), 2022-2029.

Fantinato M. 2014. Contenuto di insetticidi neonicotinoidi in soluzioni nutritive e percezione del rischio di intossicazione in apis mellifera. Relatore Tapparo A. Correlatori Petrucco Toffolo E., Girolami V. Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Facoltà di Agraria. Università degli studi di Padova. Legnaro, Padova.

Fishel, F. M. (2005). Pesticide toxicity profile: neonicotinoid pesticides. *University of Florida, IFAS*.

Floris, I., Carpana, E., Bassi, S., Formato, G., Cersini, A., & Lodesani, M. (2014). Malattie batteriche. In *Patologia e avversità dell'alveare* (pp. 49-121). Springer Milan.

Fontana, P., Di Prisco, G., Malagnini, V., & Angeli, G. (2013). Conoscere e controllare la Varroa in Trentino: contenimento dell'acaro Varroa destructor nell'ambito dell'apicoltura di montagna.

Fries, I. (1993). Varroa in cold climates; population dynamics, biotechnical control and organic acids. *Living with varroa. International Bee Research Association (IBRA), London, England*, 37-48.

Fries, I., Imdorf, A., & Rosenkranz, P. (2006). Survival of mite infested (Varroa destructor) honey bee (Apis mellifera) colonies in a Nordic climate. *Apidologie*, 37(5), 564-570.

Frisch K. von,(1976) Il linguaggio delle api. Torino :Editore Boringhieri.

Gabriel, D., & Tschardtke, T. (2007). Insect pollinated plants benefit from organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 118(1), 43-48.

Genersch, E., Von Der OHE, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Böhler, R., ... & Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332-352.

Girolami, V., Marzaro, M., Vivan, L., Mazzon, L., Greatti, M., Giorio, C., ... & Tapparo, A. (2012). Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. *Journal of applied entomology*, 136(1-2), 17-26.

Greatti, M., Barbattini, R., Stravisi, A., Sabatini, A. G., & Rossi, S. (2006). Presence of the ai imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho® dressed seeds. *Bulletin of Insectology*, 59(2), 99.

Gregorc, A., & Ellis, J. D. (2011). Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2), 200-207.

GU 164 (2013) Gazzetta ufficiale 164 del 15.07.2013. Decreto del Ministero della Salute del 25 giugno 2013, Proroga della sospensione cautelativa dell'autorizzazione all'impiego di sementi trattate con prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva fipronil, di cui al decreto dirigenziale del 25 gennaio 2013.

GU 165 (2013). Gazzetta ufficiale 165 del 16.07.2013. Decreto del Ministero della Salute del 25 giugno 2013, Revoca delle autorizzazioni all'immissione in commercio e all'impiego di prodotti fitosanitari, contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam e imidacloprid, per il trattamento delle sementi e del terreno, ai sensi del regolamento di esecuzione (UE) n. 485/2013 della Commissione del 24 maggio 2013 e che vieta l'uso e la vendita di sementi conciate con prodotti fitosanitari contenenti tali sostanze attive.

Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Kleijn, D., & Tschardtke, T. (2007). Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: effects of farming system, landscape composition and regional context. *Journal of Applied Ecology*, 44(1), 41-49.

Jeschke, P., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science*, 64(11), 1084-1098.

Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie*, 41(3), 312-331.

Kakamand, F. A. K., Mahmoud, T. T., & Amin, A. B. M. (2008). The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honeybee *Apis mellifera* L. workers. *Journal of Dohuk University*, 11(1), 144-151.

Karahan, A., Çakmak, I., Hranitz, J. M., Karaca, I., & Wells, H. (2015). Sublethal imidacloprid effects on honey bee flower choices when foraging. *Ecotoxicology*, 1-9.

Kirchner, W. H. (1999). Mad-bee-disease? Sublethal effects of imidacloprid (Gaucho) on the behaviour of honeybees. *Apidologie (France)*.

Laurino, D., Porporato, M., Patetta, A., & Manino, A. (2011). Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bull Insectol*, 64(1), 107-113.

Marzaro, M., Vivan, L., Targa, A., Mazzon, L., Mori, N., Greatti, M., ... & Girolami, V. (2011). Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *Bulletin of Insectology*, 64(1), 119-126.

Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 573-580.

Maus, C., Cure, G., Schmuck, R., Porrini, C., & Bortolotti, L. (2003). Safety of imidacloprid seed dressings to honey bees: a comprehensive overview and compilation of the current state of knowledge. *Bulletin of Insectology*, 56, 51-58.

Moritz, R. F., De Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., & Paxton, R. J. (2010). Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, 41(3), 227-242.

Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., & Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS one*, 5(3), e9754.

Nauen, R., & Denholm, I. (2005). Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 58(4), 200-215.

- Nazzi, F., Brown, S. P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., ... & Pennacchio, F. (2012). Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog*, *8*(6), e1002735.
- Pettis, J. S., Johnson, J., & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Naturwissenschaften*, *99*(2), 153-158.
- Schaefer, B. (2008). Nicotin and Neonicotinoide-part 2 Neonicotinoide. *Chemie in unserer Zeit*, *42*(6), 408-424.
- Schneider, C. W., Tautz, J., Grünewald, B., & Fuchs, S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS one*, *7*(1), e30023.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry*, *20*(11), 2482-2486.
- Thompson, H. M., & Maus, C. (2007). The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest Management Science*, *63*(11), 1058-1061.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*, *48*(1), 339-364.
- Tuck, S. L., Winqvist, C., Mota, F., Ahnström, J., Turnbull, L. A., & Bengtsson, J. (2014). Land-use intensity and the effects of organic farming on biodiversity: a hierarchical meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, *51*(3), 746-755.
- Van der Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., van Lexmond, M. B., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., ... & Wiemers, M. (2015). Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(1), 148-154.
- Van der Sluijs, J. P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J. M., & Belzunces, L. P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current opinion in environmental sustainability*, *5*(3), 293-305.

Van Engelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R. M., & Pettis, J. S. (2010). A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of apicultural research*, 49(1), 7-14.

Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J. L., ... & Delbac, F. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS one*, 6(6), e21550.

Yang, E. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. L., & Chang, L. H. (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 101(6), 1743-1748.