



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA - FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA AMBIENTALE E PRODUZIONI VEGETALI

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN SCIENZE E TECNOLOGIE
PER L'AMBIENTE ED IL TERRITORIO

TITOLO

**STUDIO DELL'ESPOSIZIONE AMBIENTALE DELLE API AGLI INSETTICIDI NEONICOTINOIDI
IMPIEGATI NELLA CONCIA DEI SEMI DI MAIS E SUA RILEVANZA PER LA COMPrensIONE DEL
COLONY COLLAPSE DISORDER (CCD)**

RELATORE: PROF. ANDREA TAPPARO
CORRELATORE: PROF. VINCENZO GIROLAMI

LAUREANDO: ANDREA TARGA
MATRICOLA N. 585497

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	
1.1 Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari	7
1.2 La concia delle sementi	9
1.3 I principi attivi impiegati nella concia dei semi di mais	11
1.4 I blocchi normativi all'utilizzo dei concianti a livello italiano ed europeo	17
1.5 La guttazione fogliare	18
1.6 Scopo della tesi	20
2. MATERIALI E METODI	
2.1 Materiali	21
2.2 Procedure sperimentali	26
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	
3.1 Considerazioni sulla metodologia d'analisi	37
3.2 Analisi del contenuto di p.a. all'interno di sementi conciate con diverse formulazioni insetticide	43
3.3 Analisi del contenuto di p.a. insetticidi in gocce di guttazione fogliare raccolte da plantule di <i>Zea mays</i> ottenute da semi concianti	47
3.4 Analisi della dispersione di insetticidi neonicotinoidi durante la semina di mais conciato	54
3.5 Caratterizzazione dimensionale delle particelle emesse dalla macchina seminatrice	61
3.6 Analisi dei residui di insetticidi in campioni di api esposte	68
4. CONCLUSIONI	71
5. BIBLIOGRAFIA	75
6. RINGRAZIAMENTI	77

Assessment of the environmental exposure of honey bees to neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds and its relevance to the Colony Collapse Disorder

Abstract

Colony Collapse Disorder (CCD), the sudden loss of most honeybees of the hive, represents a worldwide crisis. The consequent losses in crops productivity and plant pollination constitute a major emergency from both economical and ecological standpoints. Although on the causes of CCD several hypothesis have been advanced (parasitic mites, viruses, insecticides, etc.) up to the present no one has been clearly supported by experimental results. In several countries the phenomenon is mainly observed in the period of corn sowing (spring), that generally occurs using corn seeds coated with specific insecticides. As a consequence, seed-coating neonicotinoid insecticides that are extensively utilized in the corn crops have been blamed for CCD.

In this thesis, two possible ways of environmental exposure and intoxication of honeybees to neonicotinoid insecticides were studied:

- 1) the atmospheric emission of particulate matter containing the insecticide by the sowing-machine;
- 2) the translocation of the systemic neonicotinoids from the coated seed to guttation drops of young corn plants.

Quantitative measurements conducted both in laboratory (greenhouse) and in the field have demonstrated that both mechanisms (guttation drops and the particulate matter released during the sowing of corn seeds coated with neonicotinoid insecticides) may represent two significant ways of environmental diffusion of the neonicotinoids. Both ways are able to produce lethal exposure toward bees: the death manifests within few minutes if bees consume guttation drops or within few hours if they are exposed to particulate matter produced by the sowing machine. A new, recently proposed seed-coating results more resistant in comparison to that used up to 2008 but it doesn't prevent the dispersion of large amounts of fine particulate matter containing the insecticide.

The present quantification of the two exposure ways for bees to neonicotinoids seems to suggest the causal hypothesis that associates such insecticides to CCD, at least in the spring time during the period of the corn sowing.

1 INTRODUZIONE

1.1 Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari

Nell'ultimo decennio si è osservata a livello internazionale una diffusa e progressiva crisi nel settore dell'apicoltura, in conseguenza ad estese morie di api che portavano sovente allo spopolamento completo dei relativi alveari. Questo fenomeno ha assunto intensità particolarmente preoccupante fra il 2005 ed il 2008, con perdite fino al 40% del totale degli alveari produttivi in alcuni stati europei, e fino al 35% del totale negli USA, dove fenomeni di mortalità elevata erano già stati registrati dagli inizi degli anni '90 ("4th CoLoss Meeting", 2009).

Questa generalizzata moria delle api, denominata in seguito "Colony Collapse Disorder" (CCD) ha fatto nascere nella comunità scientifica internazionale una serie di ipotesi sulla causa di tali morie, tra le quali la forte diffusione di patologie dell'ape come alcune virosi, o l'attacco sempre più intenso di alcuni classici parassiti come *Varroa destructor* o *Nosema apis*, le pratiche apistiche sempre più "spinte" con una forte selezione genetica delle api regine, la diminuzione della ricchezza di nutrienti per le api nelle campagne in seguito all'uso massiccio di diserbanti e alla diminuzione dei prati incolti, i campi elettromagnetici sempre più intensi, ma anche il diffuso inquinamento dell'ambiente, soprattutto per la presenza di agrofarmaci.

I sintomi che sembrano caratterizzare gli alveari colpiti da CCD comprendono: (i) improvvisa scomparsa delle api adulte della colonia e presenza di poche api rimaste in prossimità della colonia stessa; (ii) presenza di molti favi con covata opercolata non alterata con bassi livelli di infestazione da varroa; (iii) scorte di alimento non oggetto di saccheggio, nonostante nelle vicinanze siano presenti altre colonie attive, quasi ad indicare che le altre api evitano le colonie morte. Molti apicoltori interessati dal fenomeno hanno riferito che, almeno due mesi prima della segnalazione della CCD, le loro colonie si trovavano in una qualche condizione di stress, con api apparentemente "disorientate" e presentanti difficoltà di coordinamento motorio e tremori incontrollati del corpo.

Negli ultimi anni sono stati compiuti particolari sforzi nel determinare il ruolo che può aver avuto la presenza di determinati agrofarmaci nell'ambiente, soprattutto per la loro tossicità verso le api e altri organismi non-target. Evidenti sono inoltre state le correlazioni, segnalate

frequentemente in diversi stati europei, fra le semine primaverili di mais impieganti sementi “conciate” con principi attivi insetticidi e repentine morie negli alveari vicinanti.

All’interno della Comunità Europea non è stata intrapresa una politica comune di studio ed azione verso tale situazione ed i singoli Stati Membri hanno affrontato la problematica in maniera non-uniforme, limitando chi parzialmente, chi totalmente l’utilizzo di tali molecole. Altri Stati invece, spesso poco interessati sia alle morie di api che all’utilizzo dei prodotti in questione, non hanno provveduto in alcuna maniera.

In Italia, date le elevate perdite di api registrate negli ultimi anni, e vista l’importanza di queste per la nostra agricoltura, è stata posta una sospensiva all’utilizzo di particolari prodotti insetticidi utilizzati soprattutto in maiscoltura, dal settembre 2008; il provvedimento è stato riconfermato anche per quest’anno. Se da un lato, tali provvedimenti hanno creato preoccupazioni per alcuni comparti dell’agricoltura che sfruttavano diffusamente tali molecole, d’altro lato si è voluto tutelare il valore derivato dall’attività apistica nel nostro paese, stimato nell’ordine di 1600 milioni di euro l’anno, pari a 1240 euro per alveare (dati dal workshop “Sindrome dello spopolamento degli alveari” del 29 Gennaio 2008). Tale profitto deriva non solo dalla vendita diretta dei prodotti dell’alveare, ma soprattutto dall’opera di impollinazione di colture effettuata dalle api, che si traduce in un deciso aumento delle produzioni agricole.

Negli ultimi anni inoltre sono stati fatti grossi sforzi a livello nazionale per trovare soluzioni al problema, diverse dai blocchi imposti, creando un coordinamento fra i vari Istituti di Ricerca presenti sul territorio con l’istituzione del progetto “APENET”, coordinato dal CRA-API (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura) di Bologna. All’interno di tale progetto sono state analizzate tutte le principali ipotesi sulle cause e sui meccanismi che possono provocare la moria delle api, dividendo programmi e conoscenze fra i vari istituti partecipanti.

Tra le ipotesi sulle cause di tali morie, quelle avanzate dai ricercatori del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell’Università di Padova hanno puntato l’attenzione soprattutto sull’uso dei concianti del mais, utilizzati in maniera massiva nella Pianura Padana, ipotizzando due diversi meccanismi d’azione nell’avvelenamento delle api.

Il primo consiste nel rilascio di acqua contenente dosi rilevanti di insetticida dalle giovani plantule di mais conciato con principi attivi insetticidi, attraverso un fenomeno fisiologico chiamato “guttazione”. Tali gocce potrebbero costituire una possibile via di intossicazione acuta per le api che le utilizzassero. Le api infatti per mantenere i propri bisogni metabolici e quelli di tutto l’alveare, necessitano di assumere elevate quantità d’acqua (Visscher et al.

1996; Kühnholz and Seeley 1997), che potrebbero essere costituite proprio dalle guttazioni fogliari (Shawki et al. 2005) soprattutto in ambienti fortemente caratterizzati da monoculture quali il mais. È stato inoltre recentemente dimostrato come tali gocce di guttazione, somministrate ad un campione di api, contengano concentrazioni di principi attivi per loro letali (Girolami et al. 2009).

L'altro meccanismo preso in considerazione è la dispersione di insetticidi attraverso la semina di mais conciato, con liberazione di una frazione di principio insetticida nell'ambiente attraverso il particolato generato dall'erosione delle pellicole di concia dei semi. Tale meccanismo, in studio già da alcuni anni, è stato riconsiderato qui alla luce di nuove possibili vie di esposizione delle api a tali polveri: l'esposizione potrebbe avvenire direttamente durante i normali voli di bottinamento, o indirettamente attraverso il contatto con polveri ricadute sulla flora spontanea situata nei pressi dei campi seminati, ipotesi già studiata presso l'Università di Udine (Greatti et al. 2003; Greatti et al. 2006).

1.2 La concia delle sementi

L'operazione di concia delle sementi è una pratica sviluppata da più di una decina d'anni, consistente nell'avvolgere il seme da piantare in una pellicola contenente una certa dose di fitofarmaco. Tale composto, se agisce in modo sistemico, 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 di protezione sia dai principali fitofagi radicali, sia dai principali insetti fitofagi e fitomizi che attaccano i tessuti emersi.

La concia delle sementi ha portato ad una forte riduzione delle quantità di agrofarmaci utilizzati nei campi rispetto alle precedenti tecniche agronomiche utilizzate, che prevedevano l'uso di geodisinfestanti o di prodotti irrorati con spray, riducendo così le quantità di molecole disperse nell'ambiente. L'uso dei concianti è stato esteso oltre che al mais, anche a colture quali il cotone, la colza, il girasole, la barbabietola da zucchero ed altre.

Così, il mercato internazionale dei prodotti concianti è lievitato dagli iniziali 155 milioni di euro registrati nel 1990, ai 535 milioni di euro registrati nel 2005, di cui il 77% del totale dovuto all'utilizzo di principi attivi neonicotinoidi (Elbert et al. 2008), molecole insetticide di nuova generazione introdotte nel mercato dalla fine degli anni '90.

Anche se tale pratica sembrava ridurre i problemi di dispersione di prodotti di sintesi proprio per la modalità mirata con cui questi venivano applicati, d'altro lato si sono generate ipotesi

che puntavano il dito proprio contro tali principi attivi utilizzati nelle conche, come cause dello spopolamento degli alveari.

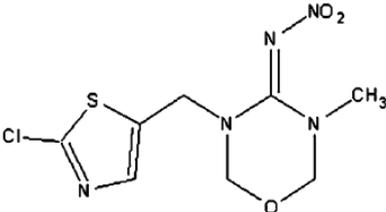
In particolare, studi effettuati in Italia fra il 2004 ed il 2006 coordinati dal Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-API) ed alcune Università italiane hanno verificato come la semina con seminatrici pneumatiche di sementi di mais contenenti fitofarmaci, rilascino nell'ambiente una notevole percentuale in massa di tali prodotti, sotto forma di polveri create con l'abrasione meccanica dei semi generata all'interno della macchina. Ulteriori studi portati avanti a livello regionale o grazie a Istituti privati hanno confermato come le semine di mais conciate con principi attivi insetticidi potessero essere responsabili della morte di molte api, ritrovando in campioni di api morte fornite da singoli apicoltori o raccolti da istituti veterinari regionali, dosi rilevanti di diversi principi attivi insetticidi utilizzati nella concia del mais (dati da "APENET", 2009).

Ciò ha portato alcuni stati europei, come Francia, Italia, Germania, Slovenia, a proporre provvedimenti sospensivi in via cautelare riguardo l'utilizzo di sementi di diverso tipo conciate con quattro principi attivi insetticidi: Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid e Fipronil (quest'ultimo non appartiene alla classe dei neonicotinoidi ma a quella dei fenilpirazoli, e non è dotato di attività sistemica nelle piante).

Tali blocchi temporanei miravano a far avanzare lo stato delle conoscenze su tali prodotti e sulla loro possibile responsabilità nella riduzione del patrimonio apistico.

1.3 I principi attivi impiegati nella concia dei semi di mais

Sono di seguito riportate le schede tecniche dei quattro principali insetticidi concianti del mais, contenenti le principali informazioni riguardo le loro proprietà chimico-fisiche, le modalità d'impiego e la relativa tossicità.

Nome	Thiamethoxam
Formula	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S
IUPAC	(EZ)-3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine
	
Peso Molecolare	291,7 g/mol
Classe chimica	Neonicotinoide – Tianicotinile
Attività	Insetticida
Modalità d'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. Risulta efficace contro tutti gli stadi di sviluppo, ad eccezione delle uova.
Modalità d'applicazione	Nelle applicazioni fogliari, grazie all'attività translaminare penetra nei tessuti e grazie alla sua azione sistemica si distribuisce uniformemente nella pianta sfruttando il circolo xilematico. Nelle applicazioni al terreno, anche come conciante del seme, viene efficacemente assorbito dalle radici grazie alla sua elevata solubilità ed è traslocato in tutti gli organi della pianta. La molecola è in grado comunque di legarsi alle particelle di terreno, costituendo una zona ristretta ad elevata concentrazione del principio.
Insetti controllati	Afidi, dorifora, aleurodidi, insetti terricoli, pulce del tabacco...
<u>Caratteristiche chimico-fisiche</u>	
Pressione di vapore	6,6 x 10 ⁻⁹ Pa a 25°C
Solubilità	4,1 g/L in acqua a 25°C
Coeff. Ripartiz. n-ottanolo/acqua	Log K _{ow} = - 0,13 (K _{ow} = 0,74)
<u>Tossicità acuta su api</u>	LD ₅₀ orale = 5 ng/bee LD ₅₀ per contatto = 24 ng/bee

**Caratteristiche prodotti commerciali a base di Thiamethoxam utilizzati per la concia
(vengono riportati solo i prodotti bloccati dal D.M. del 17/09/08)**

Nome commerciale	CRUISER 70 WS
Numero di Reg.	11599
Data registrazione	20/02/2003
Ditta produttrice	SYNGENTA CROP PROTECTION S.P.A.
Data sospensione	20/09/2008
Utilizzo	Concia cotone, patata, mais*, barbabietola da zucchero
Composizione	Thiamethoxam 70% ; coformulanti 30%

Nome commerciale	CRUISER 350 FS
Numero di Reg.	11600
Data registrazione	20/02/2003
Ditta produttrice	SYNGENTA CROP PROTECTION S.P.A.
Data sospensione	20/09/2008
Utilizzo	Concia cotone, patata, mais*
Composizione	29,9 % Thiamethoxam,; coformulanti 70,1 %
Dosi d'impiego	Per mais _ 900ml/100 kg granella

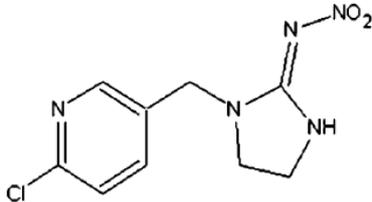
*utilizzo attualmente sospeso in Italia, con Decreto del 14 settembre 2009

Nome	Clothianidin
Formula	$C_6H_8ClN_5O_2S$
IUPAC	(E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine
Peso Molecolare	249,7 g/mol
Classe chimica	Neonicotinoide – Cloronicotinile
Attività	Insetticida
Modalità d'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 efficacemente come conciante di semi, o in formulazione granulare come geodisinfestante. Il principio viene traslocato facilmente dal terreno ai tessuti epigei della pianta, garantendo quindi la protezione non solo di radici e colletto, ma anche delle parti verdi, conferendo una protezione prolungata nel tempo.
Insetti controllati	Elateridi, afidi, cicaline, nottue, diabrotica...
<u>Caratteristiche chimico-fisiche</u>	
Pressione di vapore	1,3 x 10 ⁻¹⁰ Pa a 25°C
Solubilità	0,327 g/L in acqua a 20°C
Coeff. Ripartiz. N-ottanolo/acqua	Log K _{ow} = 0,9 a 25°C (K _{ow} = 7,94)
<u>Tossicità acuta su api</u>	LD ₅₀ orale = 3,8 ng/bee LD ₅₀ per contatto = 44 ng/bee

Caratteristiche prodotti commerciali a base di Clothianidin utilizzati per la concia (vengono riportati solo i prodotti bloccati dal D.M. del 17/09/08)	
Nome commerciale	PONCHO
Numero di Reg.	12864
Data registrazione	07/08/2006
Ditta produttrice	BAYER CROPSCIENCE S.R.L.
Data sospensione	20/09/2008
Utilizzo	concia semente mais*, colza*
Composizione	Clothianidin 47,6 % ; Coformulante 52,4 %
Dosi d'impiego	0,25 – 1,25 mg p.a. /seme di mais

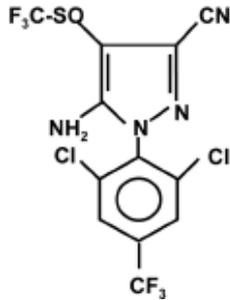
*utilizzo attualmente sospeso in Italia, con Decreto del 14 settembre 2009

Nome	Imidacloprid
Formula	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
IUPAC	1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine
	
Peso Molecolare	255,7 g/mol
Classe chimica	Neonicotinoide – Cloronicotinile
Attività	Insetticida
Modalità d'azione	<p>Agisce principalmente per ingestione sugli insetti. La molecola si fissa in modo permanente ai recettori nicotinici dell'acetilcolina, provocando movimenti scoordinati, tremori, paralisi ed infine morte dell'insetto.</p>
Modalità d'applicazione	<p>L'applicazione del prodotto risulta maggiormente efficace a livello dell'apparato radicale, dal quale viene traslocato attraverso la corrente xilematica a tutti gli organi della pianta garantendone una buona protezione. L'applicazione fogliare risulta meno efficiente nella protezione della pianta data la difficile traslocazione del prodotto attraverso i tessuti fogliari. Può essere efficacemente impiegato per la concia delle sementi.</p>
Insetti controllati	<p>Afidi, aleurodidi, cicaline, microlepidotteri, tentredini, dorifora, insetti terricoli come elateridi, blaniuli.</p>
<u>Caratteristiche chimico-fisiche</u>	
Pressione di vapore	4 x 10 ⁻¹⁰ Pa a 20°C
Solubilità	0,610 g/L in acqua a 20°C
Coeff. Ripartiz. n-ottanolo/acqua	Log K _{ow} = 0,57 a 22°C (K _{ow} = 3,72)
<u>Tossicità acuta su api</u>	<p>LD₅₀ orale = 5,4 ng/bee LD₅₀ per contatto = 6,7 ng/bee</p>

**Caratteristiche prodotti commerciali a base di Imidacloprid utilizzati per la concia
(vengono riportati solo i prodotti bloccati dal D.M. del 17/09/08)**

Nome commerciale	GAUCHO 350 FS
Numero di Reg.	8906
Data registrazione	25/07/1996
Ditta produttrice	BAYER CROPSCIENCE S.R.L.
Data sospensione	Sospeso il 20/09/2008
Utilizzo	concia del mais*
Composizione	Imidacloprid 30,4% ; coformulanti 69,6%
Dosi d'impiego	Per mais _ 1-2 L/100Kg di seme

*utilizzo attualmente sospeso in Italia, con Decreto del 14 settembre 2009

Nome	Fipronil
Formula	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$
IUPAC	5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro- <i>p</i> -tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile
	
Peso Molecolare	437,2 g/mol
Classe chimica	Azotoorganico – Fenilpirazolo
Attività	Insetticida
Modalità d'azione	È attivo soprattutto per contatto ma anche per ingestione. La molecola distrugge i recettori GABA _A dei canali del cloro nel sistema nervoso centrale, provocando un eccesso di stimolazione neuronale e conseguente morte dell'insetto.
Modalità d'applicazione	Il Fipronil viene impiegato principalmente come geodisinfestante con applicazione nel terreno, che come prodotto conciante delle sementi.
Insetti controllati	Larve di insetti terricoli come elateridi, atomaria, tipule, diabrotica, fitofagi epigei come nottue, altica, dorifora.

Caratteristiche chimico-fisiche

Pressione di vapore	$3,7 \times 10^{-7}$ Pa a 25°C
Solubilità	1,9 mg/L in acqua a 20°C (pH 5) – 2,4 mg/L (pH 9)
Coeff. Ripartiz. N-ottanolo/acqua	Log K_{ow} = 4 a 25°C (K_{ow} = 10000)
<u>Tossicità acuta su api</u>	LD ₅₀ orale = 4,2 ng/bee LD ₅₀ per contatto = 5,9 ng/bee

Caratteristiche prodotti commerciali a base di Fipronil utilizzati per la concia (vengono riportati solo i prodotti bloccati dal D.M. del 17/09/08)

Nome commerciale	REGENT 500 FS
Numero di Reg.	9745
Data registrazione	09/09/1998
Ditta produttrice	BASF ITALIA
Data sospensione	20/09/2008
Utilizzo	Concia mais* e girasole*
Composizione	Fipronil 41% , coformulanti 59%
Dosi d'impiego	Per mais _ 200 g/100Kg seme

*utilizzo attualmente sospeso in Italia, con Decreto del 14 settembre 2009

1.4 I blocchi normativi all'utilizzo dei concianti a livello italiano ed europeo

A livello italiano, il primo provvedimento preso per affrontare il problema della moria delle api, è stato il D.M. del 17 settembre 2008, che disponeva la sospensione all'autorizzazione alla vendita e d'impiego di sementi conciate con le sostanze attive insetticide Clothianidin, Thiamethoxam, Imidacloprid e Fipronil, in virtù di un possibile nesso di causa ed effetto tra l'utilizzo di sementi di mais, colza, girasole e barbabietola da zucchero conciate con tali principi, e la moria delle api.

Successivamente con il D.M. del 26 gennaio 2009, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali precisava i limiti temporali di questa sospensione, fissandoli al 20 settembre 2009.

Inoltre, in considerazione delle particolari caratteristiche di confettatura del seme della barbabietola da zucchero, nonché di quelle agronomiche, è stato emanato l'ulteriore Decreto Ministeriale 27 gennaio 2009, che revocava la sospensione dell'autorizzazione d'impiego per la concia di sementi di barbabietola da zucchero, dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive citate, da sole o in miscela con altre sostanze attive e riammetteva quindi l'impiego di sementi di barbabietola da zucchero conciate con prodotti contenenti tali principi. Infine, con il Decreto dirigenziale del 14 settembre 2009, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, ha prorogato fino al 20 settembre 2010 la sospensione d'impiego dei quattro principi attivi nella concia di sementi.

A livello europeo, la situazione dei blocchi cautelativi è eterogenea all'interno dei singoli stati.

In Francia, dopo i primi provvedimenti del '99 contro l'utilizzo del p.a. Imidacloprid per la concia dei semi di girasole, è stata sospesa nel febbraio 2004 l'autorizzazione d'utilizzo anche per sei insetticidi a base di Fipronil (uno dei quali utilizzato per la concia del mais) da parte del Ministro dell'Agricoltura, e ad oggi il divieto d'impiego di prodotti concianti a base di Imidacloprid risulta esteso anche per mais e colza. Nel 2008 è stata concessa invece l'autorizzazione d'impiego per un anno, di prodotti concianti a base di Thiamethoxam utilizzati per mais, comunque sotto osservazione scientifica.

In Germania, dopo le intense morie registrate in particolare nella regione sud del paese durante la primavera 2008, frequentemente concomitanti con semine di mais conciato con il principio attivo Clothianidin, il Governo nazionale di concerto con il competente organismo federale (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, BVL) aveva inizialmente bloccato l'utilizzo di alcune sostanze attive insetticide (fra le quali anche diversi

neonicotinoidi) per la concia di diverse sementi, ripristinandone in seguito la possibilità d'utilizzo solo per le sementi di colza.

Anche in Slovenia, come in Germania, all'iniziale sospensione d'utilizzo per i neonicotinoidi Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam, per la concia di tutte le tipologie di sementi, è seguito il ripristino d'utilizzo di tali p.a. solo per sementi di colza.

1.5 La guttazione fogliare

Negli stadi giovanili di alcune specie di piante terrestri si osserva un particolare fenomeno di fuoriuscita di acqua, localizzato soprattutto alle estremità fogliari, chiamato "guttazione". Tale processo fisiologico, da non confondere con la normale traspirazione fogliare, permette ad una quota d'acqua di uscire attraverso specifici fori posizionati lungo i lembi fogliari, chiamati idatodi.

La guttazione prende luogo quando l'elevata pressione radicale dell'acqua non riesce ad essere controbilanciata totalmente dalla traspirazione fogliare, così una frazione dell'acqua viene dirottata all'esterno attraverso gli idatodi. Tale situazione si verifica quindi in piante con elevate disponibilità d'acqua nel terreno, ed in situazioni di chiusura degli stomi fogliari con limitata traspirazione. Per questo le guttazioni si formano soprattutto durante la tarda notte, quando gli stomi sono prevalentemente chiusi per la ridotta attività metabolica, ed il livello d'umidità atmosferica risulta più elevato. Le guttazioni sono quindi ben visibili sulle foglie il mattino successivo.

La produzione di acqua di guttazione da parte delle piante di mais è un fenomeno che si verifica limitatamente alle prime tre settimane di vita di queste. La produzione da ogni singola pianta si attesta su volumi di 0,1 – 0,3 millilitri al giorno nei periodi di forte produzione iniziali, diminuendo a volumi inferiori agli 0,1 ml durante gli ultimi giorni di produzione. Nel presente studio questa caratteristica ha costituito un limite non indifferente nell'analisi di tali campioni, effettuata sempre su serie di più piante coltivate nelle stesse condizioni, e che potessero fornire volumi di acqua rappresentativi per l'analisi.

In campo, l'acqua di guttazione fogliare può fornire comunque volumi d'acqua non indifferenti, soprattutto se addizionata ad eventuale rugiada. Durante stagioni primaverili – estive secche, l'acqua di guttazione proveniente da piante di mais può costituire una fonte sicura d'acqua per insetti che ne richiedano elevate quantità per il loro metabolismo, come le

api. Ciò è maggiormente verificabile in ambienti caratterizzati da monoculture di mais diffuse.

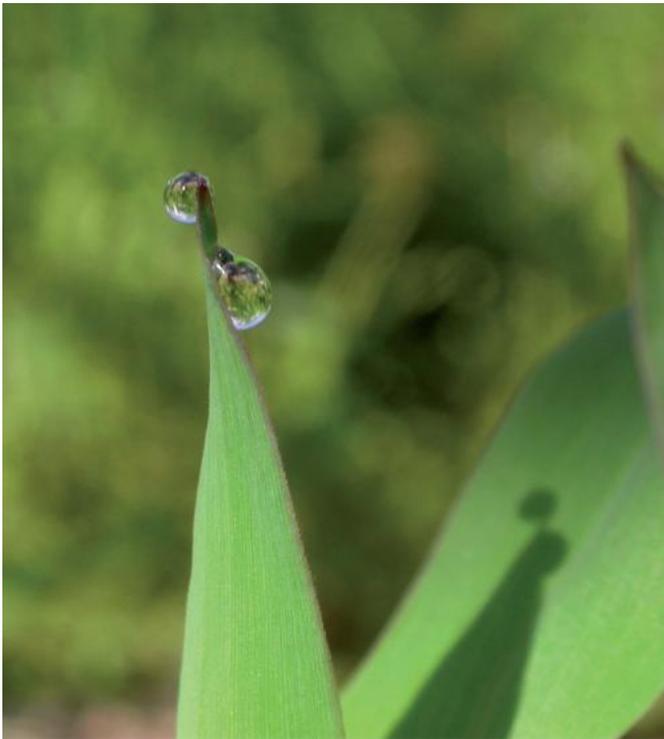


Fig. 1.1 Particolare di gocce di guttazione sull'estremità di una foglia di mais

L'utilizzo diretto di acqua di guttazione fogliare da parte di api, già confermato in letteratura (Shawki et al. 2005), non è stato invece mai osservato durante le sperimentazioni prese luogo nell'ultimo anno. Questo può essere senza dubbio correlato all'elevata disponibilità d'acqua a disposizione per le api nei pressi dei campi in cui avvenivano le sperimentazioni, grazie soprattutto alle abbondanti e diffuse precipitazioni che hanno caratterizzato l'anno. In futuro si renderanno quindi necessari ulteriori studi di campo per la verifica del fenomeno.

1.6 Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi è mirato allo studio di alcune delle possibili cause di CCD, ovvero delle intense morie di api verificatisi negli ultimi anni a livello internazionale, sulla base delle ipotesi formulate all'interno della collaborazione fra il Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova ed il Dipartimento di Scienze Chimiche della stessa Università.

Il lavoro, che è stato sviluppato all'interno dei laboratori di entrambe le strutture coinvolte, si colloca anche nell'ambito di un progetto di ricerca nazionale denominato "APENET", coordinato dal Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-API) e che vede come partecipanti una serie di Università italiane, diversi Dipartimenti di Ricerca del CRA, servizi fitosanitari e veterinari regionali e ulteriori istituti di ricerca.

In particolare, questo lavoro mira ad analizzare dal punto di vista quantitativo le possibili vie di contaminazione ambientale e il conseguente avvelenamento di api, associati all'utilizzo di specifici principi attivi insetticidi impiegati come concianti delle sementi di mais.

Le molecole imputate di tali avvelenamenti sono quattro, tre facenti parte della famiglia dei neonicotinoidi (Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid) e una della famiglia dei fenilpirazoli (Fipronil).

La contaminazione dell'ambiente sia mediante le guttazioni che attraverso l'emissione del particolato di semina, è stata studiata attuando il campionamento e l'analisi di varie matrici ambientali: campioni vegetali come le sementi di mais e le relative gocce di guttazione, il campionamento e analisi di polveri aerodisperse (PM – particulate matter) generate durante l'attività di semina, campioni di api morte in seguito a tali eventi.

I risultati ottenuti forniscono un quadro significativo sui livelli di tali molecole insetticide riscontrati nei vari comparti ambientali, e rappresentano utili elementi di discussione nell'analisi delle cause che hanno provocato le intense morie di api registrate in questi anni.

2 MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

Campionatori di PM Zambelli con diverse teste di prelievo

I campionatori di particolato Zambelli sono sistemi di campionamento modulari costituiti essenzialmente da una testa di prelievo del particolato (preselettore), di diverse forme e dimensioni, e da una pompa in grado di creare un flusso d'aspirazione dell'aria costante attraverso la testa di campionamento. Il materiale aerodisperso, dopo l'eventuale selezione dimensionale effettuata dal preselettore, viene raccolto su di un filtro di diverso materiale (policarbonato, estere misto di cellulosa, fibra di vetro). Nel presente lavoro si è operato per la raccolta del materiale particolato totale (PTS), quindi in assenza di preselettore dimensionale, e per il campionamento del PM₁₀ impiegando il preselettore certificato (certificazione EN 12341). Le pompe utilizzate, dotate di contatore volumetrico, hanno la capacità di mantenere flussi d'aspirazione costanti: flusso di 15-25 L/min (campionatori Zambelli ZB1-timer) per PTS, flusso di 38,3 L/min (campionatore Zambelli Explorer Plus) impiegato per il campionamento del PM₁₀.

Campionatori personali di PM

I campionatori di particolato personali sono sistemi portatili utilizzati sovente nel campionamento del materiale aerodisperso nell'ambiente esterno o negli ambienti di lavoro. Tali strumenti sfruttano una pompa SKC in grado di mantenere un flusso costante d'aspirazione di 2,8 L/min. I campionatori sono stati impiegati per le sole misure di PTS, montando portafiltri di diverso tipo, di plastica e di metallo. I filtri utilizzati su queste pompe sono di policarbonato o di estere misto di cellulosa.

Contatore ottico di particelle (OPC) Grimm, modello 1.108

L'OPC portatile per il monitoraggio delle polveri utilizzato durante i campionamenti, è un contatore ottico di particelle ad elevata velocità che consente inoltre la raccolta del particolato campionato su di un filtro in teflon rimovibile. Lo strumento è in grado di rilevare il numero di particelle campionate e la loro classe dimensionale, attraverso il principio del "laser scattering", fornendo come risultato il numero di particelle di una data classe dimensionale

presenti in un certo volume d'aria. Lo strumento invia i dati elaborati ad un computer, utilizzando il software predisposto.

Filtri per il campionamento del particolato

Filtri in fibra di vetro Whatman GF/C, diametro 47 mm, porosità 1,2 µm

Filtri in estere misto di cellulosa SKC, diametro 25 mm, porosità 0,8 µm

Filtri in policarbonato SKC, diametro 25 mm, porosità 0,8 µm

Filtri per la raccolta delle deposizioni secche a terra

Filtri in cellulosa Schleicher et Schull - mod. Selecta, diametro 18,5 cm

Cabina per il condizionamento dei filtri

QBOX³ Momo Line, impostata ad umidità relativa 50% ± 5% e temperatura 20 ± 1 °C

Anemometro (modello Darcy) con registratore dati Solomat MPM 4000

Tale strumentazione è stata utilizzata per la misura del flusso d'aria in uscita dalla ventola della seminatrice, che permette il caricamento e la distribuzione dei semi.

Sistema cromatografico HPLC (High Performance Liquid chromatography) Dionex

- Sistema di pompaggio P680 HPLC
- Forno termostato per colonne TCC 100
- Rivelatore diode - array PDA 100
- software di gestione "Chromelyon"

Condizioni cromatografiche utilizzate:

	vers. 1	vers. 2
Colonna	Alltech Alltima C18 5µm (4,6×250mm)	Alltech Adsorbosphere C18 5µm (4,6×250mm)
Miscela eluente	acetonitrile – acqua	metanolo-acqua
Flusso	1,2 ml/min	1,2 ml/min
Temperatura colonna	20 °C	45 °C
Gradiente di eluizione	0-4 min 70/30% H ₂ O/CH ₃ CN 4-9 min gradiente al 100% CH ₃ CN 9-13 min 100% CH ₃ CN 13-15 min da CH ₃ CN 100% a 30% 15 min 70/30% H ₂ O/CH ₃ CN	0-4,5 min 70/30% H ₂ O/MeOH 4,5-9 min gradiente al 100% MeOH 9-12 min 100% MeOH 12-14 min da MeOH 100% a 30% 14 min 70/30% H ₂ O/MeOH

Sistema cromatografico UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) XR - Prominence

Shimadzu

- Sistema di pompaggio LC-20AD XR
- Degasatore DGU-20A3
- Iniettore automatico SIL-20AC XR
- Forno termostato per colonne CTO-20A
- Rivelatore diodi – array SPD- M20A
- Modulo gestione CBM-20A
- Software di gestione “LC Solution”

Condizioni cromatografiche utilizzate:

	vers. 1	vers. 2
Colonna	Phenomenex Luna C18(2) (2,5 μ m, 2x100 mm)	Shimadzu XR-ODS II (2,2 μ m, 2 x100 mm)
Precolonna	Phenomenex Security Guard	Phenomenex Security Guard
Miscela eluente	acetonitrile – acqua	acetonitrile – acqua
Flusso	0,4 ml/min	0,4 ml/min
Temperatura colonna	45 °C	45 °C
Gradiente di eluizione	0–0,5 min 70/30% H ₂ O/CH ₃ CN 0,5–2,0min gradiente al 100% CH ₃ CN 2,0–3,5 min 100% CH ₃ CN 3,5–4,0 min da CH ₃ CN 100% a 30% 4,0–5,0 min 70/30% H ₂ O/CH ₃ CN	0–0,5 min 70/30% H ₂ O/CH ₃ CN 0,5–1,5min gradiente al 100% CH ₃ CN 1,5–3 min 100% CH ₃ CN 3–3,5 min da CH ₃ CN 100% a 30% 3,5–5 min 70/30% H ₂ O/CH ₃ CN

Attrezzatura di laboratorio

Bilancia analitica Ohaus AP250D con limite di sensibilità di 0,01 mg

Sonicator, Transsonic Digital Elma

Forno termostato Binder

Apparecchiatura per estrazione solventi – Rotovapor Heidolph

Centrifuga

Micropipette tarate Gilson , con puntali monouso

Vetreteria di laboratorio: matracci tarati, pipette tarate, beute, becker, palloni

Siringhe in vetro per cromatografia

Filtri per siringa Millex (diametro pori 0,45 μ m)

Vetrini d'orologio

Imbuti di vetro

Bisturi

Pinze

Spatoline in metallo

Provette da 10ml in polipropilene con tappi

Reagenti impiegati

-Acqua MilliQ, prodotta con apparecchiatura Millipore MilliQ

-Metanolo (VWR), di elevata purezza per uso cromatografico

-Acetonitrile (Riedel de Haen), di elevata purezza per uso cromatografico

Principi attivi insetticidi

Tutti i p.a. insetticidi utilizzati sono commercializzati da Sigma-Aldrich, come standard concentrati in polvere

-Fipronil (97,6%)

-Thiamethoxam (99,7%)

-Clothianidin (99,9%)

-Imidacloprid (99,9%)

Sementi utilizzate

Tutte le sementi utilizzate nei diversi esperimenti sono sementi di tipo “Hi-Bred” conciate e distribuite da “Pioneer Italia”. Le sementi con nuova confettatura sono state fornite dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali al Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell’Università di Padova, per esclusivo uso sperimentale.

Le sementi utilizzate sono:

- sementi conciate con Cruiser 350 FS (prodotto da Syngenta), principio attivo di concia Thiamethoxam, in dose di 1 mg/seme;
- sementi conciate con Poncho (prodotto da Bayer Cropscience), principio attivo di concia Clothianidin, in dose di 1,25 mg/seme;
- sementi conciate con Gaucho 350 FS (prodotto da Bayer Cropscience), principio attivo di concia Imidacloprid, in dose di 0,5 mg/seme;
- sementi conciate con Regent 500 FS (prodotto da BASF Italia), principio attivo di concia Fipronil, in dose di 0,75 mg/seme.

Ogni tipo di semente utilizzata contiene inoltre all’interno della concia una miscela fungicida (denominata Celest XL) costituita dai principi attivi Fludioxonil e Metalaxyl.

Dopo la crescita dell’attenzione pubblica e del mondo agricolo sulla “*questione neonicotinoidi*”, per limitare i fenomeni di dispersione di polveri insetticide durante le attività di semina di mais conciato, le case produttrici hanno sviluppato nuove formulazioni di concianti, con un’aumentata percentuale di adesivanti nella soluzione di confettatura. Sono state quindi utilizzate per le diverse sperimentazioni anche le varianti di semente con nuova confettatura, che mantiene inalterata la dose nominale di p.a. per seme.

Sono poi state distribuite da Pioneer a scopo di sperimentazione due ulteriori varianti di sementi, mantenenti la vecchia confettatura:

- semente concia con Poncho (prodotto da Bayer Cropscience), principio attivo di concia Clothianidin, in dose di 0,5 mg/seme;
- semente concia con Gaucho 350 FS (prodotto da Bayer Cropscience), principio attivo di concia Imidacloprid, in dose 1,25 mg/seme.

Inoltre sono state utilizzate in alcuni esperimenti sementi di mais conciate con la sola miscela fungicida (Celest XL).

Infine, in molte prove sono stati utilizzati semi di mais impiegati in agricoltura biologica, non contenenti quindi alcun fitofarmaco, utilizzati come testimone.

2.2 Procedure Sperimentali

2.2.1 Preparazione di soluzioni standard ad elevata concentrazione dei diversi principi attivi

Per la preparazione di soluzioni madre dei diversi p.a. viene sciolta una quantità nota di principio, in formulazione solida con elevato grado di purezza (>99,7%, solo per Fipronil la purezza è del 97,6%). Il composto, in polvere, viene pesato su vetrino d'orologio o film d'alluminio, utilizzando bilance con sensibilità minima di 0,01 mg. Viene quindi trasferito quantitativamente in matraccio da 100 ml portando a volume con metanolo puro. Il matraccio viene chiuso con tappo ed esternamente con Parafilm. La soluzione viene conservata in frigorifero a 4°C.

2.2.2 Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione strumentale

Per la preparazione di soluzioni standard a bassa concentrazione dei diversi p.a. si effettuano opportune diluizioni della soluzione madre. Una determinata aliquota di questa viene trasferita in un matraccio da 10 ml attraverso l'utilizzo di micropipette tarate dotate di puntale monouso. Si porta infine a volume con metanolo puro, chiudendo bene il matraccio con tappo ed esternamente con carta Parafilm. La soluzione viene conservata in frigorifero. Nel presente lavoro, per le normali determinazioni quantitative di p.a. insetticidi mediante HPLC sono state impiegate soluzioni standard a 1-5-10 mg/L. La metodica ottimizzata per la strumentazione UFLC Shimadzu prevedeva invece la preparazione di soluzioni standard a concentrazione 0,5-1-5 mg/L in miscela acqua-metanolo (50:50 – 90:10).

Soluzioni standard molto diluite (0,05 – 0,40 mg/L) sono invece state preparate per la calibrazione strumentale finalizzata alla determinazione del LOD.

2.2.3 Analisi del contenuto di p.a. in diverse matrici ambientali mediante HPLC

Varie procedure sono state ottimizzate sia al fine di minimizzare i tempi di analisi sia per limitare l'utilizzo dell'acetonitrile, solvente che ha subito un repentino ed esagerato aumento di prezzo nei primi mesi del 2009.

Metodica ottimizzata per la strumentazione HPLC Dionex

La ricerca dei quattro p.a. in studio in campioni di diverse matrici è stata inizialmente effettuata attraverso un cromatografo liquido convenzionale (HPLC) dotato di rivelatore UV-DAD (Diode Array Detector).

La determinazione quantitativa dei p.a. nei campioni sfrutta il metodo della retta di taratura (calibrazione esterna), effettuando quindi preventivamente una serie di misure su soluzioni standard a concentrazione nota preparate in metanolo.

I campioni iniettati in colonna devono essere allo stato liquido e non presentare frazione solida sospesa; per evitare questo l'iniezione in colonna di campioni viene effettuata con siringa da cromatografia dotata di filtro Millipore (porosità 0,45 µm).

Per le analisi effettuate con il sistema cromatografico Dionex sono state sfruttate principalmente le condizioni di eluizione della "versione 1" riportata a pagina 16, caratterizzata da una maggior capacità di separazione dei picchi e da limiti di determinabilità più bassi rispetto la "versione 2".

L'identificazione dei diversi principi viene effettuata sfruttando il rivelatore DAD, impostato per registrare lo spettro delle sostanze eluite fra i 200 ed i 300 nm, corrispondente alla finestra utile per riconoscere i p.a. in questione. Vengono impostati tre canali d'acquisizione del segnale strumentale a lunghezze d'onda diverse, corrispondenti circa alle λ massime d'assorbimento di ogni principio attivo.

I tempi di ritenzione tipici, le λ_{\max} d'assorbimento sfruttate per le diverse molecole, e gli LOD (limit of detection) raggiunti, per la "versione 1" del metodo impiegante il sistema cromatografico Dionex, sono riportate nella tabella qui sotto, unitamente ad un cromatogramma esemplificativo:

molecola	λ_{\max} d'assorbimento (nm)	Tempo di ritenzione (min)	LOD (mg/L)
Thiamethoxam	252	4,2	0,11
Clothianidin	269	5,3	0,13
Imidacloprid	269	6,0	0,11
Fipronil	215	11,0	0,27

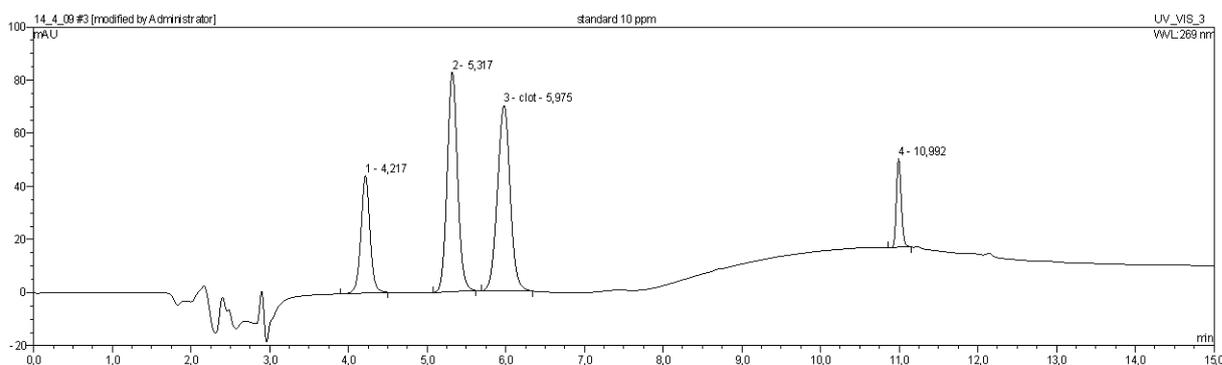


Fig. 2.1 Cromatogramma relativo all'analisi di uno standard a 10 mg/L dei 4 principi attivi, con metodica "HPLC 1", canale d'acquisizione a $\lambda=269$ nm.

Metodica ottimizzata per la strumentazione UFLC Shimadzu

Il sistema cromatografico Shimadzu opera a maggiori pressioni rispetto ai tradizionali HPLC e può utilizzare quindi colonne ad altissima efficienza per ottenere risoluzioni elevate in tempi brevi. Anche in questa procedura, l'analisi quantitativa si basa sul metodo della retta di taratura. Il sistema cromatografico, dotato di autocampionatore, prevede che i campioni siano precedentemente caricati in vials di vetro, che saranno poi collocati in posizioni ben definite. Il campione deve essere in soluzione liquida e non deve presentare frazioni solide in soluzione, per non correre il rischio che tali frazioni siano iniettate in colonna. Inoltre per ottenere una risposta strumentale ottimale, gli standard vanno preparati in miscela metanolo-acqua (con rapporti percentuali che vanno dal 50:50 al 10:90 in volume). Tale accortezza deve essere presa anche nell'analisi dei campioni, che possono essere diluiti al fine di ottenere tali rapporti di concentrazione.

Anche per l'UFLC sono state sviluppate due diverse metodiche d'analisi quantitativa impiegando condizioni cromatografiche diverse in base al tipo di colonna utilizzata. Per queste 2 metodiche sono rimasti invariati i 3 canali d'acquisizione a cui si registra il cromatogramma, ma risultano differenziati i tempi di ritenzione per le diverse molecole, e gli LOD raggiunti. Tali dati, per le "versioni 1 e 2" del sistema cromatografico Shimadzu, sono riportati nella seguente tabella, unitamente ad un cromatogramma esemplificativo:

Molecola	Versione 1			Versione 2	
	Canale acquisizione (nm)	Tempo ritenz. (min)	LOD (mg/L)	Tempo ritenz. (min)	LOD (mg/L)
Thiamethoxam	252	1,19	0,014	1,03	0,014
Clothianidin	269	1,50	0,017	1,29	0,010
Imidacloprid	269	1,67	0,011	1,45	0,007
Fipronil	215	2,74	0,022	2,96	0,027

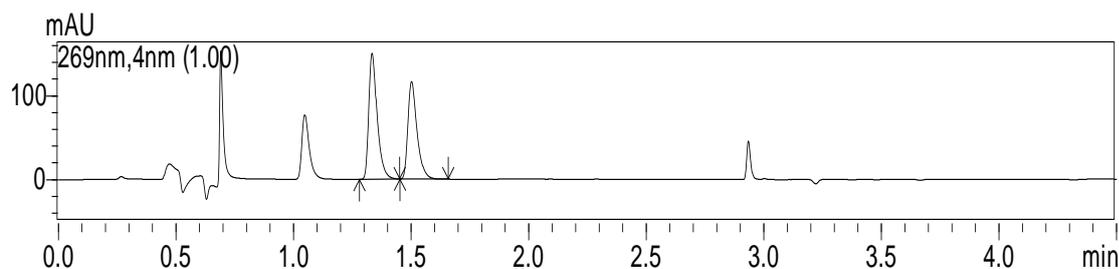


Fig. 2.2 Cromatogramma relativo all'analisi di uno standard a 5 mg/L dei 4 principi attivi, con metodica "UFLC 2", canale d'acquisizione a $\lambda=269$ nm

2.2.4 Campionamento del PM durante la semina di mais conciato

Per il campionamento delle polveri aerodisperse generate durante l'attività di semina di mais conciato con p.a. insetticidi, sono stati effettuati tre esperimenti di semina in due parcelle di terreno site a Legnaro, di proprietà una di Veneto Agricoltura e l'altra dell' Azienda Agraria Sperimentale L.Toniolo dell'Università di Padova, aventi estensione rispettivamente 1,3 ettari circa e 0,3 ettari circa. Questi esperimenti hanno avuto luogo nei giorni 14 e 26 maggio 2009, e il 15 ottobre 2009, caratterizzati da cielo sereno e condizioni di vento piuttosto limitato.

Le prime due semine sono state effettuate utilizzando mais conciato "Poncho" distribuito da Pioneer Italia (p.a. di concia Clothianidin – 1,25 mg/seme), seminato con le normali condizioni agronomiche tramite una seminatrice pneumatica "Monosem NG PLUS". Le condizioni di semina adottate sono state di 20 cm distanza interseme e di 75 cm come distanza interfila, per una densità di semina approssimativa di 66.700 semi/ha. La velocità di semina del trattore si aggirava intorno ai 6-7 Km/h.

Nella semina del 15 ottobre invece è stato seminato del mais conciato "Gaucho" distribuito da Pioneer Italia (p.a. di concia Imidacloprid – 0,5 mg/seme), seminato con la stessa seminatrice descritta sopra, con condizioni di semina di 22 cm distanza interseme e di 75 cm distanza interfila, per una densità di semina totale di 60.600 semi/ha. In questa semina la velocità di avanzamento del trattore è stata ridotta rispetto le semine precedenti.

L'emissione di polveri generate dalla seminatrice in azione è stata monitorata in diversi modi:

1) misura delle quantità di polveri emesse dal condotto d'uscita dell'aria utilizzata dal meccanismo di distribuzione del seme nella seminatrice, attraverso due campionatori di particolato totale (PTS) portatili SKC equipaggiati con portafiltri di campionamento metallici durante la 1° semina, e con un'ulteriore campionatore Zambelli ZB-1 durante la 2°. I campionatori sono stati posizionati tutti sopra la seminatrice.

Durante il primo esperimento le teste di campionamento sono state fissate direttamente alla bocca d'uscita dell'aria dalla seminatrice. Nel secondo esperimento invece l'aria in uscita dalla seminatrice veniva convogliata verso le teste di prelievo dei campionatori attraverso un tubo di plastica (diametro interno 19 cm) mantenuto in posizione diritta e orizzontale, per evitare fenomeni di accumulo delle polveri lungo il tubo. Le teste di campionamento erano posizionate ad una distanza di circa 1 metro rispetto la bocca d'uscita dell'aria, in posizione centrale rispetto il diametro del tubo, rivolte verso il flusso d'aria.

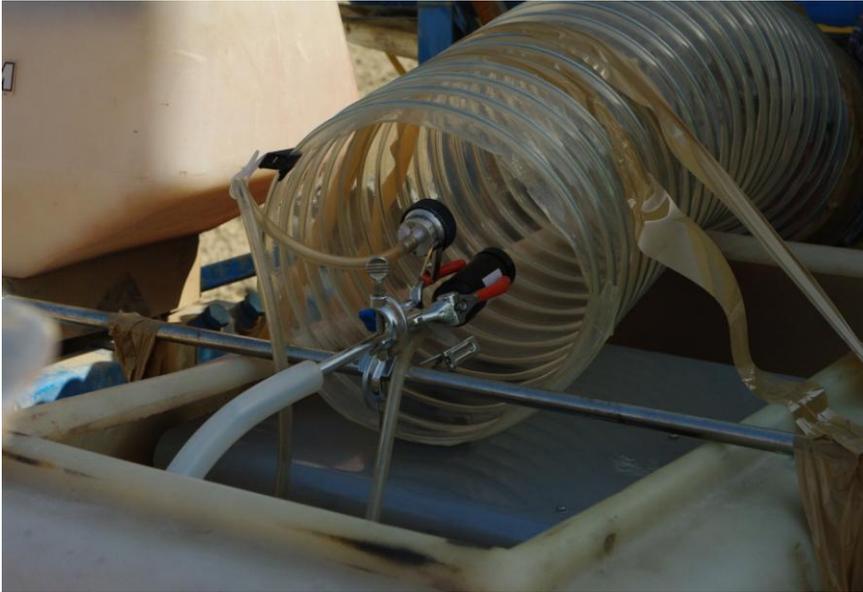


Fig. 2.3 Disposizione delle teste di campionamento del PM, durante la prova del 26/05/09

I tempi di campionamento sono stati di una decina di minuti circa, tranne per la prima prova effettuata durante il primo giorno, caratterizzata da un tempo di campionamento di 30'.

Sono state effettuate più riprove per ogni semina, utilizzando filtri in policarbonato, fibra di vetro, estere misto di cellulosa.

Nella seconda giornata di campionamento è stata effettuata una prova iniziale di misura delle emissioni di polveri dalla seminatrice in assenza di semi (misura del bianco).

I filtri utilizzati durante le varie prove venivano subito prelevati con pinze metalliche e richiusi nella propria scatola di plastica, in vista del successivo trattamento per le analisi.

2) misura delle polveri aerodisperse a bordo del campo di semina, e a 10 m di distanza da questo. Nelle prime due giornate di campionamento sono stati disposti lungo il bordo del campo sottovento due campionatori fissi Zambelli ZB-1 montanti teste di campionamento per PTS con filtri di diverso tipo (policarbonato, fibra di vetro), e a 10 m dal bordo campo un campionatore fisso Zambelli ZB-1 con testa di campionamento per le PTS e filtri di diverso tipo, ed il sistema di campionamento Explorer Plus Zambelli con testa di campionamento per la raccolta del PM10 su filtri in fibra di vetro.

I campionamenti con tali strumenti sono avvenuti in contemporanea alle misure effettuate con i campionatori montati sulla seminatrice, ed hanno avuto una durata di 34 e 40 minuti (vecchia e nuova confettatura rispettivamente) durante la prima giornata, e di 1 ora e 6 minuti nella seconda.

Nella giornata di semina del 15 ottobre invece il campionamento del PM è avvenuto tramite 3 campionatori fissi disposti in linea lungo il bordo sottovento del campo seminato. I due

campionatori Zambelli ZB-1 Timer montavano teste per il campionamento delle PTS e filtri in fibra di vetro e policarbonato, mentre il sistema di campionamento Explorer Plus Zambelli era equipaggiato con testa di campionamento per la raccolta del PM10 e filtro in fibra di vetro. Il campionamento di PM in questa giornata ha avuto una durata di 45 minuti.

I filtri utilizzati nelle varie prove venivano infine prelevati con pinze metalliche e richiusi nella propria scatola di plastica. Tali filtri venivano poi conservati in frigorifero a 4°C, in vista della successiva analisi.

3) misura delle polveri ricadute al suolo, effettuata solo durante la semina del 14 maggio 09. Sono stati disposti lungo il bordo sottovento del campo di semina una serie di 6 filtri di cellulosa (diametro 18,5 cm) per ognuna delle due tipologie di mais seminato (conciato "Poncho", vecchia e nuova confettatura). I filtri, adagiati su sottovasi in plastica distanziati fra loro di 2-3 metri circa, sono stati lasciati aperti per il periodo di semina coincidente alle misure di campionamento di PM in aria (vecchia confettatura 34 minuti, nuova confettatura 40 minuti), avendo l'accortezza di bagnarli con acqua milli-Q periodicamente, per evitare movimenti bruschi del filtro e delle polveri adagate su questo. I sottovasi sono stati poi ricoperti alla fine della prova con pellicola in alluminio e conservati a T° ambiente per la successiva analisi all'HPLC dei filtri.

2.2.5 Determinazione della distribuzione dimensionale e della concentrazione di particelle emesse durante il funzionamento di una macchina seminatrice

Per la misura della concentrazione in aria di particelle generate da una seminatrice in funzione con mais conciato, e per la determinazione delle classi dimensionali delle particelle emesse, si è provveduto a disporre una normale seminatrice pneumatica in campo, la cui ventola d'aspirazione era messa in movimento dal giunto cardanico di un trattore, mentre il movimento delle ruote della seminatrice, rialzata da terra, e il correlato meccanismo di distribuzione del seme erano controllati attraverso il giunto cardanico di un secondo trattore (Figura 2.4). Si è potuto così simulare un evento di normale semina in campo mantenendo ferma la macchina seminatrice ed annullando quindi la formazione di polveri dal terreno.

La misura del numero di particelle presenti per unità di volume d'aria durante la semina, distinte per classe dimensionale, è stata effettuata tramite un contatore ottico OPC – Grimm, durante una prova effettuata il 14 luglio 2009, nel terreno adiacente la serra entomologica del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali. Durante tale prova la

seminatrice è stata caricata con semente conciaata “Poncho” (p.a. Clothianidin in dose di 1,25 mg/seme) nuova confettatura.



Fig. 2.4 Particolare della disposizione dei trattori durante i campionamenti effettuati con la seminatrice in funzione, ma ferma sul posto

Lo strumento utilizzato può dividere le particelle rilevate fino ad un massimo di 15 intervalli (classi dimensionali), tra gli 0,3 e i 30 μm . Tramite una preventiva misura del numero di particelle presenti in aria con la seminatrice in funzione senza semi, è stato possibile determinare l'effettivo numero di particelle emesse in aria dalla semina di mais conciato, distinte per classe dimensionale. Tali rilevamenti sono stati compiuti sia in prossimità dello scarico dell'aria della seminatrice, sia a 5 metri da questo.

In data 15 ottobre 2009 è stata effettuata una seconda prova di campionamento del PM emesso dalla seminatrice in funzione nelle condizioni descritte sopra. Il campionamento è avvenuto tramite la disposizione di 3 campionatori fissi in linea a 5 metri di distanza dalla seminatrice, posizionati in direzione dello scarico dell'aria di questa. I campionatori utilizzati sono 2 due campionatori Zambelli ZB-1 Timer montanti teste per il campionamento delle PTS e filtri in fibra di vetro e policarbonato, ed il sistema di campionamento Explorer Plus Zambelli equipaggiato con testa di campionamento per la raccolta del PM10 e filtro in fibra di vetro. Il campionamento di PM in questa giornata ha avuto una durata di 45'.

Il mais caricato nella seminatrice durante tale prova era conciato con “Gaucho” distribuito da Pioneer Italia (p.a. di concia Imidacloprid – 0,5 mg/seme).

2.2.6 Estrazione di p.a. insetticidi presenti in semi di mais conciato

Per la determinazione del contenuto di p.a. insetticidi all'interno di un seme di mais conciato è necessario estrarre i principi dalla pellicola conciante il seme attraverso un opportuno solvente ed analizzare poi mediante cromatografia liquida la soluzione estratta.

L'estrazione viene effettuata inserendo un seme in una provetta di polipropilene ed aggiungendo a questa 10 ml di metanolo puro. La provetta chiusa con tappo viene inserita in bagno ad ultrasuoni per 30', ciò permette un'efficace estrazione dei principi di concia all'interno del solvente organico. L'estratto può essere eventualmente conservato in frigorifero per una successiva analisi all'HPLC. Se l'analisi viene effettuata invece con UFLC, all'estrazione del campione con metanolo e successivo bagno in ultrasuoni segue una diluizione della soluzione al 50% con acqua ed un successivo trattamento in ultrasuoni per altri 30 minuti.

2.2.7 Estrazione di p.a. insetticidi da polveri aerodisperse raccolte su filtri per il campionamento del particolato atmosferico

Il contenuto di p.a. in ogni filtro viene determinato trasferendo questo dalla relativa scatola portafiltro, tramite pinzette metalliche, in una provetta di polipropilene. A questa viene aggiunto un volume di metanolo puro variabile dai 2,5 ai 10 ml, in funzione della possibile concentrazione di p.a nel campione. La provetta chiusa con il relativo tappo viene inserita in bagno ad ultrasuoni per 30'. Se si assiste ad una parziale disgregazione del filtro nel solvente (situazione verificabile soprattutto per filtri in estere misto di cellulosa) si può procedere ad una successiva centrifugazione dell'estratto (2500-3000 rpm per 7-8 minuti). L'estratto può essere eventualmente conservato in frigorifero per una successiva analisi all'HPLC. Se l'analisi viene effettuata invece con UFLC, all'estrazione del campione con metanolo in bagno ad ultrasuoni segue una diluizione della soluzione al 50% con acqua ed un successivo trattamento in ultrasuoni per altri 30 minuti.

2.2.8 Estrazione di p.a. insetticidi da polveri grossolane emesse durante l'attività di semina e ricadute al suolo

L'estrazione dei p.a. presenti sui filtri di cellulosa utilizzati per la misura delle polveri ricadute al suolo comporta una serie di lavaggi ed estrazioni sequenziali con metanolo puro. Il filtro conservato a T° ambiente all'interno del sottovaso di plastica, coperto con pellicola in alluminio, viene per prima cosa inserito in una beuta di vetro. Viene lavato il sottovaso di plastica che conteneva il filtro con un volume di metanolo di circa 60 – 70 ml e tale soluzione

viene versata all'interno della stessa beuta contenente il filtro. La beuta viene posta in bagno ad ultrasuoni per un tempo di 10-15 minuti. L'estratto viene versato in un pallone (capacità 500ml), avendo cura di far rimanere il filtro nella beuta. Questo viene estratto con la stessa quantità di metanolo per due ulteriori passaggi, come appena descritto. Ciò assicura che tutta la frazione di p.a. presente sul filtro venga estratta nel solvente. Si ottiene quindi un volume di circa 200 ml di estratto in metanolo all'interno del pallone, che viene successivamente concentrato utilizzando un evaporatore rotante per solventi, al fine di ottenere un campione con ridotto volume e concentrazioni di p.a. più elevate (tale operazione è resa possibile dalla bassa pressione di vapore che caratterizza le molecole degli insetticidi in studio). Particolare attenzione va posta nel lavaggio di sottovaso e beuta, e nelle operazioni di travaso, al fine di trasferire quantitativamente la soluzione tra recipienti. L'evaporatore sfrutta una depressione di circa 600 MilliBar ed una temperatura del bagno termostato in cui è immerso il pallone di 45°C. L'estratto finale, portato ad un volume di circa 2-3 ml all'interno del pallone, viene poi trasferito quantitativamente in un matraccio da 5 ml, portando a volume con metanolo puro. L'estratto può essere eventualmente conservato in frigorifero per una successiva analisi all'HPLC.

2.2.9 Estrazione di p.a. insetticidi presenti sulla superficie corporea delle api

Per estrarre gli eventuali p.a. insetticidi depositati sulla superficie corporea di un campione d'api, un numero minimo di queste (4-7 api morte a seguito dell'esposizione in campo), viene inserito in una provetta di polipropilene, a cui viene aggiunto un volume di 1-2 ml di metanolo puro, tanto da assicurare che le api siano completamente sommerse. La provetta chiusa con tappo, viene inserita in bagno ad ultrasuoni per 15'. La soluzione ottenuta viene trasferita quantitativamente in un'altra provetta, che può essere conservata in frigorifero per una successiva analisi all'HPLC Dionex. Se l'analisi viene effettuata invece con UFLC, l'estrazione del campione viene effettuata con una miscela di metanolo e acqua (50:50, volume totale 2 ml) e successivo bagno in ultrasuoni per 15 minuti.

2.2.10 Estrazione di p.a. insetticidi presenti all'interno del corpo delle api

Per la valutazione della frazione di p.a. penetrata all'interno del corpo di un campione d'api, si procede preventivamente al lavaggio esterno di queste, con la procedura descritta sopra. Successivamente il campione di 6-7 api contenute nella provetta di polipropilene a cui è stato tolto il metanolo, viene messo in stufa termostata alla temperatura di 100°C per 2 ore circa, fino alla completa essiccazione del campione. Poi il campione viene sminuzzato e pestato con

pestello in acciaio all'interno della provetta. Vengono aggiunti 2 ml di metanolo puro per portare in soluzione il campione, che viene posto poi in bagno ad ultrasuoni per 25' al fine di una completa estrazione dei p.a. eventualmente presenti.

L'estratto prima di essere analizzato viene centrifugato a circa 2500 rpm per 7-8 minuti, per consentire la sedimentazione delle frazioni solide nella provetta. Il campione può essere eventualmente conservato in frigorifero per una successiva analisi all'HPLC. Se l'analisi viene effettuata invece con UFLC, all'estrazione del campione con metanolo e successivo bagno in ultrasuoni segue una diluizione della soluzione al 50% con acqua ed un successivo trattamento in ultrasuoni per altri 15 minuti.

2.2.11 Determinazione della solubilità di un principio attivo in acqua

Per la determinazione della solubilità massima in acqua di un principio attivo, ad una precisa temperatura (solitamente 20°C), si procede sciogliendo una quantità in eccesso di composto puro all'interno di un matraccio di vetro, e si aggiunge poi acqua Milli-Q, verificando la presenza persistente di una buona quantità di corpo di fondo. La soluzione viene poi analizzata attraverso strumentazione HPLC con rivelatore UV-DAD per la determinazione quantitativa della concentrazione del principio in soluzione, corrispondente alla solubilità massima stimata a quella temperatura.

2.2.12 Verifica della stabilità di p.a. insetticidi agli ultrasuoni

Per la verifica della stabilità dei quattro p.a. in studio a trattamento agli ultrasuoni si prepara una soluzione standard a titolo noto (es. 10 mg/L) dei 4 principi in metanolo, all'interno di un matraccio. La soluzione viene analizzata all'HPLC con rivelatore UV-DAD, prima e dopo essere esposta a bagno ad ultrasuoni per un tempo di 40'. Gli spettri e le concentrazioni registrate vengono quindi sovrapposte per la verifica di possibili variazioni.

3 RISULTATI e DISCUSSIONE

3.1 Considerazioni sulla metodologia d'analisi

Il metodo per l'identificazione, e la conseguente determinazione quantitativa, dei p.a. insetticidi Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid e Fipronil in matrici di diverso tipo è stato sviluppato presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova, dopo la consultazione di diverse pubblicazioni scientifiche in tale ambito (Ying and Kookana 2004, Singh et al. 2004, Rancan et al. 2006, Zhou et al. 2006).

L'utilizzo della cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) con sistema di rivelazione UV-DAD permette un'efficace separazione dei quattro p.a. eventualmente presenti in uno stesso campione ed il loro sicuro riconoscimento attraverso l'analisi dello spettro d'assorbimento dei picchi registrati nei cromatogrammi. La tecnica, impiegando la strumentazione HPLC convenzionale, permette il raggiungimento di limiti di determinabilità per i diversi composti sufficientemente bassi, dell'ordine di 0,1 – 0,2 mg/L. Ricorrendo a procedure più efficienti (UFLC) si ottengono limiti da cinque a dieci volte inferiori.

Nella presente tesi si è potuto operare con entrambe le tipologie di strumentazione e i risultati di seguito riportati mettono ben in evidenza i vantaggi della procedura d'analisi ottimizzata in UFLC. Va inoltre sottolineato che nel corso della tesi gli elevati costi dell'acetonitrile suggerivano lo sviluppo di metodologie impieganti una miscela eluente metanolo-acqua: tale soluzione si è rivelata però meno efficiente sia nella separazione cromatografica che nella quantificazione dei picchi ottenuti. Questo metodo, date le scarse prestazioni, è stato utilizzato solo in minima parte nel presente lavoro.

Mediante le procedure qui ottimizzate (i cui dettagli sono riportati nel capitolo 2) l'identificazione e la quantificazione di p.a. è risultata difficoltosa per campioni caratterizzati da una matrice organica particolarmente complessa (frammenti di api morte) e laddove la concentrazione dei p.a. era molto bassa. Tuttavia, attraverso minime aggiunte di standard di p.a. e la rianalisi dei campioni, è stata possibile l'identificazione certa dei composti senza dover ricorrere a strumentazioni più sofisticate (LC-MS).

Entrambe le metodologie (HPLC e UFLC) consentono di ottenere separazioni con un'ottima risoluzione cromatografica e una risposta strumentale lineare, verificata fino a concentrazioni di circa 100 mg/L. La procedura in UFLC, oltre a consentire l'analisi in tempi estremamente ridotti (4,5 minuti), è caratterizzata da prestazioni analitiche nettamente migliori, qui

evidenziate dai valori di precisione e dai limiti di determinabilità (LOD) stimati nel corso del presente lavoro.

Infine si sottolinea come, da analisi effettuate durante le procedure di ottimizzazione del metodo, i principi attivi in studio siano risultati stabili alle varie procedure di laboratorio ed in particolare al trattamento in bagno ad ultrasuoni. Inoltre per il p.a. Clothianidin sono stati eseguiti ulteriori test per la conferma della sua stabilità alle elevate temperature. Si è riscontrata invece una sua minima tendenza alla fotodegradazione. Per il p.a. Fipronil è stato invece verificato il livello di solubilità in acqua, rilevato pari a 3,01 mg/L, valore confrontabile con quello riportato in letteratura pari a 1,9 mg/L (Muccinelli, 2006).

3.1.1 Metodologie d'analisi utilizzate

Vengono riportati di seguito i dettagli principali delle quattro metodologie d'analisi ottimizzate e impiegate nel presente lavoro di tesi, le cui prestazioni saranno analizzate nei paragrafi successivi:

- “*metodo HPLC 1*” , che utilizza un HPLC Dionex dotato di rivelatore UV-DAD e colonna Alltech Alltima C18 5 μ m (4,6 \times 250mm), con flusso d'eluente acetonitrile-acqua in gradiente di concentrazione (tempo d'analisi 15 minuti);
- “*metodo HPLC 2*”, che utilizza un HPLC Dionex dotato di rivelatore UV-DAD e colonna Alltech Adsorbosphere C18 5 μ m (4,6 \times 250mm), con flusso d'eluente metanolo-acqua in gradiente di concentrazione (tempo d'analisi 15 minuti);
- “*metodo UFLC 1*”, che utilizza un UFLC Shimadzu dotato di rivelatore UV-DAD e colonna Phenomenex Luna C18 (2,5 μ m, 2x100 mm), con flusso d'eluente acetonitrile-acqua in gradiente di concentrazione (tempo d'analisi 4,5 minuti);
- “*metodo UFLC 2*”, che utilizza un UFLC Shimadzu dotato di rivelatore UV-DAD e colonna Shimadzu XR-ODS II (2,2 μ m, 2 x100 mm), con flusso d'eluente acetonitrile-acqua in gradiente di concentrazione (tempo d'analisi 4,5 minuti).

3.1.2 Calcolo dell'errore di misura strumentale

Il calcolo dell'errore di misura strumentale, associato alle diverse metodologie utilizzate, è stato determinato attraverso misure ripetute effettuate su campioni reali (campioni di guttazione fogliare ed estratti di semi concitati in metanolo). Per ognuna delle due strumentazioni è stata analizzata la variazione d'incertezza di misura, espressa come errore di misura percentuale, al variare della concentrazione rilevata nel campione. Ipotizzando l'esistenza di una dipendenza lineare dell'incertezza con la concentrazione stimata:

$$S_x = a + bC_x$$

(dove a e b sono i contributi all'incertezza del bianco e dell'analita, S_x la deviazione standard delle misure di concentrazione), allora l'errore di misura (%) è:

$$\text{err.}\% = (S_x \cdot 100) / C_x$$

e può essere correlato a C_x mediante l'interpolazione dei punti sperimentalmente ottenuti con un'iperbole. Un esempio grafico di tale andamento è riportato in figura 3.1.

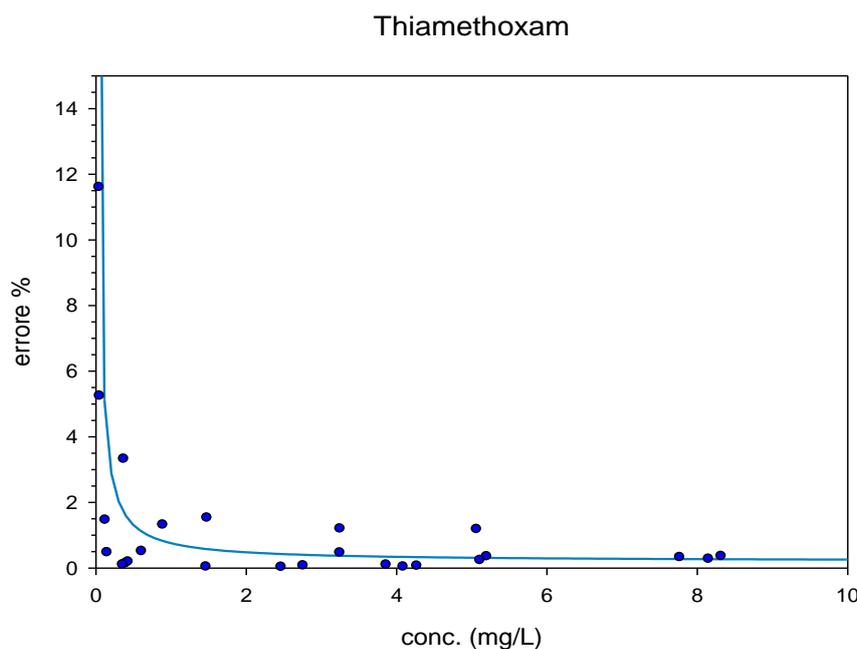


Figura 3.1 Variazione dell'errore di misura % al variare della concentrazione di p.a. Thiamethoxam nel campione, associato alla metodica HPLC 1

Mediante tale modello è possibile così rilevare quali siano gli errori % di misura associati alle due principali metodologie impiegate, per i diversi p.a., per campioni con determinati livelli di concentrazione (valori riportati in Tabella 3.1).

Principio attivo	Errore % - metodo HPLC 1	Errore % - metodi UFLC 1 e 2
Thiamethoxam	< 0,5%	< 0,2%
Clothianidin	< 1,4%	< 0,3%
Imidacloprid	< 1,1 %	< 0,3 %
Fipronil	--	< 0,8 %

Tabella 3.1 Errori percentuali di misura strumentale rilevati per campioni con concentrazione maggiore a 2 mg/L

Dai risultati ottenuti si sottolinea il complessivo minore errore di misura percentuale associato all'utilizzo dello strumento UFLC rispetto l'HPLC Dionex. Per Fipronil non è stato possibile determinare l'errore associato alle misure con HPLC, per mancanza di misure ripetute riferite a tale principio nei campioni reali.

3.1.3 Determinazione del limite di determinabilità strumentale (LOD) - metodo IUPAC

Il valore minimo di segnale, al di sopra del quale è possibile individuare con affidabilità la presenza di una specie, si definisce limite di determinabilità (LOD) e viene espresso attraverso l'equazione seguente:

$$\text{LOD} = t_{\alpha,v} \cdot s_0 + t_{(1-\beta),v} \cdot s_s$$

Dove s_0 e s_s sono rispettivamente le stime della deviazione standard del segnale del bianco e del segnale dell'analita valutate sperimentalmente.

Al fine della determinazione del LOD dei 4 p.a. insetticidi secondo il metodo IUPAC, per ognuno dei metodi d'analisi sviluppati sono state quindi disposte una serie di analisi di soluzioni standard a bassa concentrazione per i diversi p.a. (intervallo di concentrazione circa 0,05 – 0,40 mg/L). Si è quindi costruita la retta di calibrazione con le relative bande di confidenza (LC=95%). La banda di confidenza superiore interseca l'asse delle ordinate nel punto indicato come y_c , limite critico al di sotto del quale i segnali hanno una probabilità definita (95%) di appartenere a soluzioni a contenuto nullo di analita. Il valore di ascissa, corrispondente all'intersezione di y_c con la fascia di confidenza inferiore ed indicato con x_d , è il limite di determinabilità, concentrazione che produce un segnale la cui distribuzione può essere assegnata al bianco (errore di 2^a specie) con una probabilità inferiore al 5%.

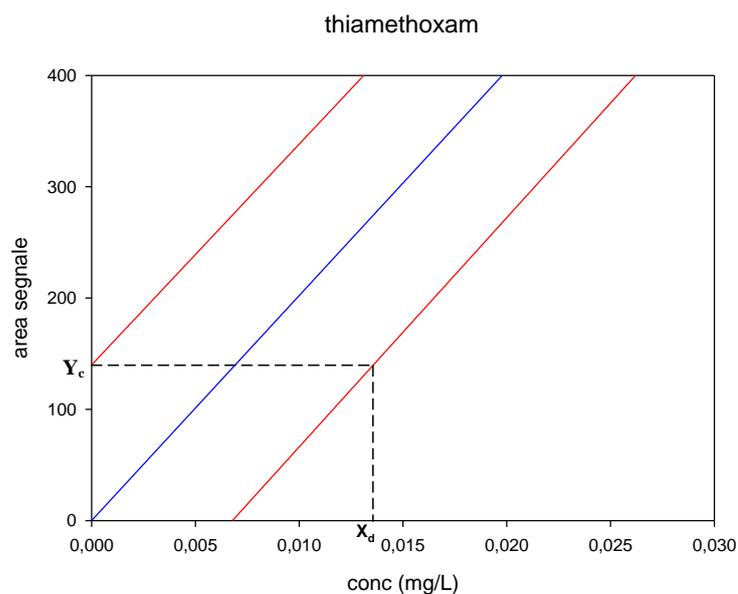


Figura 3.2 Esempio di determinazione del limite di determinabilità del metodo “UFLC 1” per il p.a. Thiamethoxam: in blu la retta di regressione ed in rosso le relative bande di confidenza

Seguendo tale procedura, si è valutato il limite di determinabilità per i diversi p.a. in studio, ottenuti con le tre metodiche principalmente impiegate (Tab. 3.2); per il metodo “HPLC 2” non è stato determinato il LOD viste le scarse prestazioni ottenute.

principio attivo	LOD (mg/L) -HPLC 1-	LOD (mg/L) -UFLC 1-	LOD (mg/L) -UFLC 2-
<i>Thiamethoxam</i>	0,110	0,014	0,014
<i>Clothianidin</i>	0,130	0,017	0,010
<i>Imidacloprid</i>	0,110	0,011	0,007
<i>Fipronil</i>	0,270	0,022	0,027
<i>Acetamiprid</i>	- -	0,016	0,003
<i>Thiacloprid</i>	- -	0,005	0,002

Tabella 3.2 Limiti di determinabilità delle differenti metodiche d’analisi sperimentalmente determinati per i diversi p.a.

Possiamo osservare come i limiti di determinabilità ottenuti con le metodiche in UFLC siano dalle 5 alle 10 volte inferiori rispetto quelli ottenuti con l’HPLC Dionex. Inoltre si osserva come la seconda metodica sviluppata per UFLC, utilizzante la colonna Shimadzu XR-ODS II, raggiunga LOD sensibilmente inferiori rispetto all’altra metodica sviluppata per UFLC, utilizzante la colonna Phenomenex Luna. Ciò conferma la migliore efficienza cromatografica attribuibile alla colonna impaccata con particelle di più piccole dimensioni (2,2 µm).

Sono state infine effettuate alcune prove per la verifica della bontà dei valori di LOD ottenuti con il metodo “UFLC 1”, analizzando la risposta dello strumento all’iniezione di quantità minori dello standard più diluito (0,05 mg/L circa) qui utilizzato. L’iniezione di volumi inferiori ai normali 5 µL, dovrebbe corrispondere in una diminuzione proporzionale del segnale strumentale, raggiungendo così i valori di segnale dove si collocano all’incirca i relativi LOD (Tab. 3.3).

Concentrazione nominale di p.a. (µg/L)	Concentrazione rilevata con iniezione di 3µl (µg/L)		Concentrazione rilevata con iniezione di 2 µl (µg/L)	
Thiamethoxam 63,0	<u>Media</u> 40,2	Dev. st = 3,4 Dev.st % = 8,46	<u>Media</u> 26,2	Dev. st = 1,7 dev.st % = 6,51
Clothianidin 65,0	<u>Media</u> 35,2	dev. st = 1,7 Dev.st % = 4,84	<u>Media</u> 23,2	Dev. St = 2,1 dev.st % = 8,87
Imidacloprid 55,0	<u>Media</u> 33,0	dev. st = 1,2 Dev.st % = 3,50	<u>Media</u> 19,7	Dev. st = 2,2 dev.st % = 11,23
Fipronil 51,0	<u>Media</u> 19,2	dev. st = 9,5 dev.st % = 49,53	<u>Media</u> 22,2	Dev. St = 6,7 dev.st % = 29,90
Acetamiprid 52,0	<u>Media</u> 41,7	dev. st = 6,6 dev.st % = 15,81	<u>Media</u> 22,5	Dev. st = 1,3 dev.st % = 5,74
Thiacloprid 52,0	<u>Media</u> 32,00	dev. st = 0,82 Dev.st % = 2,55	<u>Media</u> 20,75	dev. st = 0,50 dev.st % = 2,41

Tabella 3.3 Concentrazioni dello standard più diluito utilizzato nella determinazione del LOD dei diversi p.a. e valori di concentrazione rilevati con la metodica “UFLC 1” a diversi volumi di iniezione, su 4 repliche, e con i relativi valori di media e deviazione standard

Le prove effettuate hanno confermato l’affidabilità dei valori di LOD determinati, con tale metodo d’analisi, per i diversi principi attivi. Le risposte dello strumento a volumi di iniezione dello standard di 3 e 2 µL hanno confermato come i valori di segnale e di concentrazione così ottenuti siano molto vicini al limite di rivelabilità. A tali livelli, infatti, diminuisce decisamente il rapporto segnale-rumore e, insieme ad esso, i valori di precisione delle misure di concentrazione. Si nota infatti come per i tre p.a. con LOD più elevato (Fipronil, Clothianidin, Acetamiprid) i valori di deviazione standard delle misure di concentrazione siano sensibilmente più elevati rispetto agli altri p.a.

3.2 Analisi del contenuto di p.a. all'interno di sementi conciate con diverse formulazioni insetticide

Per lo studio quantitativo della dispersione, attraverso diversi meccanismi, di p.a. insetticidi da semi di mais conciatati, si è resa necessaria una preventiva analisi del contenuto medio di p.a., per seme, unita ad un'analisi della possibile variazione di contenuto di p.a. in semi della stessa tipologia.

Le sementi di mais sotto esame sono sviluppate a partire da ibridi di mais ben selezionati, conciatati in un secondo momento da industrie chimiche dedicate al comparto agricolo, e rispediti all'azienda che si occupa di commercializzare il seme (nel nostro caso Pioneer Italia). La procedura di concia consiste nel mettere a bagno grosse quantità di sementi in soluzioni caratterizzate da precise concentrazioni di principio attivo insetticida e sostanze adesivanti di diverso tipo (anche dette coformulanti) e mantenute in continua agitazione. Tale procedura assicura la formazione di semi protetti da una certa dose di principio attivo (insetticida o fungicida che sia) che solitamente è riportata nell'etichetta della semente come contenuto di p.a. in mg per seme.

Per verificare l'effettivo contenuto di principi attivi dichiarati nelle diverse sementi, sono state disposte una serie di analisi su queste, sia della versione con vecchia confettatura che della versione con nuova confettatura commercializzata a partire dal presente anno (2009) al fine di ridurre le emissioni di p.a. nel corso delle operazioni di semina. I risultati sono riportati nella tabella 3.4.

Due sono gli aspetti importanti che possono essere osservati.

Il primo è che i valori di concentrazione di principio di concia, rilevati con le analisi, sono significativamente differenti da quelli dichiarati in etichetta delle sementi, soprattutto per quanto riguarda le sementi con vecchia confettatura. Il valore nominale dichiarato in etichetta è logicamente indicativo, perché il processo di concia del seme subisce l'influenza soprattutto delle dimensioni superficiali di questo: una maggior superficie permette l'adesione di una maggior quantità di pellicola e quindi una maggiore dose di principio di concia nel seme.

Eccezione fatta per i semi conciatati con Gaucho 350 FS, sia vecchia che nuova confettatura, che dimostrano sempre valori di p.a. per seme superiori a quelli nominali, per le altre sementi si rilevano dosi medie di p.a. di concia sempre inferiori alla dose nominale. (Figura 3.3).

tipologia semente		Concentrazione di p.a. misurata (mg/seme)	
		vecchia confettatura	nuova confettatura
concia Cruiser 350 FS p.a. Thiamethoxam 1 mg/seme	Thiamethoxam	0,40	0,64 ± 0,16
	Clothianidin	0,021	<LOD
	Imidacloprid	0,004	<LOD
	Fipronil	<LOD	<LOD
concia Poncho p.a. Clothianidin 1,25 mg/seme	Thiamethoxam	<LOD	<LOD
	Clothianidin	0,723	1,10 ± 0,34
	Imidacloprid	0,004	<LOD
	Fipronil	<LOD	<LOD
concia Poncho p.a. Clothianidin 0,5 mg/seme (concia in via sperimentale)	Thiamethoxam	0,0157 ± 0,0017	--
	Clothianidin	0,374 ± 0,050	--
	Imidacloprid	0,0013 ± 0,0029	--
	Fipronil	<LOD	--
concia Gaucho 350 FS p.a. Imidacloprid 0,5 mg/seme	Thiamethoxam	0,00796 ± 0,00078	<LOD
	Clothianidin	0,0160 ± 0,0042	<LOD
	Imidacloprid	0,89 ± 0,30	0,84 ± 0,12
	Fipronil	0,0185 ± 0,0057	<LOD
concia Gaucho 350 FS p.a. Imidacloprid 1,25 mg/seme (concia in via sperimentale)	Thiamethoxam	0,029	--
	Clothianidin	0,007	--
	Imidacloprid	1,380	--
	Fipronil	0,015	--
concia Regent 500 FS p.a. Fipronil 0,75 mg/seme	Thiamethoxam	0,019	0,00310 ± 0,00050
	Clothianidin	0,017	<LOD
	Imidacloprid	0,006	<LOD
	Fipronil	0,326	0,406 ± 0,068

Tabella 3.4 Contenuto di diversi p.a. all'interno delle varie sementi conciate, vecchia e nuova confettatura

Tale fenomeno può essere in parte spiegato con la parziale disgregazione della pellicola conciante durante le fasi che precedono l'utilizzo della semente (imballaggio, trasporto). La disgregazione della pellicola conciante è facilmente osservabile ad un primo esame visivo: molti semi appaiono chiaramente “scoloriti in più punti”, segno del distacco della pellicola di concia. Il fenomeno si riscontra in maniera minore per i semi con nuova confettatura, data la maggior efficacia dei nuovi trattamenti di concia sviluppati dalle case produttrici. La maggior efficacia di tali trattamenti è stata anche confermata da misure di dispersione in campo di polveri insetticide, effettuate durante semine di mais conciato con vecchia e nuova confettatura, di cui parleremo in seguito.

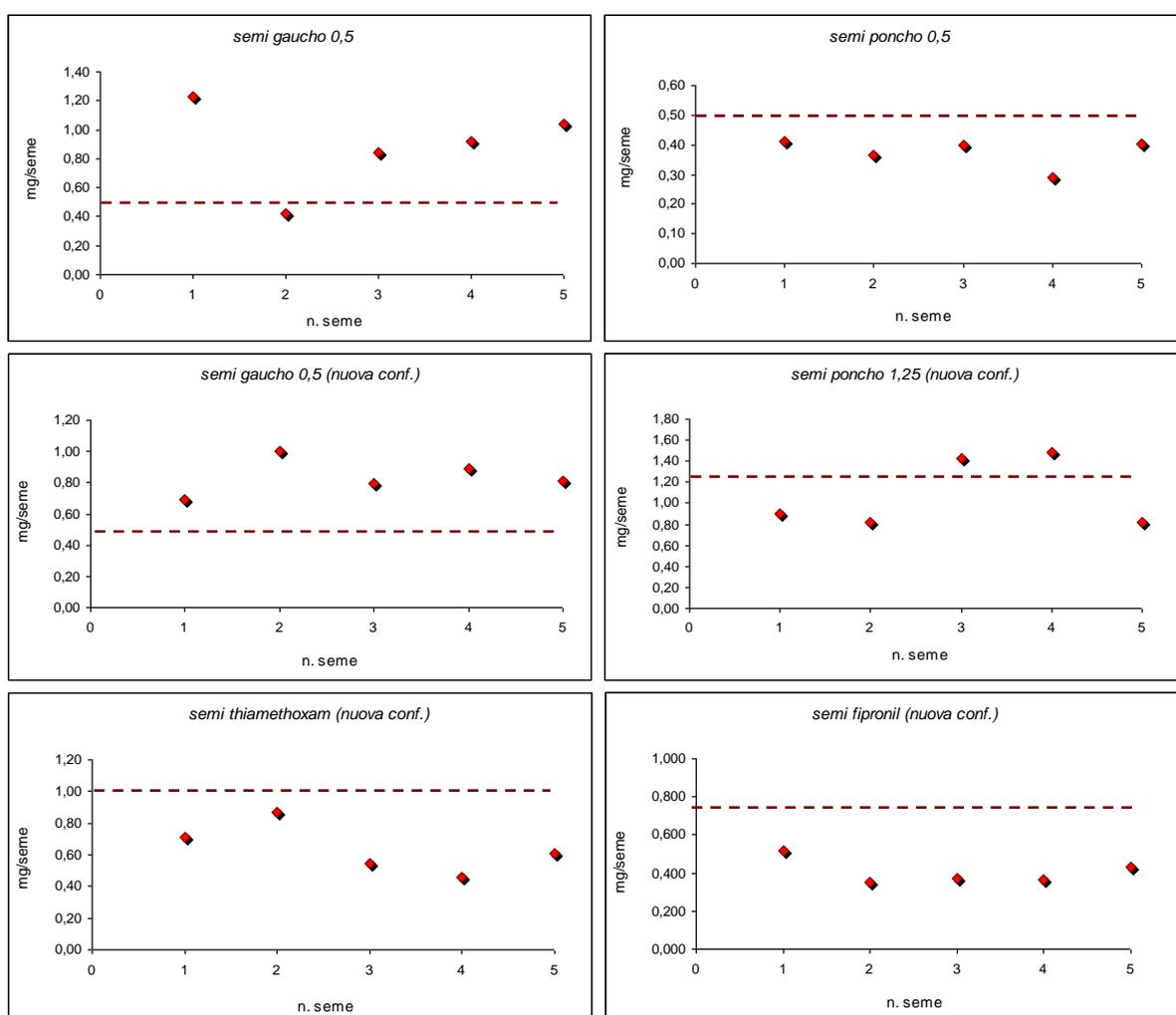


Figura 3.3 *Contenuti di p.a. di concia, per diverse tipologie di semente, con il relativo livello di dose di concia nominale (barra rossa)*

Il secondo importante aspetto rilevabile dalle analisi effettuate sulle varie sementi (ma osservabile anche da analisi su campioni di guttazione fogliare, di cui parleremo in seguito) è la presenza di minime quantità di principi attivi, diversi da quello di concia, nelle sementi

caratterizzate dalla vecchia confettatura. Tale “contaminazione” viene inoltre rilevata in sementi conciate Fipronil nuova confettatura, dove si riscontrano tracce di Thiamethoxam.

È stata quindi avanzata l’ipotesi che tali contaminazioni derivassero dal processo di concia delle sementi, probabilmente per un lavaggio non approfondito dei contenitori all’interno dei quali avveniva il trattamento, fra processi di concia con principi attivi diversi.

Tale ipotesi è stata avvalorata dall’assenza di impurezze rilevate nella soluzione del prodotto commerciale Confidor (insetticida a spruzzo ad ampio raggio, preparato a partire dal p.a. base Imidacloprid).

Inoltre, sono stati analizzati anche semi contenenti solo una soluzione fungicida denominata Celest XL (costituita dai principi attivi Fludioxonil e Metalaxyl). L’analisi ha rilevato tracce in questi semi dei seguenti p.a. insetticidi:

	p.a. rilevato	Contenuto (mg/seme)
Semi conciatati con fungicida	Thiamethoxam	0,001 mg/seme
	Clothianidin	0,026 mg/seme
	Imidacloprid	0,018 mg/seme
	Fipronil	0,001 mg/seme

Una successiva analisi di semi con nuova confettatura e conciatati esclusivamente con il p.a. fungicida Celest, estratti in un ridotto volume di metanolo, ha rilevato la presenza in tali semi dei seguenti p.a. insetticidi:

	p.a. rilevato	Contenuto (mg/seme)
Semi conciatati con fungicida	Fipronil	0,0019 mg/seme
	Imidacloprid	0,0003 mg/seme

La presenza di tali contaminazioni è quindi attribuibile a difetti nel processo di concia delle sementi. Tale aspetto è risultato interessante nell’analisi della tossicità di campioni di guttazione fogliare provenienti da piante di mais conciate con Fipronil, alla luce delle proprietà di questa molecola.

3.3 Analisi del contenuto di p.a. insetticidi in gocce di guttazione fogliare, raccolte da plantule di *Zea mays* ottenute da semi concianti

Nei primi mesi del 2009, presso il Dipartimento di Scienze Chimiche, sono stati analizzati alcuni campioni di acqua di guttazione fogliare raccolta da piante di *Zea mays* nate da semi concianti con i quattro p.a. insetticidi in studio. Tali semi sono stati piantati in vasi di terreno di diametro circa 15 cm (6-10 semi per vaso; 6-8 vasi per p.a.) e lasciati crescere all'interno di una serra riscaldata, presso il Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova. Le gocce di guttazione sono state raccolte dal personale di tale Dipartimento, con una frequenza di tre volte al giorno, tramite pipette Pasteur. I prelievi si sono protratti nelle due settimane successive all'emergenza delle piantine ed i campioni raccolti sono stati conservati in frigorifero per alcuni giorni prima di essere analizzati in laboratorio.

N° prelievo	t medio dall'emergenza (giorni)	Insetticida di concia	concentrazione di p.a. (mg/L)			
			Thiamethoxam	Clothianidin	Imidacloprid	Fipronil
1	1	GaUCHO	3,78	0,41	80,87	< LOD
		Cruiser	24,29	2,33	0,28	< LOD
		Regent	0,61	0,56	0,19	< LOD
		Poncho		35,99	0,21	< LOD
2	3	GaUCHO	2,75	0,21	55,88	< LOD
		Cruiser	13,65	1,52	< LOD	< LOD
		Regent	0,26	0,31	< LOD	< LOD
		Poncho	0,02	25,74	< LOD	< LOD
3	5	GaUCHO	2,46	0,25	49,25	< LOD
		Cruiser	7,76	1,02	0,09	< LOD
		Regent	0,10	0,34	0,12	< LOD
		Poncho	0,05	22,58	0,06	< LOD
4	7	GaUCHO	0,89	3,84	18,42	< LOD
		Cruiser	5,20	0,65	< LOD	< LOD
		Regent	0,10	0,12	< LOD	< LOD
		Poncho	0,15	14,04	2,48	< LOD
5	9,5	GaUCHO	1,21	< LOD	17,30	< LOD
		Cruiser	3,55	0,61	< LOD	< LOD
		Regent	0,35	0,39	< LOD	< LOD
		Poncho	0,22	8,82	< LOD	< LOD
6	15,5	GaUCHO	3,25	0,35	60,13	< LOD
		Cruiser	8,32	1,07	< LOD	< LOD
		Regent	0,47	0,52	< LOD	< LOD
		Poncho	0,04	31,64	< LOD	< LOD

Tabella 3.5 Concentrazioni medie dei p.a. insetticidi (in mg/L) nelle gocce di guttazione; in grassetto la concentrazione del p.a. di concia

I risultati della ricerca di p.a. insetticidi all'interno delle gocce di guttazione, riportati in tabella 3.5, mostrano presenze molto elevate di questi nelle gocce di guttazione. Tali livelli di concentrazione, considerati i possibili volumi di ingestione d'acqua da parte di api (volume solitamente prossimo ai 30 μ L), risultano chiaramente ben al di sopra delle DL₅₀ per ingestione stimate per tali organismi (pochi ng di p.a./ape).

Si nota invece come il principio attivo Fipronil, data la sua minima idrosolubilità, non sia stato mai ritrovato all'interno delle gocce di guttazione analizzate. Ciò sembra essere una conferma dell'azione non sistemica di questo composto nei confronti del mais.

Un altro risultato sorprendente rilevato dalle analisi, è la presenza nelle guttazioni di p.a. diversi da quello di concia. Tale risultato è spiegabile alla luce dei risultati ottenuti dalle analisi dei semi, effettuate durante questi primi studi e all'interno del presente lavoro di tesi.

Questo fenomeno è stato osservato anche per semi conciatati con Regent (p.a. Fipronil).

In figura 3.4 sono rappresentati gli andamenti delle concentrazioni dei diversi p.a. di concia presenti nelle guttazioni del mais, al passare dei giorni dall'emergenza delle plantule.

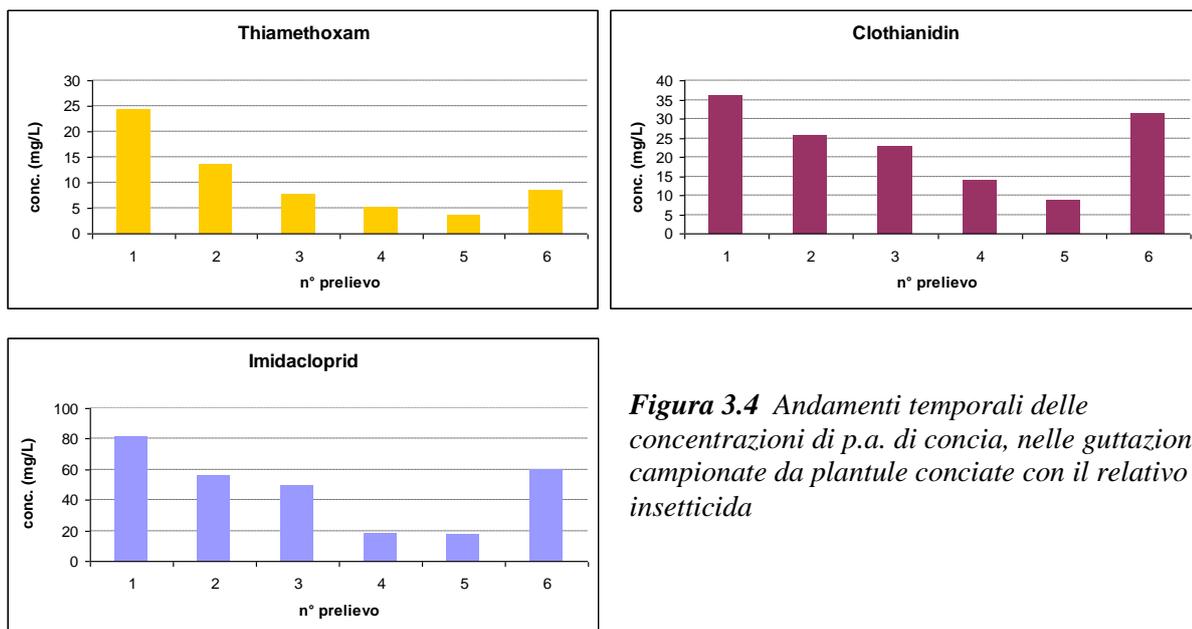


Figura 3.4 Andamenti temporali delle concentrazioni di p.a. di concia, nelle guttazioni campionate da plantule conciate con il relativo insetticida

Gli andamenti mostrati evidenziano una diminuzione di contenuto di p.a. di concia nelle gocce di guttazione raccolte fino a 9 giorni dall'emergenza delle plantule (5° prelievo). L'ultimo campione raccolto evidenzia invece un sostanziale aumento dei livelli di principio di concia: questo può essere spiegato dalla diminuzione dei volumi di acqua di guttazione prodotti dalle plantule durante la seconda settimana di vita, che potrebbe portare quindi ad una concentrazione delle molecole insetticide in circolo nei tessuti fogliari, in volumi di acqua

fuoriuscita minori. La guttazione infatti è un fenomeno fisiologico limitato agli stadi giovanili della pianta, che non si protrae per più di 2-3 settimane dall'emergenza di questa e diminuisce d'intensità (volume d'acqua di guttazione prodotta) costantemente durante tale periodo.

I primi dati analitici ottenuti sono di indubbio interesse in quanto rappresentativi di una nuova possibile via di intossicazione per le api. Tuttavia, prima di una qualsiasi valutazione ambientale, è stato necessario procedere attraverso una serie di verifiche sperimentali condotte principalmente su piante cresciute in serra.

Ad esempio, è stata testata l'ipotesi di un possibile aumento dei livelli di concentrazione di p.a. in gocce di guttazione dovuto alla semina di più semi e quindi alla crescita di più piantine, all'interno dello stesso vaso. Sono state quindi seminate due serie di vasi (6-8 vasi per serie) contenenti un solo seme per vaso, entrambe con semi conciatu Gaucho ma in due differenti formulazioni: Imidacloprid 0,5 mg/seme e Imidacloprid 1,25 mg/seme. I livelli di concentrazione di p.a. di concia nell'acqua di guttazione raccolta in giorni seguenti sono riportati in figura 3.5.

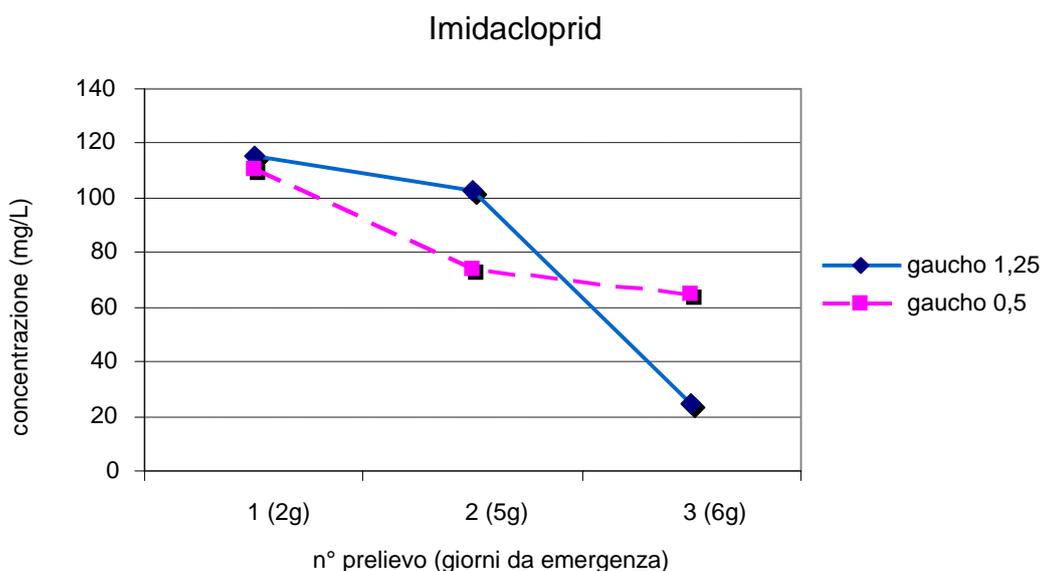


Figura 3.5 Andamento temporale delle concentrazioni medie di Imidacloprid rilevate nelle gocce di guttazione di piante ottenute da semi conciatu Gaucho (1 seme per vaso) in due differenti dosi di concia

Le concentrazioni di Imidacloprid rilevate in tali campioni sono in linea con quelle rilevate negli esperimenti precedenti (se non addirittura superiori, tabella 3.5); è possibile quindi scartare l'ipotesi di un aumento di concentrazione di p.a. dovuto alla presenza di più piante nello stesso vaso. Si nota inoltre come per 2 campioni raccolti su 3 la concentrazione di p.a. rilevata nelle guttazioni sia in accordo con la dose nominale di concia. La scarsa correlazione

fra dose di concia e livello di p.a. riscontrato nelle guttazioni può essere spiegata in primo luogo dall'elevata difformità di dose di concia reale applicata nei semi, ed in secondo luogo dalla variabilità di risposta della singola pianta alla dose conciante.

In una successiva campagna d'analisi svolta all'interno di questa tesi sono stati effettuati ulteriori monitoraggi su acqua di guttazione raccolta sulle foglie, ma anche al calice, di nuove serie di piante di mais conciato con diversi p.a. (caratterizzati da vecchie confettature) cresciute in vasi (6-8 vasi per p.a.), all'interno della serra del dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali.

Queste analisi avevano lo scopo di monitorare quali potevano essere i livelli di concentrazione di p.a. all'interno di acqua "offerta" all'ambiente (e possibilmente anche ad insetti non target) dalla pianta di mais conciato, nelle sue diverse parti. Il calice della pianta di mais può costituire infatti, nei primi stadi di sviluppo di questa, un possibile sito di stoccaggio dell'acqua di guttazione prodotta ai margini della lamina fogliare. Fenomeni di evaporazione possono portare alla concentrazione degli insetticidi nel calice, mentre la condensazione della rugiada implicherebbe una loro diluizione. I risultati sono riportati nelle tabelle 3.6 e 3.7.

I risultati ottenuti sono decisamente al di sopra dei livelli di concentrazione di p.a. rilevati nelle precedenti campagne. Essi inoltre evidenziano livelli minori di p.a. presenti nell'acqua di guttazione raccolta al calice delle piante rispetto i livelli monitorati nelle gocce raccolte sulle foglie. La motivazione di tale riduzione nei livelli di concentrazione non è ancora stata chiarita potendo al momento solo ipotizzare tre possibili fenomeni: diluizione per effetto della rugiada, riassorbimento dei p.a. nei tessuti a livello del calice o degradazione chimica o fotochimica del composto di interesse.

Campione	Principio attivo	Concentrazione p.a. (mg/L)		
		24/03	26/03	30/03
<i>Mais conciato Gaucho 1,25</i>	Imidacloprid	292,23	345,76	102,91
<i>Mais conciato Poncho</i>	Clothianidin	101,72	89,06	76,15
<i>Mais conciato Cruiser</i>	Thiamethoxam	16,22	40,85	25,31

Tabella 3.6 *Variazione della concentrazione di p.a. di concia nell'acqua di guttazione fogliare di piante di Zea mays conciate con tre diversi composti, a +2, +4 e +6 gg dall'emergenza*

Campione	Principio attivo	Concentrazione p.a. (mg/L)		
		24/03	26/03	30/03
<i>Mais conciato Gaucho 1,25</i>	Imidacloprid	59,17	120,35	8,23
<i>Mais conciato Poncho</i>	Clothianidin	46,99	41,50	7,33
<i>Mais conciato Cruiser</i>	Thiamethoxam	21,34	25,54	2,93

Tabella 3.7 *Variazione della concentrazione di p.a. di concia nell'acqua di guttazione raccolta al calice di piante di Zea mays conciate con tre diversi composti, a +2, +4 e +6 gg dall'emergenza*

Si nota comunque come le variazioni di concentrazione di uno stesso principio insetticida lungo il tempo, seguano un trend simile fra gocce raccolte sulle foglie e gocce raccolte al calice.

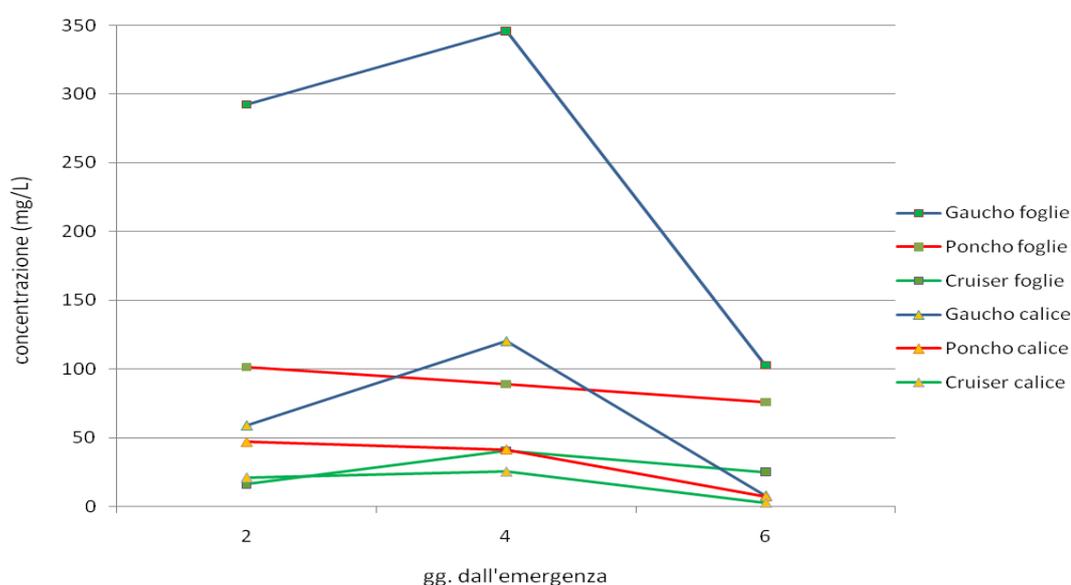


Figura 3.6 *Andamenti di concentrazione dei p.a. di concia in guttazioni raccolte su foglie e al calice di piante di mais conciate, a diversi giorni dall'emergenza*

Un'ulteriore campagna d'analisi è stata effettuata nel mese di settembre del corrente anno, su guttazioni prelevate da plantule di mais conciato cresciute in campo ed in serra. Le analisi sui campioni cresciuti in serra avevano lo scopo di dare un'ulteriore conferma di validità dei livelli di concentrazione di p.a. rinvenuti nelle prime campagne d'analisi. Sono stati quindi prelevati campioni di guttazione fogliare da quattro serie diverse di plantule di mais (ogni serie costituita da 6-8 vasi, 6-10 semi per vaso), conciate con tre diversi p.a. ed emerse dal terreno da due giorni. I risultati di tali analisi sono riportati in tabella 3.8.

Campione	p.a. riscontrato	Concentrazione (mg/L)
Guttaz. piante conc. Gaucho 0,5 mg/semi (vecchia confett.)	<i>Imidacloprid</i>	20,15
Guttaz. piante conc. Gaucho 0,5 mg/semi (nuova confett.)	<i>Imidacloprid</i>	28,85
Guttaz. piante conc. Poncho 1,25 mg/semi (vecchia confett.)	<i>Clothianidin</i>	20,32
Guttaz. piante conc. Cruiser 1 mg/semi (nuova confett.)	<i>Thiamethoxam</i>	11,32

Tabella 3.8 Concentrazioni di diversi p.a. nei campioni di guttazione fogliare raccolti da piante cresciute in serra, a 2 giorni dall'emergenza (settembre '09)

Si può notare come i campioni analizzati in questa sessione, pur conservando concentrazioni di p.a. di concia molto elevate, siano tutti al di sotto degli intervalli di concentrazione ottenuti con i primi test, soprattutto per i campioni conciatati con Gaucho.

Sempre in questa sessione d'analisi sono state monitorate le concentrazioni di p.a. di concia in campioni di guttazione fogliare prelevati da plantule di mais conciate con diversi p.a. e cresciute in campo aperto. Da tali piante, seminate con le normali condizioni di semina utilizzate per mais (75 cm spazio interfila, 20 cm spazio interseme), sono stati prelevati campioni di guttazione fogliare dopo 2, 4 e 6 giorni dall'emergenza delle plantule. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3.9.

Questi risultati evidenziano dei livelli di concentrazione di p.a. all'interno delle guttazioni fogliari decisamente inferiori rispetto ai valori osservati in campioni prelevati in serra nelle prime campagne d'analisi. I valori risultano invece in linea con quelli ottenuti da piante cresciute in serra nell'ultima campagna d'analisi (Tabella 3.8).

La diminuzione diffusa dei livelli di concentrazione di p.a. nei campioni raccolti in campo può essere spiegata però da un possibile fenomeno di dilavamento dei p.a. dal terreno a causa di eventi piovosi verificatisi nei giorni antecedenti all'emergenza delle plantule.

Anche in questo caso, gli andamenti di concentrazione nel tempo di prelievo per i diversi p.a. non sembrano seguire un trend ben delineato e confrontabile con quelli ottenuti da precedenti campagne d'analisi. Questo fenomeno può essere spiegato come detto precedentemente, dalla difformità di dose di concia reale fra semi dello stesso tipo, ma anche dalla difformità di risposta fisiologica della singola pianta (variazione nel tempo richiesto per l'emergenza delle plantule, variazione del volume di acqua di guttazione prodotta dalle singole plantule).

Campione	p.a. riscontrato	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)
		+2 gg.	+4 gg.	+6 gg.
Guttaz. piante conc. Cruiser 1 mg/semе (nuova conf.)	Thiamethoxam	11,24	6,28	9,39
	Clothianidin	1,02	0,68	0,85
	Imidacloprid	0,15	0,08	0,13
Guttaz. piante conc. Cruiser 1 mg/semе (vecchia conf.)	Thiamethoxam	5,42	3,98	2,84
	Clothianidin	0,79	0,65	0,44
Guttaz. piante conc. Gaucho 0,5 mg/semе (nuova conf.)	Imidacloprid	13,03	/	/
Guttaz. piante conc. Poncho 1,25 mg/semе (nuova conf.)	Clothianidin	7,50	9,43	9,41
Guttaz. piante conc. Poncho 1,25 mg/semе (vecchia conf.)	Clothianidin	30,02	17,12	12,41

Tabella 3.9 Concentrazione dei diversi p.a. in campioni di guttazioni fogliari, raccolte in 3 turni successivi a +2, +4, +6 gg. dall'emergenza di piante di mais cresciute in campo; in grassetto i valori di p.a. di concia

Sembra quindi che le condizioni ambientali di sviluppo della pianta (tipo e umidità del terreno, piovosità, temperatura, ecc.) possano giocare un ruolo determinante non solo nel fenomeno della guttazione, ma anche nella traslocazione dell'insetticida dal seme e attraverso la pianta. Si nota infine, come anche in questi campioni si riscontri la presenza in molte guttazioni di p.a. diversi da quello di concia.

3.4 Analisi della dispersione di insetticidi neonicotinoidi durante la semina di mais conciato

La semina di mais conciato con p.a. insetticidi è stata una delle attività maggiormente incriminate delle morie di api verificatesi negli ultimi anni, soprattutto nella Pianura Padana dove tali colture costituiscono un'elevata percentuale dell'intera superficie agricola. Le strette correlazioni fra semine primaverili e morie di api negli alveari vicinali ha portato alcuni gruppi di ricercatori a studiare quale potesse essere il legame fra tali fenomeni. Quest'ultimo è stato in seguito identificato con la dispersione di notevoli quantità di insetticidi attraverso la disgregazione fisica delle pellicole di concia che avvolgono i semi e con la loro diffusione nell'ambiente attraverso il flusso d'aria utilizzato dalla seminatrice pneumatica (Greatti et al. 2003, Greatti et al. 2006, Schnier et al. 2003).

Uno degli obiettivi di questo lavoro è la quantificazione della dispersione ambientale delle molecole insetticide utilizzate nella concia del mais durante le normali attività di semina. Per questo sono stati eseguiti durante il corso dell'anno diversi esperimenti di semina in campo, rispettando le convenzionali pratiche agricole utilizzate nella Pianura Padana.

3.4.1 Campionamento delle polveri emesse con l'aria in uscita dalla seminatrice

Per la quantificazione dell'emissione di molecole insetticide, immesse in atmosfera attraverso particelle di confettatura disgregata prodotta durante il funzionamento della seminatrice, sono state disposte due serie di campionamenti eseguiti in data 14 e 26 maggio 2009, in corrispondenza di semine di mais conciato "Poncho" (dose di concia 1,25 mg Clothianidin/semi) con vecchia e nuova confettatura.

I campionamenti di polveri sono stati eseguiti montando due diversi tipi di campionatori in contemporanea sopra la seminatrice in funzione (campionatore SKC, portata di campionamento 2,8 L/min, e campionatore Zambelli ZB1-Timer con portata di campionamento di circa 15 L/min) posizionando i portafiltri nelle vicinanze del condotto d'uscita dell'aria dalla seminatrice.

I tempi di campionamento sono stati di circa 30 minuti per il mais conciato con vecchia confettatura (eseguito durante la prima giornata di campionamento) e dell'ordine della decina di minuti per il mais conciato con nuova confettatura, un tempo che ha consentito di campionare una quantità d'aria rappresentativa, ma che minimizzava la possibilità di intasare i filtri provocando sottostime e perdite di polveri dal filtro.

Le polveri da confettatura sono state raccolte in filtri appositi di diverso materiale (policarbonato, estere misto di cellulosa, fibra di vetro), che sono stati in seguito analizzati per la determinazione quantitativa di p.a. insetticidi contenuti al loro interno.

I risultati delle analisi sono riportati nelle tabelle 3.10 – 3.11 – 3.12.

<i>Tipo di semente</i>	<i>Emissione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>		<i>Durata campionamento (min)</i>
	<i>filtro PS</i>	<i>filtro S</i>	
Poncho_1,25 mg/semi vecchia confett.	1627	3661	30

Tabella 3.10 *Emissione di Clothianidin dalla seminatrice (14/05/09); campionamento in contemporanea su filtri in policarbonato (PS) e esteri misti di cellulosa (S)*

<i>Tipo di semente</i>	<i>Emissione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>		<i>Durata campionamento (min)</i>
	<i>filtro PS</i>	<i>filtro S</i>	
Poncho_1,25 mg/semi nuova confett. 1° prova	1057	2207	13
Poncho_1,25 mg/semi nuova confett. 2° prova	1301	750	12

Tabella 3.11 *Emissione di Clothianidin dalla seminatrice (14/05/09); campionamento in contemporanea su filtri in policarbonato (PS) e esteri misti di cellulosa (S)*

<i>Tipo di semente</i>	<i>Emissione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>		<i>Durata campionamento (min)</i>
	<i>filtro PS</i>	<i>filtro S</i>	
Semente non caricata (bianco)	36	62	11
Poncho_1,25 mg/semi nuova confett. 1° prova	621	838	17
Poncho_1,25 mg/semi nuova confett. 2° prova	1416	2919	14

Tabella 3.12 *Emissione di Clothianidin dalla seminatrice (26/05/09); campionamento in contemporanea su filtri in policarbonato (PS) e esteri misti di cellulosa (S)*

Questa prima valutazione della capacità emissiva della seminatrice ha fornito, sotto il profilo quantitativo, dei risultati piuttosto contrastanti: se da un lato viene confermata l'elevata concentrazione di p.a. presente in forma particolata allo scarico della seminatrice, la sua quantificazione sembra essere affetta da un'eccessiva incertezza.

I dati suggeriscono innanzitutto che il campionamento con filtri in policarbonato comporta una sottostima della misura. E' stata anche avanzata l'ipotesi che il macchinario accumuli al suo interno del materiale particolato che può poi essere emesso in una seconda sessione di semina. In tale ottica, per effettuare un conteggio corretto delle polveri in uscita dalla seminatrice, nella prova del 26 maggio la macchina è stata azionata per alcuni minuti senza semente (prova in bianco), tentando così di minimizzare la quantità di polveri presenti già al suo interno in seguito all'attività di semina del 14 maggio.

In effetti, le semine consecutive effettuate nello stesso giorno evidenziano un rilascio sempre maggiore di polveri dalla macchina, risultante in concentrazioni di p.a. in uscita sempre più elevate (Tab. 3.12).

Tale andamento non è invece evidenziabile dalle semine consecutive effettuate il 14 maggio, dove si rileva invece una diminuzione delle concentrazioni di p.a. in uscita dalla macchina. Questo è probabilmente dovuto alla minor dispersione di p.a. caratterizzante i semi con nuova confettatura rispetto i semi con vecchia confettatura caricati nella seminatrice nel corso della prima sessione di semina.

Va anche detto che i campionatori durante il primo giorno di semina sono stati montati con la testa rivolta verso il basso, all'uscita della ventola della seminatrice. Tale disposizione delle teste di campionamento può aver portato ad una perdita di materiale grossolano campionato, frazione che fornisce un grande contributo in termini di massa al PM campionato.

Infine, la variabilità del risultato di concentrazione di p.a. rilevato con diversi filtri in uno stesso campionamento è molto probabilmente legata anche alla perdita di materiale campionato con le operazioni di manipolazione dei filtri: in particolare, i filtri in policarbonato utilizzati anche in altre tipologie di esperimenti hanno dato sempre, tranne in un caso, valori di concentrazione di p.a. inferiori di circa la metà rispetto agli altri filtri utilizzati. Inoltre una variazione dell'efficienza di campionamento può essere attribuita alle differenti caratteristiche geometriche delle teste di campionamento utilizzate. Queste, se non correttamente dimensionate, potrebbero portare ad una sottostima delle particelle più grossolane, soprattutto nelle condizioni di flusso turbolento caratteristiche dell'aria in uscita dalla ventola della seminatrice.

Per tale serie di motivi i valori di concentrazione di p.a. nell'aria in uscita dalla macchina ritenuti più validi sono quelli caratterizzati dal valore di concentrazione più elevato (Tab. 3.13). Questi valori dimostrano come la nuova confettatura del seme, attuata con miscele adesivanti migliori, porti effettivamente ad una riduzione della disgregazione della pellicola

conciante il seme e quindi ad una minore dispersione di p.a. con le operazioni di semina in campo.

<i>Tipo di semente</i>	concentrazione di Clothianidin rilevata
mais conciato Poncho_ 1,25 mg/seme vecchia confettatura	3661 µg/m ³
mais conciato Poncho_ 1,25 mg/seme nuova confettatura	2919 µg/m ³

Tabella 3.13 Concentrazioni di p.a. Clothianidin rilevate nell'aria in uscita dalla seminatrice

Attraverso la misura della portata di aria in uscita dalla seminatrice nelle normali condizioni di semina, determinata con un anemometro di tipo Darcy fra i 450 ed i 650 m³/h, è possibile calcolare la perdita di p.a. per ora di funzionamento della macchina, ovvero il fattore emissivo stimato. È da notare come l'intervallo di valori di portata d'aria in uscita dalla ventola sia molto ampio e porti quindi a intervalli di perdita oraria di p.a. altrettanto ampi. Tale limite è dovuto alla tipologia di flusso in uscita dalla macchina (turbolento) e alle fluttuazioni reali di portata correlate con il numero di giri del trattore che aziona la ventola.

Inoltre, conoscendo la velocità di avanzamento del trattore (circa 6 Km/h) e la densità di semina impostata (66667 semi/ha), è possibile determinare il tempo di semina di un ettaro di terreno, pari a circa 35'. Con tale valore è possibile stimare la dispersione di p.a. per ettaro. Infine, conoscendo la quantità nominale di p.a. presente in un singolo seme (1,25 mg/seme), è possibile stimare la perdita percentuale di p.a. come rapporto fra la quantità di p.a. dispersa per ettaro di terreno e quella apportata al terreno con i semi. Tali valori sono riportati in tabella 3.14.

<i>Tipo di semente</i>	<i>Fattori di emissione di Clothianidin</i>			
	<i>Orario (g/h)</i>	<i>superficiale (g/ha)</i>	<i>q.tà seminata (g/ha)</i>	<i>% p.a. disperso</i>
Poncho 1,25 mg/seme vecchia confettatura	1,65-2,38	0,96-1,39	83,33	1,2-1,7 %
Poncho 1,25 mg/seme nuova confettatura	1,31-1,90	0,77-1,11	83,33	0,9-1,3 %

Tabella 3.14 Fattori di emissione orari e per ettaro di semina di Clothianidin dalla seminatrice

Come si può notare, i valori di dispersione percentuale di p.a. nell'ambiente con le attività di semina risultano decisamente elevate, soprattutto per le sementi caratterizzate dalla vecchia confettatura.

3.4.2 Campionamento del PM a bordo campo, durante l'attività di semina di mais conciato

Durante le semine eseguite in campo nei giorni 14/05/09, 26/05/09 e 15/10/09 sono stati eseguiti dei campionamenti di PM a bordo del campo seminato (lato sottovento) e, per le prime due giornate, anche alla distanza di 10 metri dal bordo campo. Nelle prime due giornate è stata utilizzata semente concia "Poncho" (1,25 mg Clothianidin/seme) vecchia e nuova confettatura mentre il terzo giorno si è utilizzato mais conciato "Gaucho" (0,5 mg Imidacloprid/seme) nuova confettatura.

I campionamenti sono stati eseguiti con una serie di campionatori fissi disposti al lato sottovento rispetto il campo di semina. Tali strumenti, caratterizzati da portate di campionamento fra i 15 ed i 38,3 L/min, hanno permesso il campionamento delle polveri totali sottili (PTS) e delle polveri a frazione più fine (PM10) emesse durante le attività di semina. La ricerca quantitativa di p.a. insetticidi all'interno dei filtri utilizzati durante i diversi esperimenti, ha permesso di determinarne la quantità presente nei volumi d'aria campionati. I risultati delle analisi sono riportati nelle tabelle 3.15 – 3.16 – 3.17, mentre una loro valutazione complessiva è data in Tab. 3.18.

<i>Tipo di semente</i>	<i>PTS a bordo campo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>	<i>A 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>
Poncho_1,25 mg/seme vecchia confettatura	0,275	PM ₁₀ 0,057
	0,208	PTS 0,111

Tabella 3.15 *Dispersione del p.a. a bordo campo e a 10 metri (14/05/09); t=34 min*

<i>Tipo di semente</i>	<i>PTS a bordo campo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>	<i>A 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>
Poncho_1,25 mg/seme nuova confettatura	0,085	PM ₁₀ 0,008
	< LOD	PTS < LOD

Tabella 3.16 *Dispersione del p.a. a bordo campo e a 10 metri (14/05/09); t=40 min*

<i>Tipo di semente</i>	<i>PTS a bordo campo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>	<i>A 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>
Poncho_1,25 mg/seme nuova confettatura	0,139	--
	0,196	PTS < LOD

Tabella 3.17 *Dispersione del p.a. a bordo campo e a 10 metri (26/05/09); t=1h 06min*

Tipo di semente	Concentrazioni a bordo campo	Concentrazioni a 10 m da bordo campo	
	PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM10 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Poncho_ 1,25 mg/seme vecchia confettatura	0,242 \pm 0,047	0,111	0,057
Poncho_ 1,25 mg/seme nuova confettatura	0,105 \pm 0,083	< LOD	0,008

Tabella 3.18 Concentrazioni medie di p.a. Clothianidin rilevate nell'aria a bordo campo e a 10 metri di distanza dal bordo campo, mediante campionatori fissi, nelle prime due giornate di semina

Da queste prime analisi si conferma una grande variabilità del dato analitico, aspetto questo non sorprendente se si considera l'impossibilità di riprodurre le identiche condizioni di semina e l'effetto delle condizioni climatiche (in particolare la variabilità del vento). Si può comunque notare come le concentrazioni di p.a. rilevate a 10 metri di distanza dal bordo campo siano decisamente minori di quelle rilevate a bordo campo. Tale diminuzione, insieme alla riduzione di p.a. rilevata mediamente con campionatori di PM₁₀, porta ad ipotizzare che una buona frazione in peso delle particelle disperse in aria sia caratterizzata da dimensioni grossolane, che ne determinano una ricaduta nei primi metri dall'area di semina.

I valori medi registrati riferiscono comunque di quantità notevoli di p.a. disperso nell'aria, quantità che risultano decisamente inferiori per la semente con nuova confettatura, risultato in linea con quello di dispersione di p.a. con l'aria in uscita dalla seminatrice.

Dai campionamenti di PM effettuati lungo il bordo del campo seminato con mais conciato "Gaucho" effettuati il giorno 15/10/09, non si sono rilevate tracce di p.a. Imidacloprid in aria. Tale risultato può essere spiegato in primo luogo dalla presenza in quel giorno di vento lieve, a tratti moderato, diretto non sempre verso i campionatori di PM. Inoltre è da osservare come la densità di semina applicata in quel giorno sia inferiore rispetto la densità solitamente applicata (60.600 semi/ha contro 66.667 semi/ha seminati normalmente). Infine è da notare come la dose di p.a. applicata nella concia dei semi sia decisamente minore per "Gaucho" rispetto "Poncho" (0,5 mg/seme contro 1,25 mg/seme).

Tuttavia, con il macchinario in funzione ma fermo (sistema descritto al paragrafo 2.2.5), è stato effettuato nello stesso giorno il campionamento delle polveri a 5 metri dallo scarico della seminatrice, che ha consentito di rivelare concentrazioni di Imidacloprid nell'aria pari a 3,78 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ nelle PTS e di 0,36 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ nel PM₁₀.

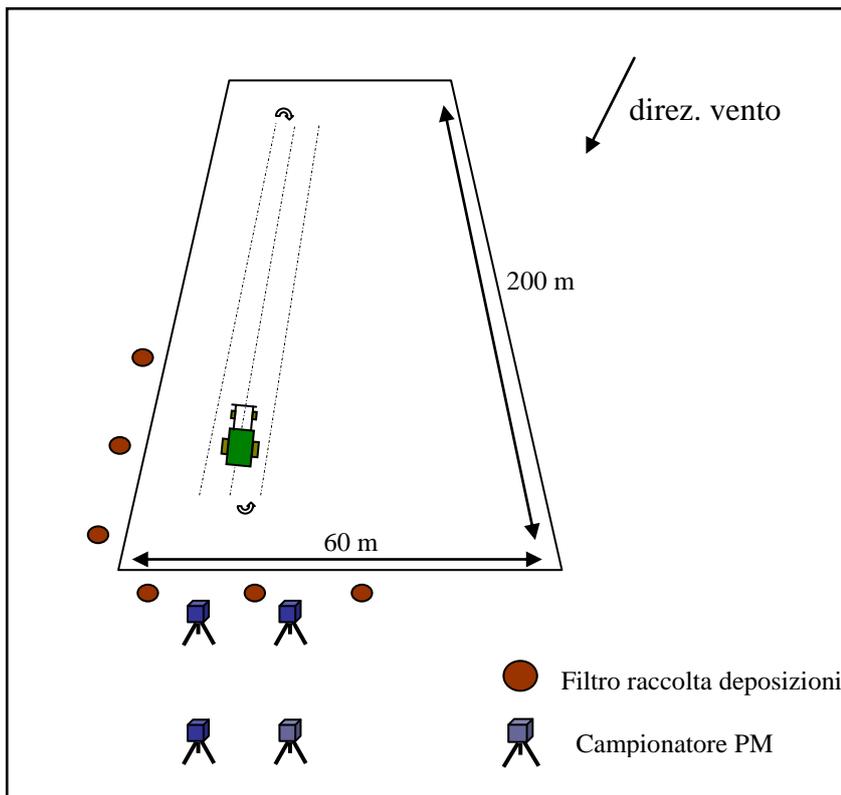


Fig. 3.7 *Disposizione dei filtri per la raccolta delle deposizioni secche e dei campionatori di PM lungo il campo, durante la prova del 14/05/09*

3.4.3 Misura delle polveri ricadute al bordo del campo di semina

Durante semine di mais conciato “Poncho” 1,25 mg/seme, vecchia e nuova confettatura (14/05/09), è stata stimata anche la quantità di deposizioni secche rilevabili al suolo lungo il bordo del campo, sottovento rispetto la zona di semina. Quest’operazione aveva lo scopo di quantificare l’eventuale contaminazione della superficie limitrofa all’area di semina, dovuto alla ricaduta delle polveri più grossolane formate con la disgregazione della confettatura della semente.

La misura delle polveri ricadute al suolo, differenziata per i due diversi tipi di mais seminato (vecchia e nuova confettatura) è stata ottenuta dall’analisi del contenuto di p.a. presente sui filtri in cellulosa disposti a terra durante le relative semine. I risultati espressi come μg di p.a. per metro quadrato di suolo, sono riportati in tabella 3.19 e 3.20.

I risultati di dispersione qui ottenuti, riferiti soprattutto alla frazione di polveri più grossolane generate dalla disgregazione delle sementi, e ricadenti quindi a breve distanza dal bordo campo, confermano l’elevata quantità dispersa di tale frazione. Si sottolinea ancora una volta la minor dispersione di p.a. ottenuta con la semina caratterizzata da nuova confettatura del seme.

<i>Filtro</i>	$\mu\text{g}/\text{m}^2$	<i>Filtro</i>	$\mu\text{g}/\text{m}^2$
R1	389,6	R7	90,4
R2	254,7	R8	157,3
R3	289,8	R9	258,1
R4	182,3	R10	93,3
R5	116,7	R11	82,4
R6	472,9	R12	91,7

Tabella 3.19 Ricadute a bordo campo, Poncho_1,25 mg/semme vecchia confettatura (a sx) e nuova confettatura (a dx)

<i>Tipo di semme</i>	principio attivo ricaduto al suolo come deposizione secca ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)
Poncho_ 1,25 mg/semme vecchia confettatura	284,3 \pm 131,2
Poncho_ 1,25 mg/semme nuova confettatura	128,9 \pm 69,0

Tabella 3.20 Quantità media di p.a. Clothianidin ricaduto al suolo, a bordo campo, in $\mu\text{g}/\text{m}^2$

3.5.1 Caratterizzazione dimensionale delle particelle emesse dalla macchina seminatrice

Nell'ipotesi che vi sia un effetto tossico acuto per le api associato all'esposizione al particolato di semina è estremamente importante, sia sotto il profilo ambientale che tossicologico, acquisire informazioni sulla distribuzione dimensionale delle particelle potenzialmente tossiche emesse in atmosfera. Tale valutazione è stata effettuata nel corso di un test di esposizione delle api al particolato di semina effettuato in campo (Agripolis, 14.07.09): qui la seminatrice (in funzione ma ferma) è stata interposta nel tragitto delle api dall'alveare ad una zona di pieno campo dove era stata posizionata un'esca di acqua/miele, costringendo quindi le api a sorvolare il cono di emissione della seminatrice. Questa era operante con il giunto cardanico del proprio trattore limitatamente alla ventola di aspirazione; il movimento delle ruote della seminatrice, e quindi il dosaggio del seme, era azionato dal giunto cardanico di un secondo trattore (Figura 2.4). Si è così potuto simulare l'emissione reale della seminatrice (e la conseguente esposizione reale delle api) pur mantenendola ferma.

Ciò ha inoltre evitato, quantomeno ridotto, la dispersione in aria di particelle provenienti dal terreno, immettendo in atmosfera prioritariamente le particelle di concia del seme.

La distribuzione dimensionale e la concentrazione delle particelle emesse dal macchinario è stata misurata in campo mediante un contatore ottico di particelle (OPC), strumento che può classificare le particelle in 15 intervalli dimensionali del loro diametro aerodinamico, compresi tra 0.3 e 30 μm . La seminatrice è stata fatta funzionare a vuoto (senza semi per circa 30 min, per la valutazione del bianco) e poi con seme conciato con Clothianidin (1.25 mg/seme) per circa 1 ora. Lo strumento è stato posizionato sia in prossimità dello scarico e sia a 5 m da questo, in due differenti posizioni rispetto al vento, che comunque si è sempre mantenuto molto debole nel corso dell'intero periodo di acquisizione.

Nelle Figure 3.8 - 3.10 sono schematizzati i risultati sperimentalmente acquisiti nel corso delle varie prove. Dopo la correzione per il bianco i risultati vengono qui espressi sia in termini di concentrazione di particelle per ogni classe dimensionale (n° medio di particelle / Litro di aria campione) e sia attraverso la conseguente rappresentazione convenzionale della distribuzione dimensionale ($dV/d\log D / \log D$ e $dn^\circ/d\log D / \log D$).

Si può osservare che in tutte le prove effettuate, la semina di mais conciato comporta l'emissione di particelle che si differenziano notevolmente in concentrazione rispetto ai valori di bianco. In prossimità dello scarico, dove le concentrazioni sono notevolmente più elevate, tale aumento si osserva per tutte le classi dimensionali. A 5 m dalla seminatrice, quindi con concentrazioni più basse di particelle e prossime ai valori di esposizione a breve termine delle api in campo, l'aumento di concentrazione sembra essere significativo solo per le particelle aventi dimensione superiore ai 0.5-0.65 μm . Questo risultato concorda pienamente con l'origine meccanica (abrasione) delle particelle in questione, processo che notoriamente produce particolati di dimensioni elevate. Risulta tuttavia evidente che il macchinario, oltre a produrre particelle grossolane (alcuni frammenti hanno dimensioni millimetriche) che avranno una limitata capacità di diffusione ambientale ricadendo nelle immediate vicinanze, emette significative quantità di particelle micrometriche e sub micrometriche (frazione fine) caratterizzate da un'elevata mobilità in atmosfera. Per una qualsiasi valutazione tossicologica ed ecotossicologica, sembra quindi opportuno doversi riferire a particelle comprese nell'intervallo 0.5-10 μm .

misura mediante OPC posizionato sul macchinario, in prossimità dello scarico

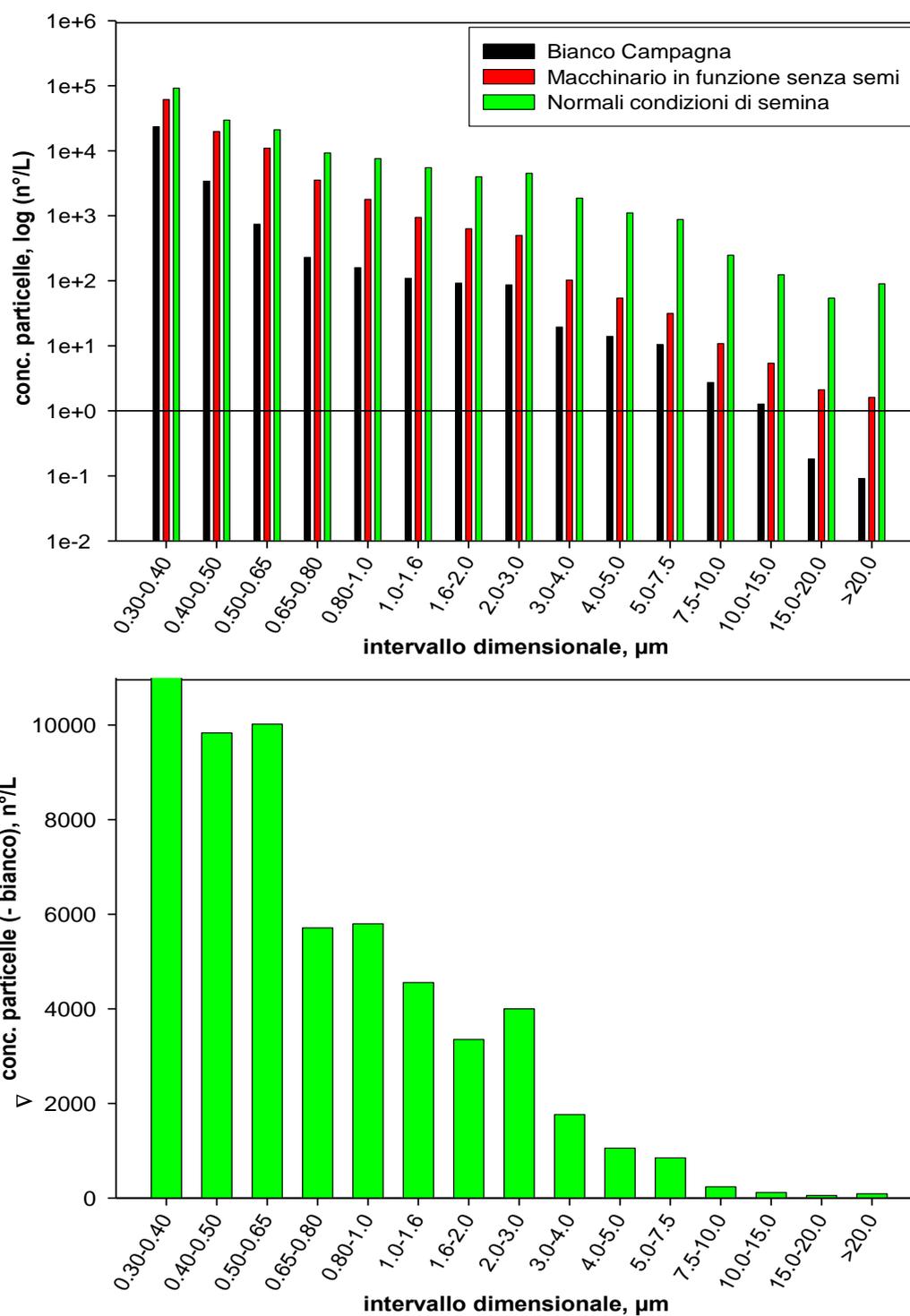
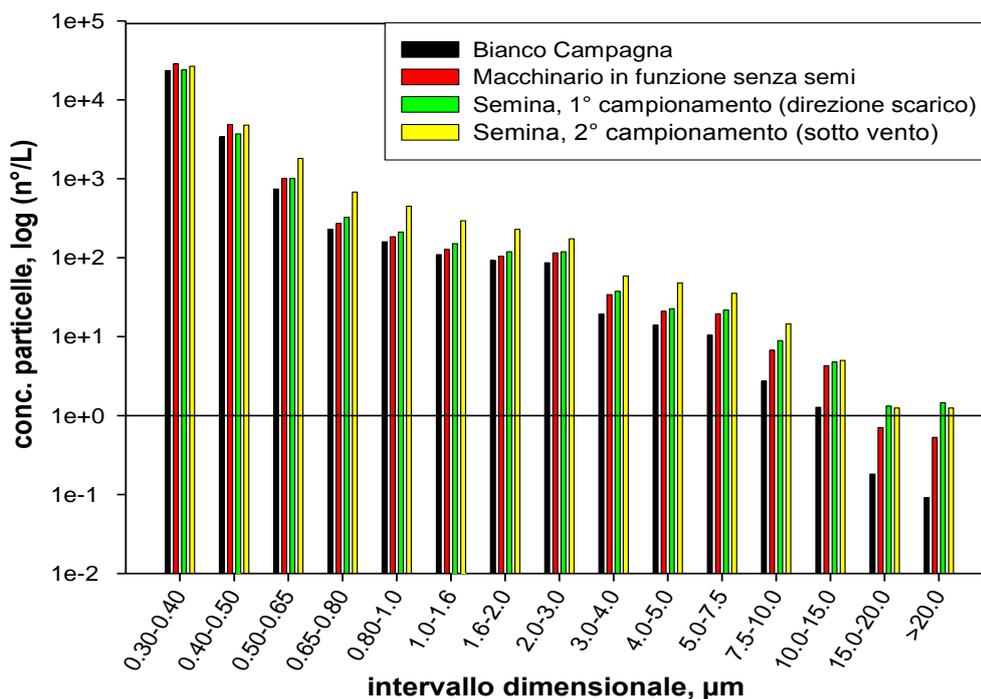


Figura 3.8 Distribuzione dimensionale delle particelle emesse durante la semina del 14/07/09 (semente conciata Poncho, 1,25 mg Clothianidin/seme, nuova confettatura). Misurazioni effettuate in prossimità dello scarico

misura mediante OPC posizionato in campo, a 5 m dal macchinario



Differenza tra la conc. di particelle misurata nelle normali condizioni di semina e quella misurata in assenza di semi (bianco)

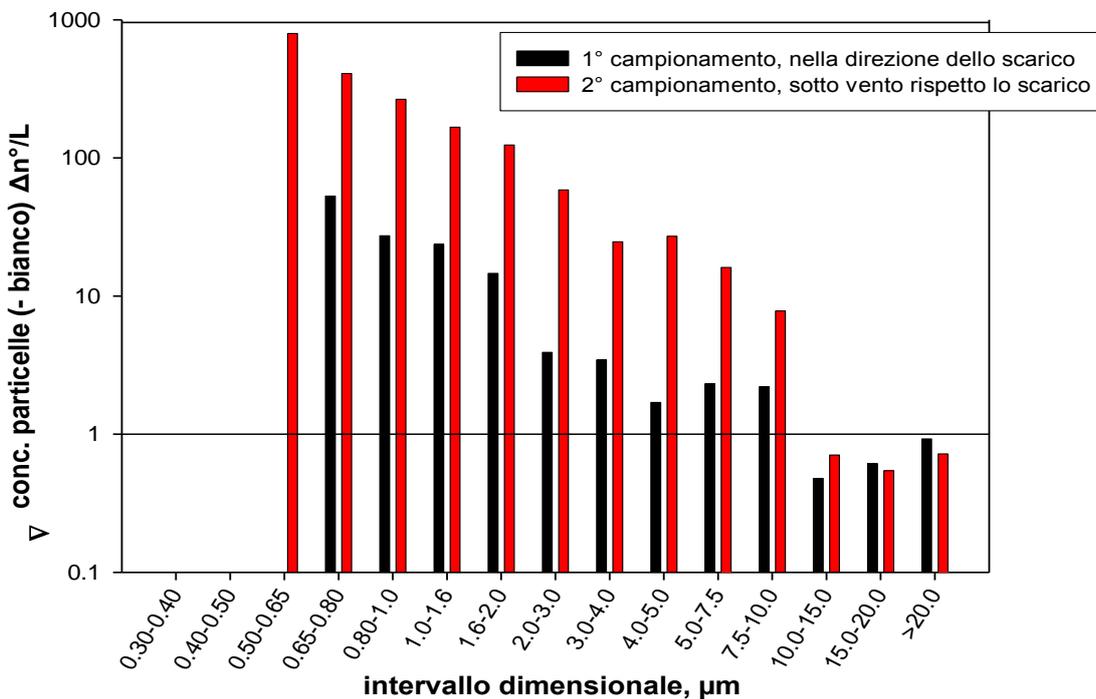


Figura 3.9 Distribuzione dimensionale delle particelle emesse durante la semina del 14/07/09. (semente concia Poncho, 1,25 mg Clothianidin/semi, nuova confettatura). Misurazioni effettuate a 5 metri dal macchinario

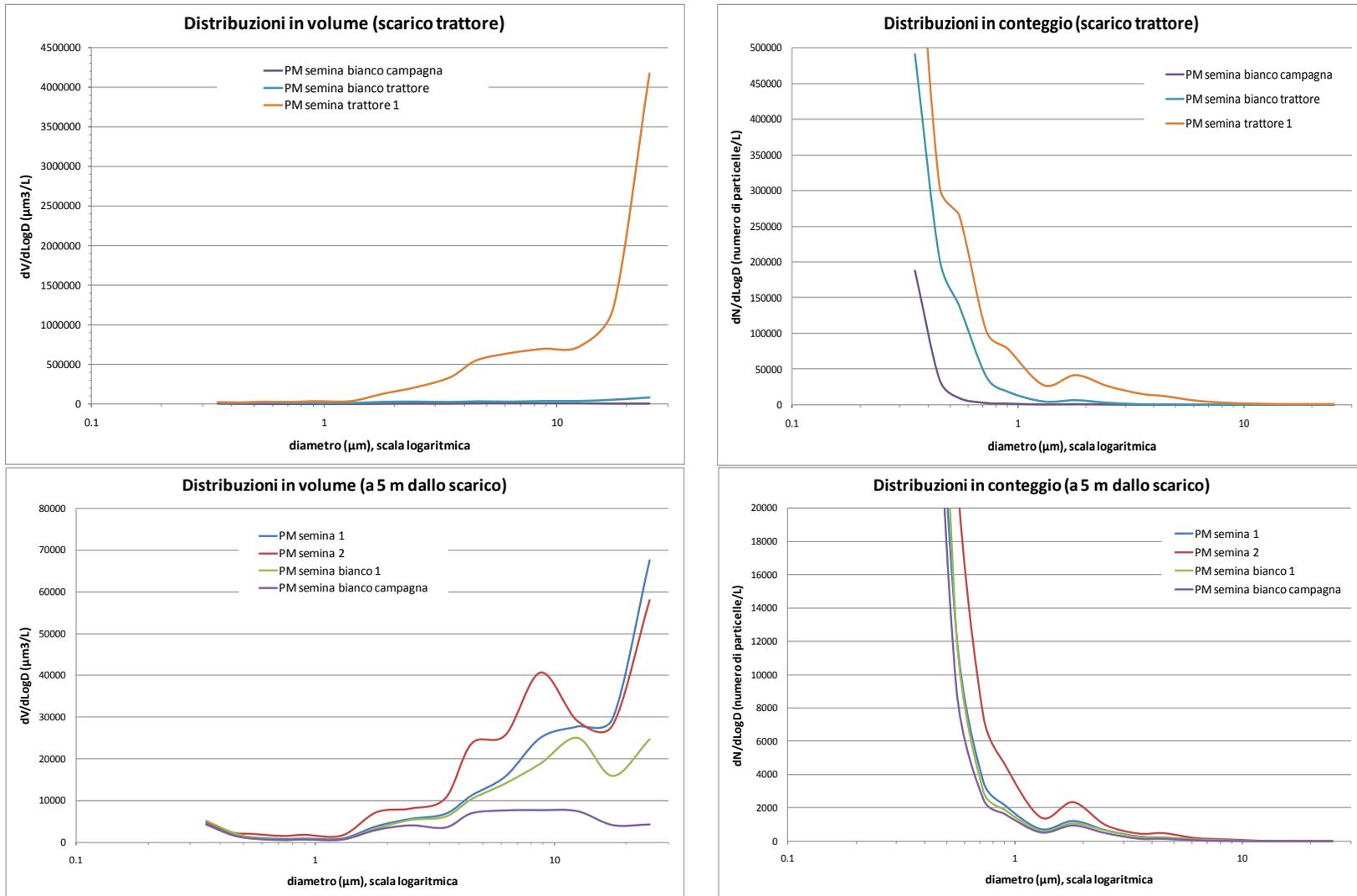


Figura 3.10 Distribuzioni dimensionali delle particelle misurate dalla strumentazione OPC durante la semina del 14/07/09, espresse come distribuzione in numero e distribuzione in volume delle particelle, rispetto il loro diametro aerodinamico, in 2 differenti posizioni

3.5.2 Caratterizzazione delle particelle mediante microscopia elettronica (SEM)

Un primo esame ottico della carrozzeria della seminatrice, dei tank contenenti i semi, ma anche dell'interno delle confezioni originali delle sementi, suggeriva come una grossa parte di perdita di p.a. in peso fosse legata alla formazione di particelle di grosse dimensioni distaccatesi dai semi, risultato confermato dai valori di polveri grossolane ricadute al suolo e campionate a bordo campo.

Impiegando la microscopia SEM è tuttavia possibile verificare la presenza ed effettuare un esame diretto di tali particelle di confettatura eventualmente presenti sul corpo di api esposte a tali polveri. Allo scopo è stato impiegato un nucleo di 5 arnie presente nelle vicinanze di uno dei campi utilizzati per le prove di misura della dispersione in aria di p.a. con la semina di mais conciato. Le api compivano da giorni il percorso fra la loro arnia ed un dispenser fornito con una soluzione di acqua-miele, attraversando tutto il campo. Alcuni campioni di api vistosamente debilitate, notate nelle ore successive ad una prova di semina (14/07/09) sono stati raccolti, conservati in provette di polipropilene in frigorifero, e successivamente analizzati sia al microscopio ottico, che al SEM.

L'esame in microscopia ottica ha rilevato la presenza su tali campioni di un numero limitato (fino a 3 particelle/ape) di particelle di grosse dimensioni, fra i 10 e 40 μm . Ciò indicherebbe la reale possibilità per le api di intercettare e trasportare con se frazioni significative di principio attivo. Al SEM è invece possibile individuare e analizzare (analisi elementare) anche particelle molto più piccole (pochi micrometri, Fig. 3.11).

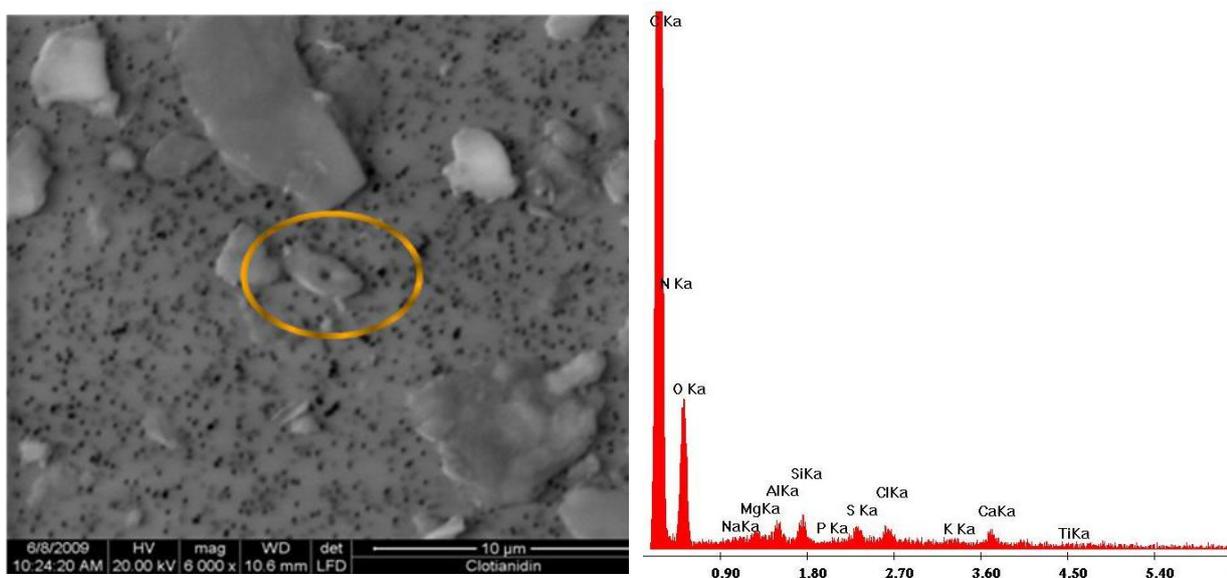


Figura 3.11 Immagine al SEM di una particella di confettatura da mais conciato Poncho. Lo spettro d'emissione a raggi X conferma la presenza nella particella di atomi di cloro e zolfo, appartenenti al neonicotinoide

Si è anche osservato che alcune particelle suggerirebbero una loro probabile modificazione fisica nelle ore seguenti al contatto con i tessuti esterni dell'ape (Fig. 3.12), ad indicare una parziale dissoluzione o fusione delle particelle originarie.

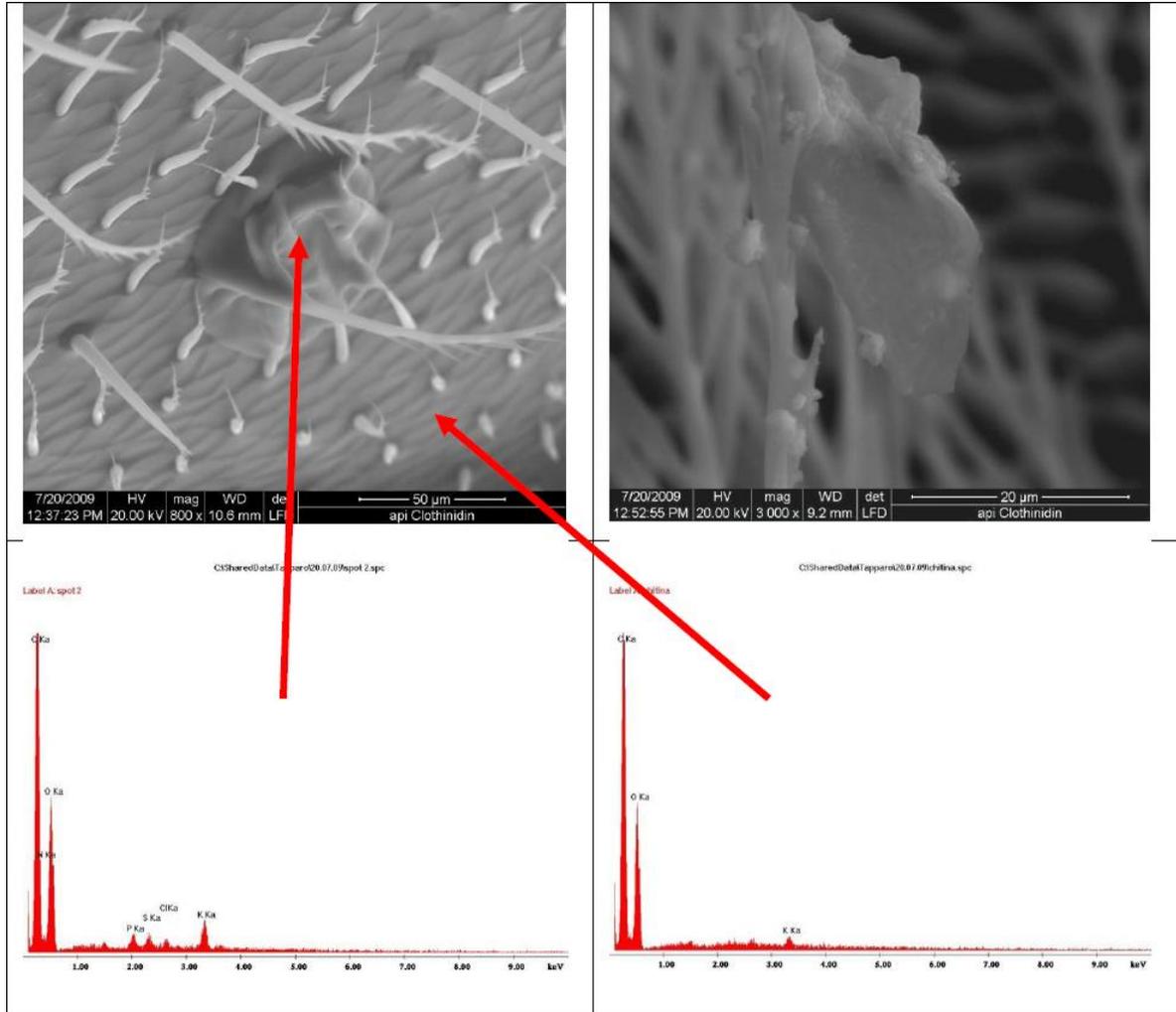


Figura 3.12 Sopra: due frammenti di confettatura individuati sull'addome delle api morte (raccolte davanti l'alveare il 14/07/09). Sotto: confronto fra l'emissione RX della particella e da una zona libera da particelle

3.6 Analisi dei residui di insetticidi in campioni di api esposte

Durante le prove di semina di mais conciato effettuate in campo in diversi periodi del 2009, veniva osservata la presenza di numerose api manifestanti sintomi da intossicazione acuta presso le relative arnie posizionate poco distanti dai campi seminati. Nei giorni seguenti alle semine si rilevava inoltre un elevato numero di api morte nei pressi dell'arnia, fenomeno che ricalcava le segnalazioni di morie osservate in tutt'Italia negli anni precedenti in seguito alle semine primaverili di mais conciato.

Nelle prove di semina effettuate nei giorni 14/07/09 e 15/10/09 (rispettivamente semina di mais conciato "Poncho" 1,25 mg/seme, e semina di mais conciato "Gaucho" 0,5 mg/seme, entrambi nuova confettatura) sono stati osservati un buon numero di api manifestanti sintomi di intossicazione acuta già durante le ore seguenti la semina. È da sottolineare come durante tali prove un numero elevato di api sorvolavano il campo in semina, perché addestrate nei giorni precedenti a sorvolare proprio tale zona fino ad un dispenser fornente una soluzione acqua – miele, posizionato una ventina di metri oltre il campo.

In seguito alla giornata di semina del 14/07/09, effettuata con mais conciato "Poncho" (p.a. Clothianidin 1,25 mg/seme) nuova confettatura, sono stati prelevati 3 campioni di api morte a seguito dell'esposizione a polveri da semina:

- campione A, 7 api raccolte in prossimità del dispenser acqua-miele posizionato oltre il campo di semina, raccolte pochi minuti dalla fine della semina;
- campione B, 7 api raccolte nei pressi delle arnie situate a poche decine di metri dal campo seminato, ad alcune ore dalla fine dell'esperimento di semina;
- campione C, 14 api (suddivise poi in 2 sub-campioni di egual numero) raccolte nei pressi delle stesse arnie il giorno successivo a quello di semina.

I campioni di api sono stati pretrattati con una soluzione di metanolo per asportare l'eventuale p.a. presente sulla loro superficie corporea; tale trattamento non è stato effettuato sui campioni di api raccolte il giorno successivo alla semina. Tutti i campioni sono stati poi macinati ed estratti in metanolo per la ricerca di eventuali p.a. presenti al loro interno. I risultati delle analisi su tali campioni sono riportati in tabella 3.21.

Campione	Intervallo prelievo dalla semina	contenuto di Clothianidin nella soluzione di lavaggio (espresso in ng/ape)	contenuto di Clothianidin nel campione macinato (espresso in ng/ape)
- A -	Semina in corso	396,1	278,2
- B -	+ 2-3 ore	6,9	154,6
- C ₁ -	+ 24 ore	--	107,5
- C ₂ -	+ 24 ore	--	128,6

Tabella 3.21 Concentrazioni di p.a. espresse in ng/ape, rilevate sulla superficie corporea e all'interno di api intossicate in seguito alla semina del 14/07/09

In seguito alla semina di mais conciato “Gaucho” (p.a. Imidacloprid 0,5 mg/seme) nuova confettatura, effettuata il 15/10/09, sono stati invece prelevati i seguenti campioni di api:

- campione A, costituito da 4 api ritrovate morte nelle vicinanze del dispenser acqua-miele subito dopo la fine della semina;
- campione B, costituito da 8 api morte (o fortemente debilitate), raccolte davanti il dispenser acqua-miele 2 ore dalla fine della semina; tale campione è stato suddiviso in 2 sub-campioni;
- campione C, costituito da 8 api morte (o fortemente debilitate), raccolte davanti l’arnia situata nei pressi del campo seminato, all’incirca 3 ore dalla fine della semina; tale campione è stato suddiviso in 2 sub-campioni;
- campione D, costituito da 20 api morte (o fortemente debilitate), raccolte davanti la stessa arnia circa 4 ore dopo la fine della semina; tale campione è stato suddiviso in 3 sub-campioni;
- campione E, costituito da 4 api morte raccolte il giorno seguente la semina, su uno strato di tessuto-non tessuto steso fra il percorso arnia-dispenser subito dopo la fine della semina;
- campione F, costituito da 11 api morte, raccolte il giorno seguente alla semina in prossimità del dispenser acqua-miele; anche tale campione è stato suddiviso in ulteriori 2 sub-campioni.

I campioni di api prelevate il giorno di semina sono stati portati subito in laboratorio per procedere all’estrazione delle possibili tracce di p.a. presente sulla superficie esterna del loro corpo. Tale operazione non è stata effettuata invece per i campioni di api raccolte il giorno seguente la semina. I risultati delle analisi effettuate sono riportati in tabella 3.22.

campione	Intervallo prelievo dalla semina	contenuto di Imidacloprid nella soluzione di lavaggio (espresso in ng/ape)	contenuto di Imidacloprid nel campione macinato (espresso in ng/ape)
- A -	Fine semina	3007	654
- B ₁ -	+ 2 ore	372	70
- B ₂ -	+ 2 ore	108	101
- C ₁ -	+ 3 ore	< LOD	247
- C ₂ -	+ 3 ore	< LOD	500
- D ₁ -	+ 4 ore	--	< LOD
- D ₂ -	+ 4 ore	--	50
- D ₃ -	+ 4 ore	--	53
- E -	+ 24 ore	--	29
- F ₁ -	+ 24 ore	--	< LOD
- F ₂ -	+ 24 ore	--	< LOD

Tabella 3.22 Concentrazioni di Imidacloprid espresse in ng/ape, rilevate sulla superficie corporea e all'interno di api intossicate in seguito alla semina del 15/10/09

Da entrambe le serie di analisi emerge che le api sono state effettivamente esposte a dosi molto elevate di p.a. (ben al di sopra delle rispettive DL₅₀ per contatto stimate in qualche decina di ng/ape).

È facilmente osservabile come il periodo entro il quale la morte sopraggiunge sia in stretta relazione con la concentrazione di insetticida rilevata nelle api, e quindi alla dose assunta, e come questa cali drasticamente nei campioni di api morte il giorno successivo la semina.

Un altro fenomeno osservabile è l'elevata dose di p.a. riscontrabile sulla superficie esterna di api intossicate subito dopo le semine, e la sua diminuzione in campioni prelevati successivamente. Tale andamento fa pensare in primo luogo a possibili meccanismi di perdita di polveri insetticide dalla superficie corporea, attraverso il distacco naturale di tali particelle con il volo, o per azioni di pulizia attiva dell'ape. In secondo luogo è ipotizzabile un qualche processo di penetrazione dei p.a. all'interno dei tessuti dell'ape, e conseguente metabolizzazione dell'insetticida, processo questo non ancora ben chiarito.

4 CONCLUSIONI

Nel corso del presente lavoro di tesi si è cercato di analizzare dal punto di vista quantitativo alcune vie di contaminazione dell'ambiente legate all'impiego di alcune molecole insetticide nella protezione delle sementi di mais utilizzate negli ultimi anni in agricoltura. Tale attività è infatti una delle principali accusate degli spopolamenti di alveari che si stanno registrando in diverse parti del mondo, fenomeno descritto come CCD (Colony Collapse Disorder).

I metodi d'analisi quantitativa per la ricerca di principi attivi insetticidi in matrici ambientali differenti sviluppati all'interno del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova, e basati sull'utilizzo della cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC), hanno permesso l'identificazione sicura delle molecole ricercate, anche a livelli di concentrazione di queste molto bassi.

La preventiva analisi del contenuto di principio attivo di concia all'interno dei diversi tipi di semi, ha rivelato la notevole difformità di dose di principio applicata a questi, rilevando inoltre contaminazioni dei semi con p.a. diversi da quello di concia, fenomeno probabilmente legato a contaminazioni nella fase di concia industriale delle sementi.

La successiva analisi di gocce di guttazione fogliare prodotte da piante di mais nate da sementi conciate, ha rivelato come queste contengano concentrazioni elevatissime di p.a. di concia, unitamente a tracce di contaminazione da altri principi attivi. Le guttazioni fogliari di piante conciate cresciute sia in serra che in campo, sono risultate costantemente al di sopra dei livelli di dose letale per le api, confermando l'ipotesi avanzata all'interno del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova, di un'effettiva via di contaminazione dell'ambiente, e quindi di intossicazione per le api, legata a tale fenomeno. Solo per sementi di mais conciate con il p.a. Fipronil non sono state rilevate concentrazioni letali di nessuna molecola all'interno delle guttazioni fogliari, fenomeno spiegabile alla luce dell'azione non sistemica di tale molecola.

Si è osservato come la concentrazione di insetticida all'interno delle guttazioni fogliari tenda a diminuire con l'avanzare dei giorni dall'emergenza della plantula, per poi riaumentare nelle ultime fasi di produzione di queste, per una contrazione dei volumi di acqua prodotti con tale fenomeno fisiologico.

Un ulteriore fonte di avvelenamento per api potrebbe essere costituita dall'acqua di guttazione che, dalle foglie, scivola verso il calice delle plantule, sito adatto per uno stoccaggio prolungato delle guttazioni prodotte. Una serie di analisi ha dimostrato come l'acqua stoccata

al calice possegga concentrazioni di p.a. più basse di quelle rilevate sulle gocce fogliari, pur restando costantemente al di sopra delle concentrazioni di p.a. letali per le api.

Esperimenti di semina di differenti tipi di mais conciato, effettuati in parcelle sperimentali con normali seminatrici pneumatiche, sono stati affiancati da una serie di monitoraggi volti a quantificare la produzione di polveri contenenti gli insetticidi di concia, a causa della disgregazione della pellicola insetticida ricoprente i semi durante l'attività di semina.

Tale dispersione è risultata di notevole entità, con perdita di una grossa frazione di p.a. sotto forma di particelle di confettatura di grosse dimensioni. Il destino di queste particelle è la ricaduta al suolo entro i primi metri dall'area di semina. Un'altra frazione di p.a. viene invece dispersa come particelle di piccole dimensioni (anche al di sotto del micrometro) che rimangono a lungo in aria, e sono in grado quindi di veicolare le molecole insetticide anche ad elevate distanze dal campo di semina. La perdita di p.a. è risultata comunque minore con l'impiego di sementi conciate con nuove formulazioni, sviluppate nel corso del 2009 proprio per affrontare tale problema.

L'analisi di campioni di api ritrovate morte nei pressi dei relativi alveari, situati nelle vicinanze dei campi seminati, nei giorni di semina ed in quelli successivi, ha rivelato la presenza in tali campioni di concentrazioni molto elevate di insetticida. Le concentrazioni rilevate sulle api e la sintomatologia da loro evidenziata in seguito all'esposizione a tali molecole, costituisce un elemento di conferma sulla pericolosità di utilizzo di queste molecole anche per insetti non target, confermando il ruolo negativo che queste possono avere come agente causale del CCD.

In conclusione, si conferma come l'utilizzo nei campi di sementi conciate con p.a. insetticidi altamente tossici per le api presenti alcune criticità legate sia alla contaminazione dell'ambiente creata con l'attività diretta di semina e sia alla presenza di una fonte d'acqua altamente tossica per le api rappresentata dalle guttazioni fogliari del mais.

5 Bibliografia

APENET. Servizio della Rete Rurale Naturale. 2009. *Scheda APENET: Monitoraggio e ricerca in apicoltura*. <http://www.reterurale.it/api>

Crailsheim, K., R. Brodschneider, and P. Neumann. 2009. *The COLOSS Puzzle. Filling in the gaps*. In "Proceedings of the 4th Coloss Conference – Prevention of honeybee COLony LOSSes". 46-47 Zagreb (Croatia), 3-4 march 2009.

Elbert, A., M. Haas, B. Springer, W. Thielert, and R. Nauen. 2008. *Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection*. *Pest Manag. Sci.* 64: 1099-1110.

Girolami, V., L. Mazzon, A. Squartini, N. Mori, M. Marzaro, A. Di Bernardo, M. Greatti, C. Giorio and A. Tapparo. 2009. *Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees*. *J. Econ. Entomol.* 102(5): 1808-1815

Greatti, M., A. G. Sabatini, R. Barbattini, S. Rossi, and A. Stravisi. 2003. *Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing*. Preliminary results. *Bull. Insectol.* 56: 69-72.

Greatti, M., R. Barbattini, A. Stravisi, A. G. Sabatini, and S. Rossi. 2006. *Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho dressed seeds*. *Bull. Insectol.* 59: 99-103.

Kühnholz, S., and T. D. Seeley. 1997. *The control of water collection in honey bee colonies*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 41: 407-422.

Muccinelli M. 2006. *Prontuario degli agrofarmaci*. Bologna: Il Sole 24 ORE Edagricole.

Rancan, M., S. Rossi, and A. G. Sabatini. 2006. *Determination of thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor*. *J. Chromatogr. A* 1123: 60-65.

Schnier, H.F., G. Wenig, F. Laubert, V. Simon, and R. Schmuck. 2003. *Honey bee safety of imidacloprid corn seed treatment*. *Bull. Insectol.* 56: 73-75

Shawki, M.A.-A., D. Titera, J. Kazda, J. Kohoutkova, and V. Taborsky. 2005. *Toxicity to honeybees of water guttation and dew collected from winter rape treated with Nurelle D registered*. *Plant Prot. Sci.* 42: 9-14.

Singh, S. B., G. D. Foster, and S. U. Khan. 2004. *Microwaveassisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 105-109.

Todisco, A. 2008. *Introduzione*. In *Atti del Workshop Sindrome dello spopolamento degli alveari*. Ed. V. Bellucci, 7. Roma, 29 gennaio 2008.

Visscher, P. K., K. Crailsheim, and G. Sherman. 1996. *How do honey bees (Apis mellifera) fuel their water foraging flights?* J. Insect Physiol. 42: 1089-1094.

Ying, G. G., and R. S. Kookana. 2004. *Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam in soil and water by high performance liquid chromatography with diode-array detection.* J. Environ. Sci. Health B 39: 737-746.

Zhou, Q., Y. Ding, and J. Xiao. 2006. *Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to highperformance liquid chromatography.* Anal. Bioanal. Chem. 385: 1520-1525.

6 Ringraziamenti

Un doveroso grazie va al Prof. Tapparo per l'aiuto continuo e la disponibilità dimostratami nel lavoro, al Prof. Girolami per l'appoggio e per gli stimoli e idee sempre forniti, a Chiara per il supporto tecnico, a Matteo per la bella collaborazione ed i lavori condivisi.

Un altro grazie va poi a tutto il Personale del dipartimento di Chimica con cui ho trascorso questi ultimi mesi di lavoro: il Prof. Marton, Lidia, Daniele, Fabio, Giorgio.

Il più grosso grazie va però alla mia famiglia, in particolare ad i miei genitori, alla loro continua fiducia, questa tesi è loro.

Un grossissimo grazie va a tutti gli amici con cui ho condiviso questi anni, per il loro supporto, i bei momenti passati e l'amicizia che ci lega: tutti i ragazzi dell'O.M.G. ed in particolare ai miei congruppini, i coinquilini di tutte le case che ho abitato (...) ma soprattutto ai coinquilini di Villa Morgagni con cui ho passato il più bello ed intenso periodo della mia Università, i ragazzi del mitico STAM perché con loro ho condiviso praticamente tutto di questa esperienza.

Infine un grazie va a tutti i ragazzi dell'associazione Sagittaria, ai miei compagni Manuel e Valeria, e all'amico apicoltore Mario.