



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

TITOLO

INFLUENZA DI CONDIZIONI AMBIENTALI E
MODALITA' DI SOMMINISTRAZIONE SULLA DL₅₀
DI INSETTICIDI SISTEMICI IN *Apis mellifera L.*

Relatore
Prof. *Vincenzo Girolami*

Correlatore
Dott. *Matteo Marzaro*

Laureando:
Thomas Bottacini
Matricola n. 618894

ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012

*Aguzza qui, lettor, ben li occhi al vero,
ché 'l velo è ora ben tanto sottile,
certo che 'l trapassar dentro è leggero*

*Dante, Divina Commedia
Canto VII Purgatorio*

INDICE

1. INTRODUZIONE	11
1.1. <i>Apis mellifera</i> nella storia	11
1.2. Utilità e valore economico	14
1.3. Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari	15
1.4. Teorie sulla moria delle api	17
1.5. La concia delle sementi	20
1.6. Principi attivi utilizzati nella concia e difesa del Mais	21
1.6.1. CHLORPYRIFOS	22
1.6.2. CLOTHIANIDIN	23
1.6.3. DIMETOATO	25
1.6.4. FIPRONIL	26
1.6.5. DELTAMETRINA	28
1.6.6. IMIDACLOPRID	29
1.6.7. THIAMETHOXAM	31
1.7. Sistemi normativi che regolano l'uso dei concianti a livello italiano, europeo e mondiale	34
1.8. Impolveramento in volo dell'ape	40
1.8.1. Funzionamento seminatrice	40
1.8.2. Teorie	41
1.9. Scopo della tesi	42
2. MATERIALI E METODI	44
2.1. Materiali e strumenti	44
2.2. Procedura di sperimentazione	45
2.2.1. Condizioni ambientali	47
2.2.2. Prove tossicologiche per determinare la DL ₅₀	49

3. RISULTATI	50
3.1. Analisi metodo di somministrazione	50
3.2. Influenza della temperatura e dell'umidità sulla mortalità	52
3.2.1. Influenza della temperatura	52
3.2.2. Influenza dell'umidità	57
3.2.3. Prove con pretrattamento umidità	60
3.2.4. Prove con pretrattamento temperatura	61
3.3. Differenze di mortalità tra l'utilizzo della gabbia e della gabbia sul vaso	62
3.4. Prove tossicologiche per la determinazione della DL ₅₀	64
3.4.1. CHLORPYRIFOS	64
3.4.2. CLOTHIANIDIN	67
3.4.3. DIMETOATO	70
3.4.4. FIPRONIL	73
3.4.5. DELTAMETRINA	76
3.4.6. IMIDACLOPRID	79
3.4.7. THIAMETHOXAM	82
4. CONCLUSIONI	85
5. BIBLIOGRAFIA	91

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni abbiamo assistito ad un repentino calo delle colonie di api in tutto il mondo, provocando danni sostenuti agli apicoltori e all'agricoltura in generale. Questo fenomeno ha raggiunto un'incidenza tale da portare alcuni stati dell'Unione Europea e dell'America, a stanziare fondi per studiare meglio il problema. L'Italia attualmente è impegnata in prima linea nella ricerca e sullo studio degli effetti che implicano le polveri rilasciate dalla seminatrice alla semina del mais, contenenti insetticida utilizzato per la concia del seme. I governi di tutto il mondo sono intervenuti per limitare l'utilizzo dei concianti in attesa di risposte certe sugli effetti che provocano sulle api. Lo studio qui si sofferma non solo sui principi attivi concianti, neonicotinoidi, ma anche su prodotti utilizzati in agricoltura per trattamenti aerei alla vegetazione quali fosfororganici, piretroidi e fenipirazoli, valutati in soluzione alcolica e idroalcolica.

I dati sulle DL₅₀ hanno mostrato che il neonicotinoide più tossico è il Thiamethoxam con una DL₅₀ di 30 ng/ape in soluzione alcolica, ma il p.a. con la tossicità più alta si è dimostrato essere il Fipronil con una DL₅₀ di soli 8 ng/ape. Per il neonicotinoide più tossico, gli studi sull'influenza delle condizioni ambientali hanno portato ad escludere l'incidenza dell'umidità sulla mortalità ma hanno lasciato uno spiraglio sull'incidenza della temperatura. In modo particolare le basse temperature, 20°C, hanno mostrato una mortalità superiore di circa 15% rispetto ad una temperatura di 30°C. Ciò non si è verificato, invece, per le api poste in ambienti differenti quali la gabbia e il vaso col cotico erboso; a dimostrare che l'ape non trova maggior giovamento nell'ambiente di campo.

PAROLE CHIAVE: concia, api, condizioni ambientali, DL₅₀

ABSTRACT

In recent decades we have witnessed a sharp decline in bee colonies around the world, causing damage incurred to beekeepers and agriculture in general. This phenomenon has achieved a margin in order to bring some EU member states and America, to allocate funds to study the problem better. Italy is currently at the forefront of research and the study of the effects involving the dust released from the seed sowing of maize, containing insecticide used for the tanning of the seed. Governments around the world have intervened to limit the use of tanning waiting for responses that cause certain effects on bees. The present study focuses not only on the active tanning, neonicotinoids, but also on products used in agriculture air treatment vegetation such organophosphorus, pyrethroids and fenipirazoli, evaluated in an alcohol solution and hydroalcoholic solution.

The data on LD₅₀ showed that the neonicotinoid Thiamethoxam is the more toxic with an LD₅₀ of 30 ng / bee in alcoholic solution, but the a.s. with the highest toxicity has proved to be the Fipronil with an LD₅₀ of only 8 ng / bee. For the neonicotinoid more toxic, studies on the influence of environmental conditions have led to excluding the effect of humidity on mortality but they left a small opening on the effects of temperature. In particular the low temperatures, 20 ° C, showed a higher mortality of about 15% compared to a temperature of 30 ° C. This did not occur, however, for the bees placed in different environments such as the cage and the vessel containing turf, to show that the bee has no greater benefit in the field.

KEY WORDS: tanning, bees, environmental conditions, LD₅₀

1. INTRODUZIONE

1.1. *Apis mellifera* nella storia

L'ape europea, *Apis mellifera* L., è l'ape più comunemente allevata dall'uomo al mondo. Ha una grande capacità di adattamento, con un areale nativo che si estendeva dalla parte meridionale della Scandinavia all'Asia Centrale e in tutta l'Africa (Seeley, 1985; Ruttner, 1988; Sheppard and Meixner, 2003). Dal 1600, *Apis mellifera*, si è estesa a tutte le zone abitate del mondo. La diffusione dell'ape europea è da attribuire ad un deliberato trasporto umano. Come il cane, l'ape aveva accompagnato l'uomo nella maggior parte delle sue grandi migrazioni, e alcuni dei primi coloni portarono con loro gli alveari alla scoperta di nuovi mondi. A differenza dei cani però, le api sono state importate dai coloni per la loro capacità di fare il miele e cera d'api. Il miele era il solo dolcificante disponibile nelle prime civiltà dell'Africa, dell'Europa e del Medio-Oriente e la richiesta del prodotto portò senz'altro alla domesticazione delle api nell'antico Egitto intorno al 2600 A.C. Nell'antico Egitto l'ape ebbe un significato solare; secondo un mito, quando Ra piangeva, le sue lacrime si trasformavano in api. A Sais il tempio del dio Neith era soprannominato "casa dell'ape". La pratica del mantenimento della api fu tramandata ai greci antichi (650 a.C), che a loro volta trasmisero l'arte ai Romani (150 a.C.) che la diffusero in tutto quello che sarebbe diventata l'Europa medievale.

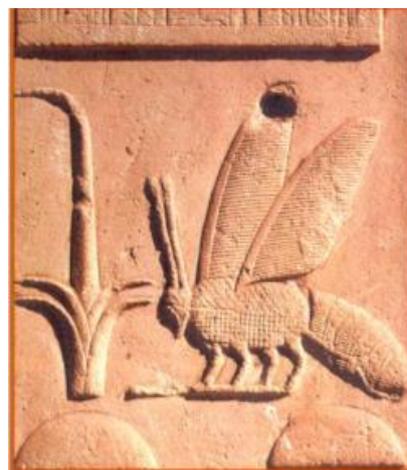


Figura 1.1 Rilievo egizio

Nella religione ellenica Zeus viene talvolta chiamato Melisseo (uomo-ape), perché da piccolo era stato nutrito dalle api di Creta, a cui aveva poi donato il colore aureo. L'ape era sacra anche ad Artemide nel suo ruolo di ninfa orgiastica e il piccolo insetto, in quanto simbolo di produttività, era identificato poi con la dea greca Demetra e con le romane Cerere e Opi. Anche dall'altro capo del mondo, secondo la religione indiana, Visnù, Krishna e Indra sono chiamati Madhava (nati dal nettare) e sono spesso raffigurati con un'ape posata su un fiore di loto, mentre Karma ha una corda dell'arco fatta di api.

Persino una religione monoteista come il cristianesimo adottò l'ape come simbolo: si narra che San Giovanni Crisostomo ("dalla bocca d'oro") fosse nato con uno sciame di api che gli volteggiava intorno alla bocca a simboleggiare la dolcezza della sua predicazione. L'ape contiene insomma, per gli antichi, il germe del divino. Virgilio nelle *Georgiche* dice che le api "hanno una parte della mente divina e il respiro dell'etere". Lo stesso poeta, nell'*Eneide*, ritorna sul tema e vi aggiunge l'immortalità dell'anima: paragona le api alle anime che volano presso il Lete, e il loro rapporto starebbe nella moltitudine e nel ronzio, oltre al fatto che entrambe volano. Porfirio, filosofo del III secolo, racconta che gli antichi chiamavano *melissas* le anime avviate alla nascita, ma solo quelle destinate a vivere con giustizia, e a ritornare là da dove provengono dopo aver fatto il volere degli dei.

Nell'*Ippolito* di Euripide, l'eroe offre ad Artemide una corona di fiori che proviene da un prato incontaminato, dove il pastore non osa pascolare il suo gregge e in cui solo l'ape può accedervi, in quanto luogo di grande purezza.

Le api erano quindi considerate innanzitutto caste. Virgilio stesso ci dice che esse non si abbandonano al congiungimento, non fiaccano i loro corpi nei piaceri di Venere, né generano con le doglie. Del resto, le donne ateniesi che partecipavano alle feste Tesmoforie assumevano il nome di *mélissai*: esse si astenevano per tre giorni da ogni contatto sessuale, digiunavano per un giorno e giacevano a terra su giacigli di agnocasto, pianta dal potere anafrodisiaco.

Messaggera tra i due amanti, l'ape rappresenta simbolicamente il legame di purezza e di fedeltà che deve stringerli l'uno all'altro: una volta infranto tale legame, è l'ape stessa che può svolgere il ruolo di punire il reo.

L'ape è stata considerata un animale contrario al lusso e alla mollezza fino a tempi recenti, per questo nel folclore tedesco il mettersi di fronte a un alveare costituiva una tipica prova di purezza per le giovani spose.

Dal codice amoroso si fa presto a passare al codice alimentare, e anche qui il comportamento deve essere irreprensibile: l'ape odia ogni forma di putrido, mai essa si poserà su un pezzo di carne, o là dove sia del sangue o del grasso. Inoltre l'ape tiene costantemente pulito l'alveare, trasportandone fuori gli escrementi, e sia Virgilio che

Plinio affermano che l'apicoltore deve allontanare da esso ogni fonte di cattivi odori e costruirlo lontano da latrine, letamai e bagni e, persino nell'avvicinarsi all'alveare, deve curare di essersi astenuto da ogni cibo forte o troppo saporoso.

Per molto tempo l'ape ha avuto una importante funzione economica, oltre che simbolica e magica; il miele è il primo dolcificante conosciuto dall'uomo. La prima attestazione dei rapporti tra l'ape e l'uomo riguarda proprio questo prezioso nettare e risale addirittura al neolitico (9.000 anni fa circa): si tratta di una grotta in Spagna, Cueva de la Araña, sulle cui pareti è raffigurato un nido di api e un cacciatore di miele.

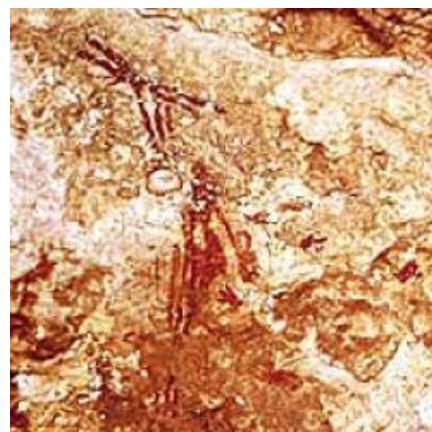


Figura 1.2 Cueva de la Araña, una grotta in Spagna

Anticamente si pensava che il miele, cibo divino donato dagli dei all'uomo, derivasse da un pulviscolo con proprietà magiche che vagava nell'aria, e che venisse raccolto direttamente dai fiori su cui cadeva. Virgilio lo chiamava "dono della rugiada". Per questo era usato nei riti di propiziazione e magia, soprattutto in quelli legati alla prosperità, alla fertilità e all'amore, e nei riti di purificazione, spesso usato con il latte. Era offerto agli dèi a titolo di ringraziamento, per consacrare preti e sacerdotesse, per benedire i templi e scacciare spiriti maligni.

Il miele era presente nei più importanti riti di passaggio della vita: nascita, matrimonio e morte. Quando nasceva un nuovo bambino gli veniva offerto miele per dargli il benvenuto, garantirgli buona salute e allontanare i demoni. Nelle cerimonie nuziali il miele era offerto in dono come cibo e lo si spalmava sulla soglia di casa della nuova coppia. Da questa usanza ancora oggi persiste il modo di dire "luna di miele". (C. Pecoraro).

1.2 Utilità e valore economico

Il più importante contributo che le api danno all'agricoltura moderna sta nell'impollinazione; 52 dei 115 principali prodotti alimentari a livello mondiale dipendono dall'impollinazione mediata dalle api per la produzione di frutti e semi. Alcuni prodotti, dipendenti dalle api, potrebbero avere una riduzione superiore al 90% della resa in assenza di esse (Klein et al., 2007). In aggiunta, i rendimenti in termini di dimensione, quantità o qualità verrebbero enormemente ridotte (40-90%) in 16 produzioni, modestamente

ridotte (10-40%)

in ulteriori 19

produzioni e

lievemente

ridotte (<10%) in

altre 13 (Klein et

al., 2007). In

totale, 22,6% di

tutte le

produzioni

agricole nei paesi

in via di sviluppo e il 14,7% nei paesi sviluppati dipendono direttamente dall'impollinazione entomofila (Aizen et al., 2008). Globalmente, il valore dell'impollinazione entomofila è stato stimato negli Stati Uniti in 212 miliardi di \$, il quale rappresenta circa il 9,5% del valore totale delle produzioni agricole. Per quanto riguarda l'Europa e il Nord America, il valore è molto simile attestandosi attorno ai 20 miliardi \$ (19,8 EU25; 20,1 US) (Gallai et al., 2009).

Oltre al loro elevato valore economico è di fondamentale importanza sottolineare anche il loro valore ecologico. Senza le api molti frutti, semi e verdure non sarebbero più disponibili in quantità sufficienti per il consumo umano e anche molti degli habitat naturali oggi esistenti sarebbero irrimediabilmente compromessi e vi sarebbe quindi una conseguente diminuzione anche della disponibilità di cibo per gli animali selvatici. Circa i



Figura 1.3 ape su fiore bianco di Prunus

tre quarti delle piante con fiore, infatti, necessitano dell'impollinazione animale e direttamente o indirettamente circa un terzo di tutto ciò che mangiamo ha a che fare con l'impollinazione delle sole api. Questi dati sono suffragati da rapporti della FAO che stimano in poco più di 100 le specie di colture che provvedono al 90% della produzione totale del cibo nel mondo, 71 delle quali vengono impollinate per mezzo di api (selvatiche e non). In Europa l'84% delle 264 colture più importanti sono impollinate da animali e 4000 specie di vegetali sopravvivono solo grazie all'impollinazione effettuata dalle api. La capacità impollinatrice delle api è molto elevata se si pensa che ogni singola ape visita mediamente 700 fiori al giorno e, se si tiene conto che in un alveare ci sono all'incirca 20.000 api bottinatrici, si può facilmente vedere che ogni giorno per un raggio di circa tre km dall'arnia le api di un alveare sono in grado di impollinare circa 14 milioni di fiori.

L'impollinazione entomofila non è tutta a carico delle api anche se rimangono gli impollinatori più importanti per la maggior parte delle colture del mondo (McGregor, 1976; Delaplane and Mayer, 2000).

1.3 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 (Vanengelsdrop et al. 2007; Vanengelsdrop et al. 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:

- improvvisa scomparsa delle api adulte della colonia e presenza di poche api rimaste in prossimità della colonia stessa;
- presenza di molti favi con covata opercolata non alterata con bassi livelli di infestazione da varroa;
- 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;
- la bassa presenza rispetto alla norma di *Aethina Thumida* (una tarma della cera);
- la presenza della regina che depone le uova circondata da un ristretto gruppo di giovani nutrici.

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.

1.4 Teorie sulla moria delle api

Negli ultimi decenni il patrimonio europeo e americano delle api è stato sottoposto a pesanti e improvvisi perdite (Potts et al., 2010). In Europa le colonie sono diminuite da oltre 22,5 milioni nel 1990 a circa 15,7 milioni nel 2010. In Italia siamo passati da 1 milione di colonie nel 1990 a esattamente la metà (500 mila) nel 2010 (FAO, 2012). Negli Stati Uniti le colonie sono diminuite dai 3,2 milioni del 1990 ai 2,6 milioni del 2012.

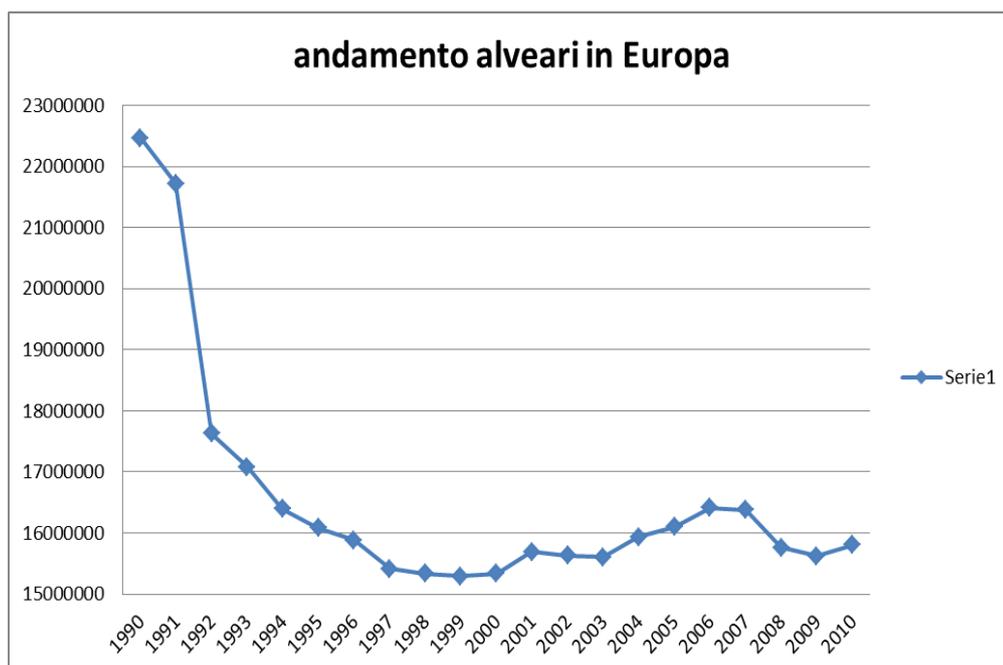


Grafico 1.1 andamento alveari in Europa 1990-2010 (dati FAO 2012)

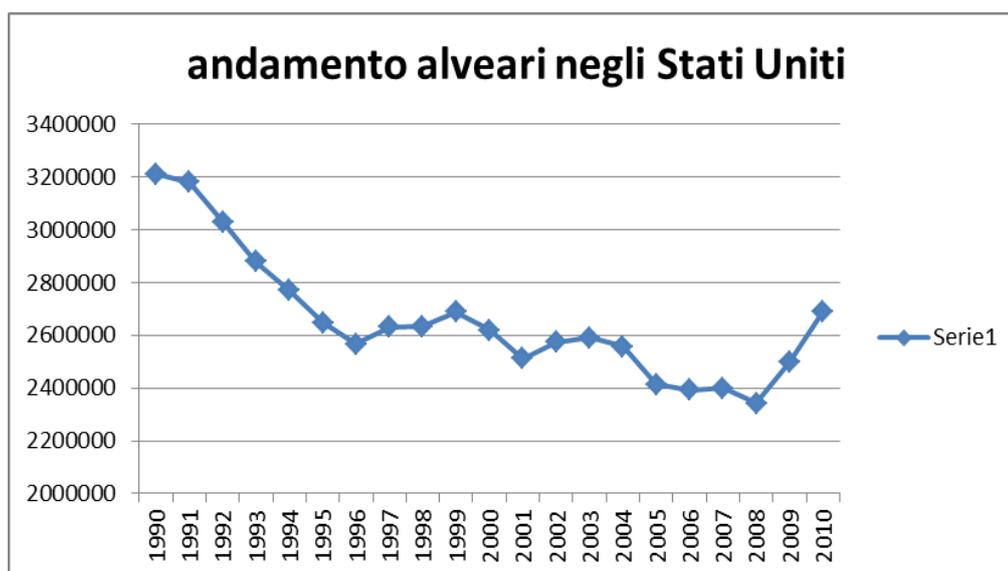


Grafico 1.2 andamento alveari negli Stati Uniti 1990-2010 (dati FAO)

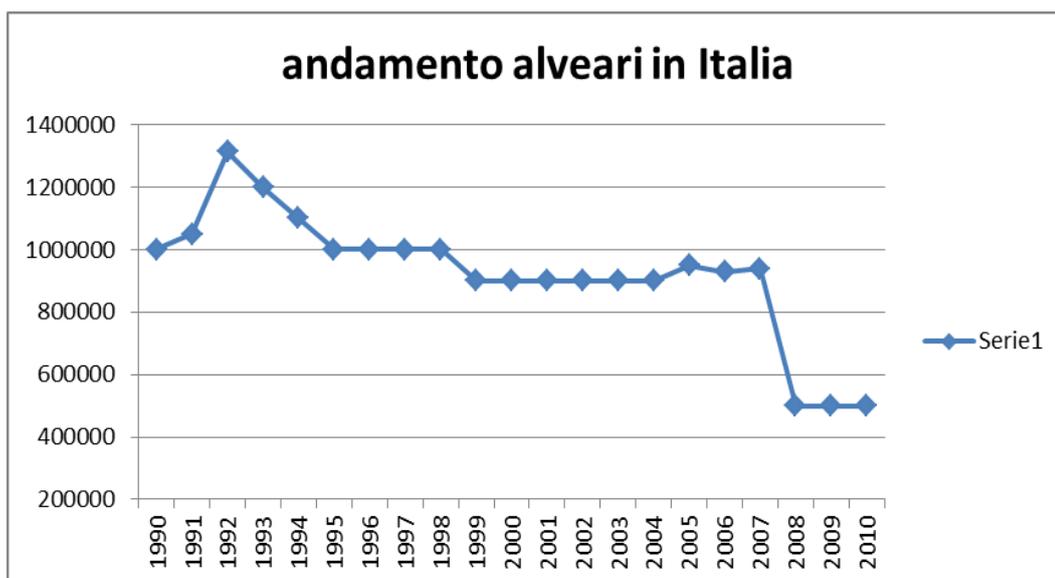


Grafico 1.3 andamento alveari in Italia 1990-2010 (dati FAO 2012)

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". Guttazione (dal latino "gutta": cadere) è la formazione di gocce di succo xilematico sulle punte o lungo i bordi delle foglie. È un fenomeno fisiologico che si verifica in molte piante vascolari, in particolare le erbe, l'acqua che entra nelle radici crea una leggera pressione che la costringe a salire ed essere eliminate attraverso il tessuto secretorio ai margini fogliari. Si tratta di un evento normale in molte

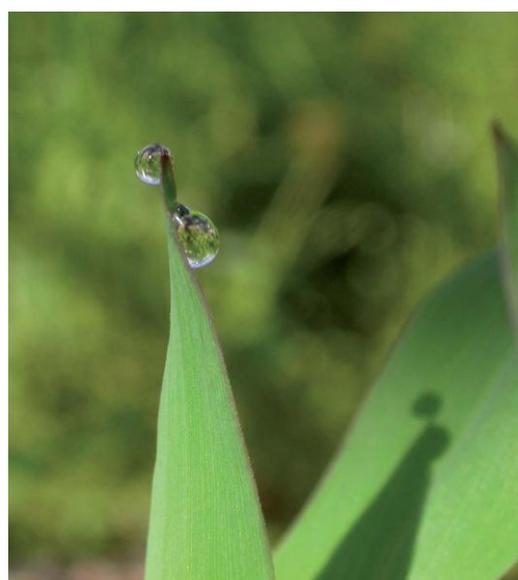


Figura 1.4 gocce di guttazione di mais

piante e non è limitato alla notte, sebbene la chiusura degli stomi al buio può portare ad una maggiore pressione interna che aumenta i volumi della goccia di guttazione, accrescendo così la visibilità del fenomeno (Goatley e Lewis 1966, Koulman et al. 2007). Le guttazioni spesso passano inosservate, in quanto facilmente confuse con gocce di rugiada caratterizzate dalla condensazione di piccole gocce di umidità atmosferica. La goccia di guttazione può scivolare, evaporare o può essere risucchiata nella foglia. 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 dimostrato come tali gocce di guttazione, somministrate ad un campione di api, contengano concentrazioni di principi attivi per loro letali (Girolami et al. 2009), ma i fenomeni di morte improvvisa che si sono verificati durante la semina non possono essere spiegati dalla guttazione che appare, dopo germinazione, almeno una settimana dopo la semina.

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).

1.5 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



Figura 1.5 seme di mais conciato

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 conce, 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).

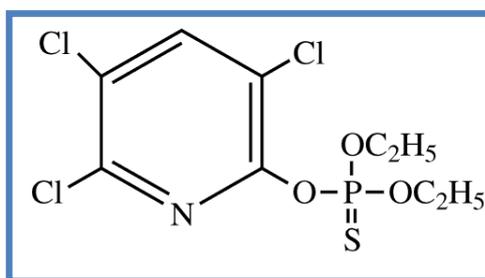
1.6 Principi attivi utilizzati nella concia e difesa del Mais

Qui di seguito si riportano le principali caratteristiche chimico-fisiche dei principi attivi insetticidi utilizzati per la concia e difesa del mais e studiati in questo lavoro. Si elencano anche le modalità di impiego e la tossicità.

1.6.1 CHLORPYRIFOS

Nome comune (ISO)	CHLORPYRIFOS
Chemical name (IUPAC)	O,O-diethyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
Classe chimica	Esteri fosforici – Tionofosfati
Purezza minima (g/kg)	970
Formula molecolare	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Peso molecolare	350.6 g/mol

Formula strutturale



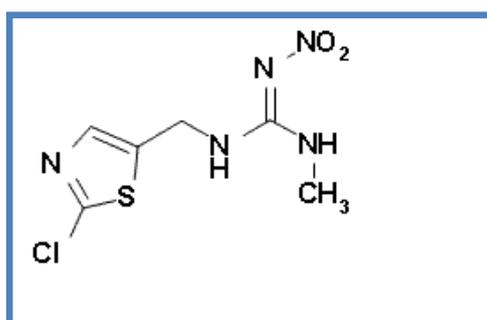
Punto di fusione	41-42 °C (purezza 97-99 %)
Punto di ebollizione	Si decompone prima dell'ebollizione. Decomposizione termica a 170-180 °C
Densità relativa	1.51 (98.1 %)
Pressione di vapore	3.35 · 10 ⁻³ Pa a 25 °C (99.8 %) 1.43 · 10 ⁻³ Pa a 20 °C (99.8%)
Solubilità in acqua	1.05 mg/l a 20 °C
Stabilità idrolitica(DT ₅₀)	pH ≤ 7: 72 d (25 °C) pH 9: 16 d (25 °C)
Costante di dissociazione	Chlorpyrifos non contiene protoni ionizzabili
Tossicità acuta	
Rat LD ₅₀ oral:	66-195 mg/kg bw (T-R25)
Rat LD ₅₀ dermal:	1250-2000 mg/kg bw (Xn-R21)
Rat LC ₅₀ inhalation:	> 1.0 mg/l (whole-body)

Modalità d'azione:	è un insetticida che agisce per contatto, ingestione ed inalazione, su insetti adulti e stadi giovanili tramite l'inibizione della colinesterasi. interferisce sul sistema nervoso a livello delle sinapsi colinergiche, con inibizione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi
Insetti controllati:	cocciniglie, carpocapsa, tortricidi ricamatori, sesia, aleurodidi, dialeurodidi, formiche, cidia del pesco, mosca della frutta, ciptorrinco, altica, atomaria, cimici, piralide, dorifora, tripidi, nottue, elateridi, grillotalpa, larve di ditteri
Modalità d'applicazione:	Nella distribuzione al terreno persiste per due o tre mesi e non trasmette odori o sapori sgradevoli alle parti eduli delle colture

1.6.2 CLOTHIANIDIN

Nome comune (ISO)	CLOTHIANIDIN
Chemical name (IUPAC)	(E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine
Classe chimica	Neonicotinoide – tianicotinili
Purezza minima	960 g/kg
Formula molecolare	$C_8H_{10}ClN_5O_2S$
Peso molecolare	249.7 g/mol

Formula strutturale



Punto di fusione	176.8 °C (99.7%)
Punto di ebollizione	Decompono prima dell'ebollizione
Densità relativa	D420 = 1.61 (99.7%)

Pressione di vapore	$3.8 \cdot 10^{-11}$ Pa a 20 °C
Solubilità in acqua	pH 10: 0.340 g/L a 20 °C
Stabilità idrolitica (DT ₅₀)	pH 4 : stabile at 50 °C pH 7 : stabile at 50 °C pH 9 : 1401 d a 20 °C
Costante di dissociazione	pKa = 11.09
Tossicità acuta	
Rat LD ₅₀ oral:	500 mg/kg bw < LD50 < 2000 mg/kg bw
Rat LD ₅₀ dermal:	>2000 mg/Kg coniglio LD50 dermal: >2000 mg/kg b.w./d
Rat LC ₅₀ inhalation:	>5.54 mg/l aria

Modalità d'azione:

È un insetticida sistemico, attivo per contatto ed ingestione. La molecola si fissa in modo permanente ai recettori neonicotinici dell'acetilcolina, provocando movimenti scoordinati, tremori, paralisi e infine la morte dell'insetto.

Insetti controllati:

Nottue, diabrotica, elateridi, afidi, cicaline

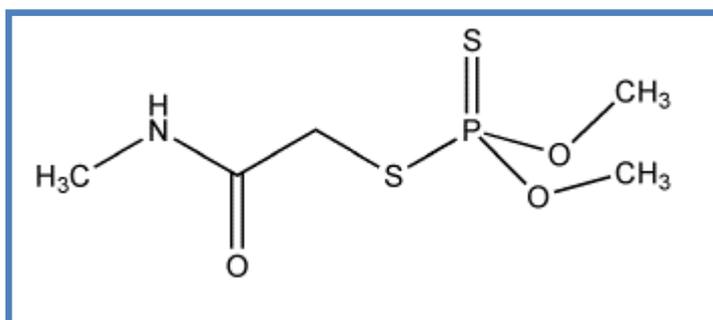
Modalità di applicazione:

Il prodotto ricopre uniformemente il seme e si distribuisce nel terreno circostante creando una barriera protettiva in grado di controllare gli insetti del terreno ed il danno da essi causato. Viene poi rapidamente assorbito da tutto l'apparato radicale del mais e attraverso una rapida veicolazione in senso acropeto si distribuisce uniformemente nella giovane pianta ed in tutti i suoi organi in accrescimento, mantenendo una concentrazione efficace di sostanza attiva. Garantisce quindi la protezione della radice, del colletto e anche della parte aerea.

1.6.3 DIMETOATO

Common name (ISO)	DIMETHOATE
Chemical name (IUPAC)	<i>O,O</i> -Dimethyl- <i>S</i> -(<i>N</i> -methylcarbamoylmethyl) phosphorodithioate; 2-Dimethoxy-phosphinothioylthio- <i>N</i> -methylacetamide
Classe chimica	Fosfororganico – ditiofosfati
Purezza minima	950 g/kg
Formula molecolare	$C_5H_{12}NO_3PS_2$
Peso molecolare	229,3 g/mol

Formula strutturale



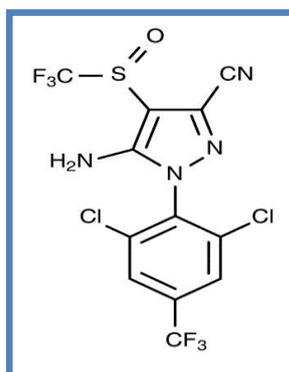
Punto di fusione	45 - 49 °C
Punto di ebollizione	Decompono prima dell'ebollizione
Densità relativa	1.3 g/cm ³ , solido
Pressione di vapore	2.466 · 10 ⁻⁴ Pa a 25 °C
Solubilità in acqua	pH 7: 23,3 g/L a 25 °C
Stabilità idrolitica (DT ₅₀)	68 pH sensitive: 156 giorni a pH 5, 4.4 giorni a pH 9, tutti a 25 degC
Costante di dissociazione	Non disponibile
Tossicità acuta	
Rat LD ₅₀ oral:	387 mg/kg
Rat LD ₅₀ dermal:	>2000 mg/Kg

Modalità d'azione:	È un insetticida che agisce per contatto e per ingestione caratterizzato da una elevata azione citotropica. Interferisce sul sistema nervoso a livello delle sinapsi colinergiche, con inibizione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi.
Insetti controllati:	Mosca dell'olivo, mosca delle ciliegie, tignola delle olive, afidi, tripidi, aleurodidi
Modalità d'applicazione:	Penetra con facilità all'interno dei tessuti vegetali trattati (mesocarpo dei frutti, mesofillo delle foglie...) e si trasferisce entro certi limiti, per via sistemica, anche nei tessuti non trattati compensando così, in breve tempo, eventuali deficienze di deposito insetticida. Grazie alla rapidità con la quale penetra nei tessuti vegetali evita di danneggiare gli insetti utili e sfugge al dilavamento della pioggia, dopo alcune ore dall'irrorazione.

1.6.4 FIPRONIL

Nome comune (ISO)	FIPRONIL
Chemical name (IUPAC)	(±)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-paratolyl)-4-trifluoromethylsulfinyl-pyrazole-3-carbonitrile
Classe chimica	Azotorganico – fenilpirazolo
Purezza minima	950 g/kg
Formula molecolare	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$
Peso molecolare	437.15 g/mol

Formula strutturale



Punto di fusione	203 °C
Punto di ebollizione	510.1 °C

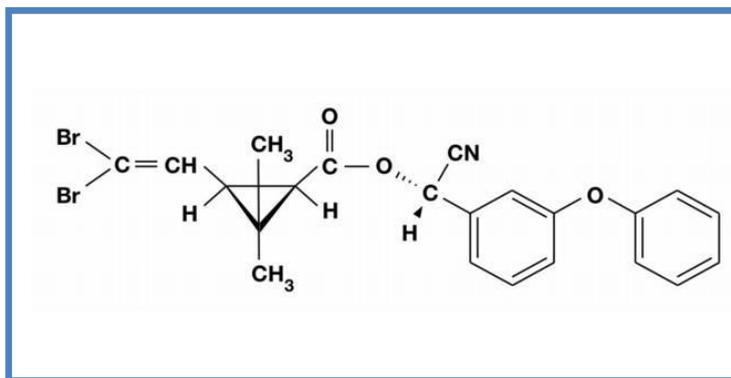
Densità relativa	1.48-1.63 g/cm ³ (20 °C)
Pressione di vapore	2,702 · 10 ⁻⁷ Pa a 25 °C
Solubilità in acqua	pH 5: 1,9 mg/L a 20 °C pH 7: 3 mg/l a 25 °C pH 9: 2.2 mg/l a 20 °C
Stabilità idrolitica (DT ₅₀)	a pH 9 circa 28 giorni
Costante di dissociazione	Non determinabile a causa della bassa solubilità in acqua
Tossicità acuta	
Rat LD ₅₀ oral:	66 - 74 mg/Kg
Rat LD ₅₀ dermal:	>2000 mg/Kg
Rat LC ₅₀ inhalation:	0.98 mg/L

Meccanismo d'azione:	È un geodisinfestante attivo per contatto ed ingestione contro insetti ad apparato boccale masticatore e pungente succhiante. Svolge un'azione neurotossica irreversibile, non anticolinesterasica. A livello sinaptico si ha il bloccaggio del canale degli ioni Cl ⁻ regolato dall'acido gamma-aminobutirrico (GABA).
Insetti controllati:	Larve di insetti terricoli quali elateridi, atomaria, tipule, diabrotica; fitofagi epigei quali altica, nottue, dorifora, cleono. Attivo su ceppi di insetti resistenti a piretroidi, carbammati, fosfororganici e clororganici.
Modalità d'applicazione:	Viene utilizzato con distribuzione sia a pieno campo che localizzata, con incorporamento nel terreno del prodotto. È un prodotto non residuale a lungo termine, con una persistenza d'azione adeguata a proteggere le colture trattate. Inoltre, evidenzia una elevatissima selettività nei confronti della piantine all'emergenza.

1.6.5 DELTAMETRINA

Nome comune (ISO)	DELTAMETHRIN
Chemical name (IUPAC) (S)-_cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate	(S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate
Classe chimica	Piretroide
Purezza minima	980 g/kg (technical grade)
Molecular formula C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Peso molecolare	505,2 g/mol

Formula strutturale



Punto di fusione	100-102 °C (373-375 K)
Punto di ebollizione	Decomponere prima di raggiungere il punto di ebollizione
Densità relativa	0.550 g/cm ³ (densità apparente)
Pressione di vapore	1.24 · 10 ⁻⁸ Pa, 25 °C
Solubilità in acqua	0.0002 mg/l, 25 °C; solubilità non pH dipendente (determinata a pH 7.49 -7.85) < 0.005 mg/l, 20 °C con il metodo della eluizione su colonna, pH 6.2
Stabilità idrolitica (DT ₅₀)	pH 5, 7: trascurabile (25 °C) pH 9: 2.5 giorni (valore medio) (25 °C)
Costante di dissociazione	Non dissocia
Tossicità acuta	
Rat LD ₅₀ oral	87 mg/kg bw
Rat LD ₅₀ dermal:	>2000 mg/kg bw

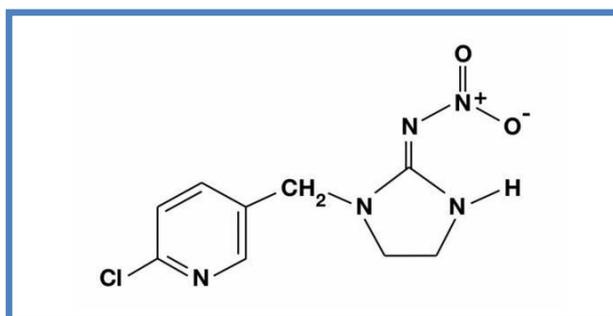
Rat LC ₅₀ inhalation	0.6 mg/l (6 ore corpo interamente esposto, aerosol di particelle in polvere).
---------------------------------	---

Meccanismo d'azione:	È un piretroide che agisce per contatto e ingestione, con un'azione rapida e duratura. Interferisce sul sistema nervoso, principalmente a livello della trasmissione assonale dell'impulso nervoso.
Insetti controllati:	Psilla, afidi, cocciniglie, tignole, mosche, carpocapsa, cidia, anarsia, tentrenidi, tripidi, aleurodidi, antonomo, maggiolino, piralide, diabrotica, nottue, cicaline, cleono, altiche.
Modalità d'applicazione:	Utilizzato per la disinfestazione dei cereali in granello immagazzinati. nei trattamenti alla vegetazione i migliori risultati si ottengono con interventi precoci, prima che l'insetto da combattere penetri nel vegetale o provochi accartocciamenti fogliari.

1.6.6 IMIDACLOPRID

Nome comune (ISO)	IMIDACLOPRID
Chemical name (IUPAC)	<i>(E)-1-(6-Chloro-3-pyridinylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2- Ylideneamine</i>
Classe chimica	Neonicotinoide – cloronicotinile
Purezza minima	970 g/kg
Formula molecolare	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Peso molecolare	255.7 g/mol

Formula strutturale



Punto di fusione	144 °C
Punto di ebollizione	Non misurabile
Densità relativa	1.54 g/cm ³
Pressione di vapore	4 · 10 ⁻¹⁰ Pa a 20 °C 9 · 10 ⁻¹⁰ Pa a 25 °C
Solubilità in acqua	0.61 g/l at 20 °C Solubilità non influenzata dal pH nell'intervallo di pH 4 - 9.
Stabilità idrolitica (DT ₅₀)	Imidacloprid è risultato stabile con un'emivita > 1 anno a pH 5 e 7. Lenta idrolisi con un'emivita di circa 1 anno a pH 9
Costante di dissociazione	Non si può determinare in acqua
Tossicità acuta	
Rat LD ₅₀ oral	424 mg/kg bw (m) 450 mg/kg bw (f)
Rat LD ₅₀ dermal:	>5000 mg/kg bw
Rat LC ₅₀ inhalation	>5323 mg/m ³

Meccanismo d'azione:

È un insetticida sistemico che agisce a livello del sistema nervoso fissandosi in modo permanente ai recettori nicotinici dell'acetilcolina. Funziona pertanto come antagonista dell'acetilcolina bloccando i recettori nicotinici quindi il passaggio degli impulsi nervosi, con conseguente morte degli insetti.

Insetti controllati

Fitofagi: afidi, aleurodidi, cicaline, microlepidotteri, psille, cocciniglie, cimicetta, fillossera, metcalfa, minatrice serpentina, tentrenidi, dorifora, altica; parassiti terricoli: elateridi, blaniuli, altica, tipula

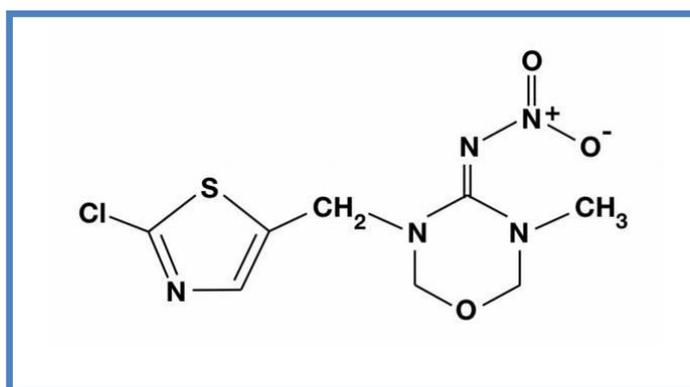
Modalità d'applicazione:

Presenta un'elevata sistemica acropeta; dopo l'applicazione viene traslocato nella pianta mediante la corrente xilematica e può dalle radici, attraverso il fusto, raggiungere le foglie. Viene costantemente veicolato dalle radici alle giovani foglie ed a quelle in corso di formazione, mantenendo una concentrazione sufficientemente elevata dell'insetticida. Oltre che dall'apparato radicale, viene assorbito anche attraverso la cuticola fogliare (citotropico e translaminare), ma la traslocazione dalla foglia trattata in altre parti della pianta è relativamente limitata, per cui con il trattamento fogliare la vegetazione formatasi successivamente al momento dell'applicazione non risulta protetta.

1.6.7 THIAMETHOXAM

Nome comune (ISO)	THIAMETHOXAM
Chemical name (IUPAC)	(E,Z)-3-(2-chloro-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-[1,3,5]oxadiazinan-4-ylidene-N-nitroamine
Classe chimica	Neonicotinoide – tianicotinile
Purezza minima	980 g/kg
Formula molecolare	$C_{10}H_{10}ClN_5O_3S$
Peso molecolare	291.7 g/mol

Formula molecolare



Punto di fusione	139.1°C (= 412.3 K) (Purezza: 99.7%)
Punto di ebollizione	La decomposizione termica inizia a circa 147 ° C (cioè prima che il punto di ebollizione venga raggiunto) (purezza: 99,3%)

Densità relativa	1.57 · 10 ³ kg / m ³ a 20 °C (Purezza: 99.7%)				
Pressione di vapore	2.7 · 10 ⁻⁹ Pa a 20 °C 6.6 · 10 ⁻⁹ Pa a 25 °C; da appropriate misurazioni tra 90,5 e 121,0 °C				
Solubilità in acqua	La solubilità in acqua pura è stata determinata essere: 4,1 g / l a 25 ° C Thiamethoxam non ha dissociazione nel campo pH 2 - 12, che significa che il pH non ha alcun effetto sulla solubilità in acqua del composto nel range di pH 4 – 10				
Stabilità idrolitica (DT ₅₀)	Ph	k (s ⁻¹)		DT ₅₀ (giorni)	
		Thia.	Guan	Thia.	Guan
	5	n.d.	n.d.		
	7	1.27 · 10 ⁻⁸	1.39 · 10 ⁻⁸	640	572
	9	9.53 · 10 ⁻⁷	1.94 · 10 ⁻⁶	8.4	4.2
Costante di dissociazione	Non dissocia nel range 2 - 12.				
Tossicità acuta					
Rat LD ₅₀ oral:	1563 mg/kg bw (Xn- R22)				
Rat LD ₅₀ dermal:	>2000 mg/kg bw				
Rat LC ₅₀ inhalation:	> 3.72 mg/l, 4 ore di esposizione, solo naso.				

Meccanismo d'azione:

È un insetticida sistemico che agisce per contatto e soprattutto per ingestione. Come tutti i neonicotinoidi agisce a livello del sistema nervoso fissandosi in modo permanente ai recettori nicotinici dell'acetilcolina. Funziona pertanto come antagonista dell'acetilcolina bloccando i recettori nicotinici quindi il passaggio degli impulsi nervosi, con conseguente morte degli insetti. In seguito all'assunzione del prodotto, gli insetti compiono movimenti scoordinati, manifestano tremori, paralisi e infine muoiono.

Insetti controllati:

Indicato per il controllo di numerosi insetti ad apparato boccale pungente-succhiante ed alcuni ad apparato boccale masticatore. Afidi, dorifora, aleurodidi, cicaline, minatrice serpentina, psille, insetti terricoli, pulce del tabacco. Risulta efficace contro tutti gli stadi di sviluppo degli insetti eccetto le uova.

Modalità d'applicazione:

Nelle applicazioni fogliari dopo l'assorbimento del prodotto da parte delle cere epicuticolari e dei tessuti parenchimatici, si localizza dapprima negli spazi intercellulari, poi penetra nelle cellule delle foglie attraverso la parete per sostare nel citoplasma. Manifesta attività translaminare e sistemica per via xilematica.

Nelle applicazioni al terreno viene efficientemente assorbito dalle radici e traslocato in tutti gli organi della pianta. I trattamenti al terreno eliminano le eventuali perdite per dilavamento e

1.7 Sistemi normativi che regolano l'utilizzo dei concianti a livello italiano, europeo e mondiale

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.

Visti gli innumerevoli fatti che hanno mostrato l'implicazione della semina di mais conciato con la moria delle api, lo Stato italiano e anche altri governi mondiali, hanno deciso di intervenire con dei decreti ministeriali per sospendere l'utilizzo dei prodotti concianti; non solo nel mais ma anche per colza, girasole e barbabietola da zucchero.

A livello italiano, il primo provvedimento preso per affrontare il problema della moria delle api risale al 17 settembre 2008, un decreto ministeriale 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, venivano precisati 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.

Al primo decreto emesso, come già scritto sopra, ne sono seguiti altri:

- Decreto 14 settembre 2009
- Decreto 16 settembre 2010
- Decreto 28 giugno 2011
- Decreto 25 ottobre 2011

fino ad arrivare all'ultimo decreto emesso il 25 giugno 2012 con validità sino al 31 gennaio 2013.

A livello europeo la situazione dei blocchi cautelativi si presenta eterogenea e differisce per ognuno dei singoli stati membri. Questo avviene perché la direttiva EU 91/414 sui prodotti per la protezione delle piante presenta un procedimento approvativo che prevede una autorizzazione autonoma da parte dei singoli stati per questi prodotti. Tale direttiva europea consta di due stadi: nel primo i principi attivi vengono accertati a livello europeo con un DAR (Draft Assessment Report), ossia una bozza di accertamento, per verificare la tossicità acuta e cronica e gli effetti sub letali su vari organismi. Tali studi ed accertamenti sono a carico dei produttori dei principi attivi stessi, senza alcuna supervisione da parte di un qualsivoglia ente di controllo. Una volta redatto il DAR, esso viene approvato dagli stati membri mediante un processo di revisione. Se la sostanza sottostà ai criteri di non avere un'inaccettabile influenza nell'ambiente, in particolare sugli organismi non target, essa viene inclusa nella lista positiva delle sostanze attive approvate che si trova nell'allegato I della direttiva 91/414.

Il secondo stadio di approvazione per questi fitofarmaci è quindi quello dell'approvazione della sostanza da parte dei singoli stati membri.

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.

Il 3 ottobre 2011 il Consiglio di Stato Francese ha accolto l'istanza dell'Union nationale de l'apiculture française contro la decisione di autorizzare il prodotto **CRUISER 350** nella concia del mais, annullando l'autorizzazione n° 2090190 del 15 dicembre 2009, sulla quale si era pronunciata anche l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire, la cosiddetta Efsa francese) il 15 ottobre 2010 proprio in merito all'impatto nei confronti delle api. Sulla base degli studi approfonditi presentati dal notificante, l'agenzia ha mitigato le

rigorosissime misure di gestione del rischio prescritte inizialmente, imponendo di riportare la seguente articolazione della frase SPe8 (raccomandazioni previste dalla direttiva 91/414 da riportare nell'etichetta di prodotti fitosanitari con criticità nei confronti delle api) (si riporta anche la frase originale francese che è la sola facente fede):

*“La phrase SPe8 pour la préparation CRUISER 350 est donc modifiée comme suit:
- SPe8 : Dangereux pour les abeilles. Ne pas introduire de culture de colza d’hiver ou de tournesol dans la rotation culturale et ne pas semer une culture mellifère montant en fleur comme culture de remplacement en cas de destruction précoce de la culture traitée avec la préparation CRUISER 350. Pour le maïs porte-graines mâle, pendant la période de floraison, éloigner les ruches à plus de 3 km de cultures de maïs provenant de semences traitées.”*

La frase SPe8 per la preparazione CRUISER 350 è dunque modificata come segue:
- SPe8: Pericoloso per gli api. Non introdurre colture di colza invernale o di girasole nella rotazione culturale e non seminare piante mellifere come cultura di sostituzione in caso di distruzione precoce della cultura trattata con la preparazione CRUISER 350. Per le piante portaseme maschile, per il periodo di fioritura, allontanare gli alveari a oltre 3 km dalle colture di mais che provengono da sementi trattate.

Ad oggi, 2012, in Francia non è consentito l'uso di Imidacloprid per la concia del seme di mais e girasole, ma è consentito il suo utilizzo per le altre colture e per trattamenti fogliari.

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. In seguito a verifiche, il governo tedesco ha abolito la normativa che vietava l'utilizzo dei neonicotinoidi, tranne per il Clothianidin che rimane sospeso nella concia del mais.

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.

Per quanto riguarda il resto del mondo diamo un'occhiata a quanto avviene in Brasile e Canada.

BRASILE:

è stato pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale (DOU) il Giovedì 19/07/2012 una dichiarazione di "IBAMA" (Istituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) di avviare il processo formale di revisione dei fitofarmaci associati con effetti negativi sulle api. Quattro principi attivi che compongono questi fitofarmaci saranno rivalutati: imidacloprid, thiamethoxam, clotianidin e fipronil. Il primo passaggio del processo riguarderà Imidacloprid, in quanto è il principio attivo più commercializzato di queste quattro sostanze. Solo nel 2010, sono state vendute 1934 tonnellate di Imidacloprid, circa il 60% delle vendite totali di questi quattro principi attivi. Questa iniziativa segue le linee guida della politica pubblica di IBAMA del Ministero dell'Ambiente (MMA) dedicate alla protezione degli impollinatori. La decisione di IBAMA si è basata sulla ricerca scientifica e le decisioni prese da altri paesi. Come misura precauzionale, IBAMA ha provvisoriamente vietato l'applicazione di fitofarmaci da parte a base di Imidacloprid, thiamethoxam, fipronil e clothianidin in ogni cultura. L'uso di fitofarmaci contenenti tali principi attivi attraverso l'applicazione aerea è stato collegato alla morte delle api in diverse parti del paese, che hanno portato al divieto.

Entro tre mesi le aziende produttrici di fitofarmaci devono includere un avvertimento al consumatore nel foglietto illustrativo nelle confezioni di prodotti contenenti una o più delle sostanze chimiche evidenziati nel decreto.

Si riporta la frase in lingua originale e tradotta:

"Este produto é tóxico para abelhas. A aplicação aérea NÃO É PERMITIDA. Não aplique este produto em época de floração, nem imediatamente antes do florescimento ou quando for observada visitação de abelhas na cultura. O descumprimento dessas determinações constitui crime ambiental, sujeito a penalidades."

"Questo prodotto è tossico per le api. L'applicazione aerea non è permessa. Non applicare il prodotto in tempo di fioritura, o immediatamente prima della fioritura o quando si osserva la presenza nella cultura delle api. Il fallimento di queste determinazioni è un crimine ambientale, oggetto di sanzioni ".

Secondo il coordinatore generale di controllo e di valutazione chimica della IBAMA, Marcio de Freitas, "le misure adottate dal IBAMA servono per proteggere questo importante ecosistema di impollinazione, che aumenta notevolmente la produttività agricola. Lo scopo del riesame è quello di contribuire per l'agricoltura e apicoltura in Brasile. "

CANADA:

Anche il **Pmra**, l'agenzia canadese per la valutazione degli agrofarmaci, ha notificato l'inizio della revisione dei neonicotinoidi (per ora Imidacloprid, Clothianidin e Thiamethoxam) per i loro effetti sugli impollinatori, sempre sull'onda dell'allarme scientifico internazionale. La revisione interesserà tutti gli impieghi autorizzati delle sostanze e probabilmente verranno richiesti studi volti a determinare con maggiore precisione l'influenza sulle api, sulla base anche di contatti con le altre autorità internazionali.

L'agenzia si è riservata anche di analizzare i dati di mortalità delle api provenienti dal Canada e dagli altri stati per eventualmente adottare precauzionalmente provvedimenti restrittivi.

1.8. Impolveramento in volo dell'ape

1.8.1. Funzionamento seminatrice

Nelle macchine seminatrici pneumatiche, il seme viene aspirato, provocando l'erosione dei frammenti del guscio insetticida che vengono espulsi con forza da una corrente di aria. Il funzionamento della seminatrice è piuttosto semplice: una vasca contenente le sementi è collegata per mezzo di una tramoggia ad un secondo contenitore di semi molto più piccolo e chiuso da un lato con un disco con un determinato numero di fori posti a circa un



Figura 1.6 particolare di una seminatrice: schema di rilascio del seme e tubo dell'aria in uscita (rappresentato dalla freccia)

centimetro dal suo bordo esterno. Sul lato opposto del disco, rispetto a quello dove sono presenti i semi, vi è un bocchettone collegato ad un aspiratore centrifugo che crea una depressione molto forte a livello dei fori del disco che vengono quindi riempiti da un seme ciascuno a mano a mano che il disco girando fa arrivare un foro non occupato nei pressi del serbatoio dei semi. I semi, una volta aspirati, rimangono attaccati al disco fino a che non si arriva in una zona della rotazione in cui non vi è più aspirazione; a questo punto i semi cadono per gravità all'interno dei solchi prodotti dalla macchina nel suolo e vengono poi ricoperti dalla terra da un successivo meccanismo. Essendo la pellicola di rivestimento del seme in cui sono contenuti i principi attivi insetticidi abbastanza delicata, tutti i passaggi che ne causano un movimento o uno strisciamento con delle superfici o tra seme e seme stesso sono causa di abrasione e di formazione di polveri. In particolare il caricamento dei semi all'interno dei serbatoi, i movimenti dei serbatoi dovuti agli scossoni e alle vibrazioni del trattore in movimento, il movimento della tramoggia di passaggio dei semi dal serbatoio principale a quello secondario più piccolo a contatto con il disco e la rotazione stessa del disco sono tutti causa di formazione di polveri per abrasione e sfregamento. Le polveri, una volta prodotte, vengono aspirate attraverso il sistema pneumatico e vengono quindi espulse all'esterno generando un flusso pressoché costante di polveri di concia nel tempo con conseguente immissione nell'aria di ingenti quantità di principio attivo.

1.8.2 Teorie

Lo scenario della morte di api al momento della semina del mais potrebbe essere collegato ai voli normali ripetuti delle api verso i fiori di campo come il tarassaco (*Taraxacum officinalis* L.), le colture erbacee come il colza invernale (*Brassica napus* L.) , alberi in fiore nei giardini, siepi e frutteti (*Prunus* spp., *Malus* spp., *Crataegus* spp., ecc.). In tali voli, c'è una probabilità che esse attraversino terreni assegnati per la semina del mais. Tenendo conto che una seminatrice richiede 45 minuti per la semina di un ettaro (ha), la probabilità di incontrare la nube tossica che circonda la seminatrice è alta. Quando le api volano vicino alla seminatrice ad una altezza di circa 2 m, vengono impolverate con una elevata quantità di insetticida con conseguenze letali quando l'umidità è alta. Le polveri sono state misurate ad altezze di 5 e 10 metri dalla seminatrice, mostrando una concentrazione notevole nell'aria, anche di particelle PM₁₀, caratterizzate da un'alta mobilità atmosferica e facilmente intercettate dalle api (Marzaro et al., 2011). Analisi chimiche hanno dimostrato la pericolosità e la mortalità indotta da queste concentrazioni di polveri nell'aria, mostrando le quantità di prodotto presente sull'addome dell'ape (Tapparo et al., 2011). Questi studi hanno dimostrato quanto sia letale per l'ape la contaminazione con le polveri di insetticida che fuoriesce dalla seminatrice, molto più della formulazione spray dello stesso prodotto. Nel nord d'Italia, in primavera, queste condizioni meteorologiche sono spesso presenti nelle prime ore di sole del mattino (Girolami et al., 2011). L'intenso impolveramento delle api in volo nel campo, può essere correlato alle caratteristiche del tegumento delle api, che è atto a raccogliere e trattenere pollini. Le api in volo possono essere particolarmente efficaci nell'intercettare il particolato, ma le zampe sono dotate di piccole spazzole che possono essere usate per pulirsi. Probabilmente le api possiedono un istinto igienico, anche riportato per varroa (Spivak e Reuter 1998), per liberare il tegumento da polvere indesiderata o frammenti, forse in volo, evitando così il rapido contatto dell'insetticida idrosolubile con il corpo, che permette alle api bottinatrici di sopravvivere in condizioni di asciutto.

1.9 Scopo della tesi

Obiettivo di questa tesi è quello di identificare la DL_{50} su api dei principi attivi precedentemente descritti:

- ✓ clorpirifos,
- ✓ dimetoato,
- ✓ imidacloprid,
- ✓ clotianidin,
- ✓ thiamethoxam,
- ✓ deltametrina,
- ✓ fipronil.

La DL_{50} , o dose letale mediana, è espressa in μg di principio attivo o prodotto formulato per insetto ed esprime la dose necessaria ad uccidere il 50% degli individui a cui è stata somministrata. Si sono analizzati parametri quali temperatura ed umidità e modalità di somministrazione del principio attivo.

Per modalità di somministrazione si intende il drogaggio della singola ape con soluzioni in alcool puro e acqua-alcool.

L'influenza che possono avere la temperatura, l'umidità e il tipo di ambiente (gabbia, vaso), sono state considerate per il solo Thiamethoxam.

Si valuta la tossicità di quelle molecole utilizzate per la concia del seme e difesa del mais, implicate con la moria delle api registrata negli ultimi anni in tutto il mondo.

Per i principi attivi utilizzati in questo lavoro, esiste già in letteratura una tossicità su ape ma qui intendiamo utilizzare un metodo, a nostro avviso, più preciso, eseguito con trattamento della singola ape, in grado di quantificare in modo dettagliato la DL_{50} .

Qui di seguito si riportano i dati della DL_{50} su *Apis mellifera L.*, trovati in letteratura, dei principi attivi in questione.

Principio attivo	DL ₅₀ orale	DL ₅₀ contatto
<i>Chlorpirifos</i> *	0.25 µg/ape	0.059 µg/ape
<i>Clothianidin</i> *	0.00379 µg a.s./ape	0.04426 µg a.s./ape
<i>Deltamethrin</i> *	79 ng/ape	(48ore): 1.5 ng/ape
<i>Thiamethoxam</i> *	0.005 µg a.s./ape	0.024 µg/ape
<i>Imidacloprid</i> *	0.0037 µg/ape	0.081 µg/ape
<p><i>Fipronil</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • University of Greenwich, FAO • Tingle et al., 2003 and Decourtye et al., 2002 • Hassini et al., 2005 	<p>0.004 µg/ape</p> <p>4 - 6.2 ng/ape</p> <p><5 ng/ape</p>	<p>0.00593 µg/ape</p>
<p><i>Dimethoate</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • I. TORNIER, A. KLING, A. SCHUR, 2003 • FAO (Stevenson, J.H. 1978) 	<p>0.10 - 0.16 µg/ape</p> <p>0.12 µg/ape</p>	<p>0.21 - 0.26 µg/ape</p> <p>0.15 µg/ape</p>

Tabella 1.1 tossicità acuta in *Apis Mellifera L.* dei p.a studiati

* EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL

2. MATERIALI E METODI

2.1. Materiali e strumenti

Siti di sperimentazione

Le prove si sono svolte all'interno del laboratorio della Facoltà di Agraria dell'Università di Padova nella sezione di entomologia, nel periodo da gennaio ad agosto 2012.

Insetti

Le api utilizzate per la sperimentazione sono state prelevate dagli alveari, presenti all'interno dell'azienda agraria della Facoltà di Agraria.

Le api venivano prelevate mediante l'utilizzo di gabbie (20cm x 20cm x 20cm) con struttura di sostegno in ferro e ricoperte con tulle, appoggiate al predellino dell'alveare con l'utilizzo di una calamita per consentire l'autosostegno della gabbia e permettere l'ingresso delle api che partivano dall'alveare per il bottinamento. Ciò permetteva la cattura di api sane ed a digiuno. La cattura avveniva il giorno stesso in cui veniva effettuata la sperimentazione onde evitare ulteriori parametri che potessero aumentare l'aleatorietà dei risultati.



Figura 2.7 alveari con gabbia sostenuta da calamita per la cattura delle api

2.2 Procedura di sperimentazione

Le api catturate e portate in laboratorio, venivano alimentate con del miele, costantemente a disposizione, posto sul tulle della gabbia; ciò allo scopo di non falsare i risultati delle prove con mortalità dovute alla mancanza di cibo.

Le prove sono state eseguite su singole api che venivano catturate singolarmente mediante l'utilizzo di un tubo in plastica con funzionamento ad aspirazione dell'aria, per poter prelevare una sola ape



alla volta dalla gabbia. Questo

Figura 2.8 particolare ape presa singolarmente mediante aspirazione dell'aria

ricoperta con una rete a maglie molto strette, per impedire il risucchio all'interno dello stesso dell'ape aspirata, permette di prenderla in qualsiasi punto del suo corpo; diverse prove ci hanno permesso di capire che la parte più adatta ai trattamenti risulta essere il torace.

Per il drogaggio dell'ape si sono utilizzate soluzioni, precedentemente preparate e conservate in frigorifero a temperatura di +2 °C. La quantità di prodotto utilizzata per il drogaggio viene presa



Figura 2.9 binoculare con ventola

con una pipetta Gilson o Eppendorf (0.5 - 10 μ l), in grado di somministrare all'ape una quantità di 2,5 μ l. Il drogaggio è stato effettuato al binoculare, questo per avere una maggiore precisione nella somministrazione della dose prefissata e per verificare il corretto assorbimento della stessa da parte dell'ape. L'installazione di una ventola a ridosso del binoculare (fig. 9) ha permesso una più rapida asciugatura del prodotto presente sull'addome dell'ape.

Una volta drogate, le api venivano poste in gabbiette di dimensioni 5cm, in grado di contenere ognuna 6 api. Ogni gabbietta veniva etichettata con il nome del prodotto utilizzato, la sua concentrazione e l'ora, così di permetterne il riconoscimento una volta finita la prova. Le gabbiette sono poste in contenitori in plastica



Figura 2.10 gabbietta piccola con etichetta

recanti al proprio interno una rete metallica in grado di tenere sospese le gabbiette dal fondo del contenitore ove veniva riposto uno strato di carta inumidita per le prove con umidità più elevata.

2.2.1. Condizioni ambientali

L'influenza delle condizioni ambientali sulla sopravvivenza dell'ape, sono state sviluppate solamente per il p.a. Thiamethoxam.

Per condizioni ambientali si intende l'influenza che esercitano la temperatura, l'umidità e i diversi ambienti in cui viene a trovarsi l'ape: prettamente di laboratorio come la gabbia e, più vicina alle condizioni reali, un vaso contenente un substrato erboso.

Prove temperatura

Le api sono state testate con principio attivo diluito in alcool (99.6%) e alcool + acqua (50% - 50%) a concentrazioni di 15, 30, 60 e 125 ng/ape; poste in ambiente controllato ad umidità relativa costante (80%) e temperature di 20°C e 30°C. Le api, poste in gabbie plurime da 6 api, sono state drogate con una dose di 2,5 µl e tenute sotto osservazione per 24 ore con costante disposizione di miele.

Prove umidità

Le api sono state testate con principio attivo diluito in alcool (99.6%) a concentrazioni di 15, 30, 60 e 125 ng/ape; poste in ambiente controllato a temperatura costante (30-33°C) e umidità relativa di 50-55% e 80%. Le api, poste in gabbie plurime da 6 api, sono state drogate con una dose di 2,5 µl e tenute sotto osservazione per 24 ore con costante disposizione di miele.

Le api testate con p.a. diluito in alcool + acqua (50% - 50%) a concentrazioni di 30, 60 e 125 ng/ape, sono state poste in ambiente controllato a temperature di 20°C, 25°C e 30°C e umidità relativa di 70% e 90%. Le api, poste in gabbie plurime da 6 api, sono state drogate con una dose di 2,5 µl e, in alcuni casi, con 5 µl e tenute sotto osservazione per 24 ore con costante disposizione di miele.

Prove in vaso-gabbia

Le prove in vaso consistono nel posizionare le api all'interno di un ambiente simile a quello che può essere il campo; un substrato di terreno con del cotico erboso (Bonsai di *Poa pratensis*) protetto da una rete a maglie strette per impedire alle api di poter scappare.

Si è operato ad una temperatura di 25°C e umidità relativa del 70% con una concentrazione del prodotto in alcool tale da somministrare con 2,5 µl 60 ng/ape. Lo stesso modo di operare si è adottato per la gabbia, allo scopo di notare se vi fossero differenze di mortalità nei due ambienti.

Prove con pretrattamento (umidità)

Le api vengono inizialmente trattate con 60 ng/ape Thiamethoxam diluito in alcool ad una temperatura costante di 25°C in diverse condizioni di umidità:

- Secco: U.R. 30% - 60%
- Umido: U.R. 75% - 90%

Dopo un tempo di 30 minuti le api, precedentemente poste in gabbiette plurime, vengono messe in ambienti a diversa umidità relativa; in ambiente umido o secco.

Otteniamo così quattro tipi di prove: secco-secco, secco-umido, umido-secco, umido-umido.

La stessa prova è stata effettuata anche con il vaso.

Prove con pretrattamento (temperatura)

Le api vengono inizialmente trattate con una dose di Thiamethoxam di 60 ng/ape in alcool ad una umidità costante del 60% e temperature di 20°C, 25°C e 30°C.

Dopo un tempo di 30 minuti le api, precedentemente poste in gabbiette plurime, vengono messe in ambienti a diversa temperatura: sempre con temperature di 20°C, 25°C e 30°C.

2.2.2. Prove tossicologiche per determinare la DL₅₀

Per valutare la DL₅₀ di ogni singolo principio attivo si è operato a temperatura di 30°C e umidità del 70%.

Le api, drogate singolarmente, hanno ricevuto una dose di 2,5 µl di prodotto a concentrazione prestabilita e diluito in alcool e acqua + alcool.

Ogni gabbietta aveva a costante disposizione il miele per tutto il perdurare della prova della durata di 24 ore. Per verificare il corretto svolgimento della prova, veniva fatto un testimone: una gabbietta contenente 6 api a cui veniva somministrato solo alcool.



Figura 2.11 contenitori con gabbiette per prove

3. RISULTATI

3.1. Analisi metodo di somministrazione

La tecnica somministrazione del principio attivo sull'ape ha subito, nel corso del tempo, delle modifiche che hanno portato a dei miglioramenti.

Inizialmente l'ape era drogata mediante una somministrazione di 5 μ l di prodotto sul torace. In seguito ad analisi chimica, si è visto che gran parte del prodotto veniva perso e non assorbito dall'ape con una alterazione dei dati ottenuti. Preso atto di questo scompenso, si è deciso di ridurre la quantità somministrata all'ape passando ai 2,5 μ l. Questa quantità risulta essere più conforme alle dimensioni dell'ape, permettendo una maggiore precisione e, allo stesso tempo, ha permesso di ottimizzare il rapporto tra la quantità somministrata e quella effettivamente ricevuta dall'ape.

Per migliorare ulteriormente la fase del drogaggio, abbiamo inserito nelle prove un colorante, il blu di metilene, che non entra in conflitto con il p.a. insetticida, quindi non altera i risultati delle prove. Con l'aiuto del colorante si poteva vedere se vi fossero delle perdite di prodotto dovute a vari motivi: aspirazione del tubo, sgocciolamento della pipetta, somministrazione in parti errate del corpo dell'ape. Questo ci ha permesso di ottimizzare la fase del drogaggio e non solo. Le api trattate con il colorante ci hanno permesso di capire che parte del prodotto viene perso dall'ape in quanto si ripulisce sul tulle della gabbietta, dovuto al mancato corretto asciugamento del prodotto. Siamo passati dalla somministrazione sull'addome a quella sul torace. Questa parte del corpo dell'ape risulta essere tomentosa, il che permette una maggior trattenuta del prodotto ed una maggiore difficoltà da parte dell'ape di sfregare la parte trattata sulla gabbia; l'addome, invece, risulta essere liscio e di più facile contatto con la gabbietta, tanto da causare ingenti perdite di prodotto.

Il drogaggio rappresenta la fase più importante all'interno della sperimentazione, in quanto un errore durante questa operazione, risulta deleterio e si ripercuote sui risultati, alterandoli.

Fondamentale la corretta asciugatura del prodotto presente sull'ape prima della sua immissione nella gabbia. Il fenomeno risulta molto rapido per le soluzioni in alcool assoluto, quasi istantaneo, e molto lento per le soluzioni idroalcoliche. Per velocizzare e aiutare l'asciugatura, abbiamo installato una ventola a bassa intensità nei pressi del binocolare, dal quale possiamo operare con maggiore precisione, ottimizzando, nel contempo, tempi e precisione.

La dose dimezzata e l'utilizzo del colorante, si sono rivelate delle armi vincenti per il buon esito delle prove. Notevoli sono stati i miglioramenti e la precisione che via via è andata definendosi nelle sperimentazioni grazie alle innovazioni apportate nel progetto. Ora la tecnica può definirsi assodata e valida.

3.2. Influenza della temperatura e dell'umidità sulla mortalità

La prova è stata effettuata per verificare la temperatura e l'umidità potessero influire in modo più o meno intenso sulla mortalità dell'ape trattata con Thiamethoxam.

3.2.1. Influenza della temperatura

La tesi è stata verificata ad umidità costante del 80% e temperature di 20°C e 30°C con prodotto diluito in alcool assoluto (vedi Tabella 2) e in una soluzione di acqua-alcool (v. Tabella 3).

Esprimendo i dati in un grafico in cui sono presenti due serie rappresentanti le due temperature citate (v. Grafico 4), possiamo avere una visione più immediata sulla differenza di mortalità nei due ambienti. Nonostante vi sia una lieve differenza, soprattutto con una dose molto bassa che sappiamo essere inferiore alla DL_{50} , possiamo dire che, almeno per quanto riguarda l'alcool assoluto, temperature di 20°C o 30°C ad una umidità del 80%, non incidono significativamente sulla mortalità dell'ape.

Per quanto riguarda, invece, la prova relativa al prodotto diluito in una soluzione di acqua e alcool, troviamo una lieve differenza tra le due temperature (v. Grafico 5). A temperatura più bassa, 20°C, la mortalità è superiore di circa un 10-15% e questa differenza va rimarcandosi all'aumentare della concentrazione.

Una buona differenza anche se non significativa la si può vedere tra le due soluzioni testate (v. Grafico 6 e 7); le api drogate con p.a. diluito in alcool assoluto, hanno mostrato una mortalità inferiore rispetto alle stesse drogate con p.a. diluito in soluzione idroalcolica (50% di acqua). In questo caso la differenza maggiore si è vista alla temperatura di 30°C.

Dai risultati di queste prove non siamo in grado di affermare con certezza che la temperatura riveste una certa influenza sulla mortalità dell'ape trattata, poiché l'intervallo fiduciale delle DL_{50} non è distinto. Non è tanto l'alta temperatura a ricoprire un ruolo fondamentale, anzi lo si può definire ininfluente e superficiale, ma bensì le basse temperature (<20°C) potrebbero essere dannose per l'ape drogata.

I dati sono relativi alla mortalità espressa in %.

THIAMETHOXAM (alcool)		
Concentrazioni (ng/ape)	80% - 30°C	80% - 20°C
15	12,5	50
30	52	61
60	77	69
125	94	100

Tabella 3.2 mortalità % ad umidità costante e temperatura variabile con p.a. diluito in alcool assoluto

THIAMETHOXAM (alcool + acqua)		
Concentrazioni (ng/ape)	80% - 30°C	80% - 20°C
15	16	16
30	19	33
60	28	43
125	66	88

Tabella 3.3 mortalità % ad umidità costante e temperatura variabile con p.a. diluito i alcool e acqua (50-50)

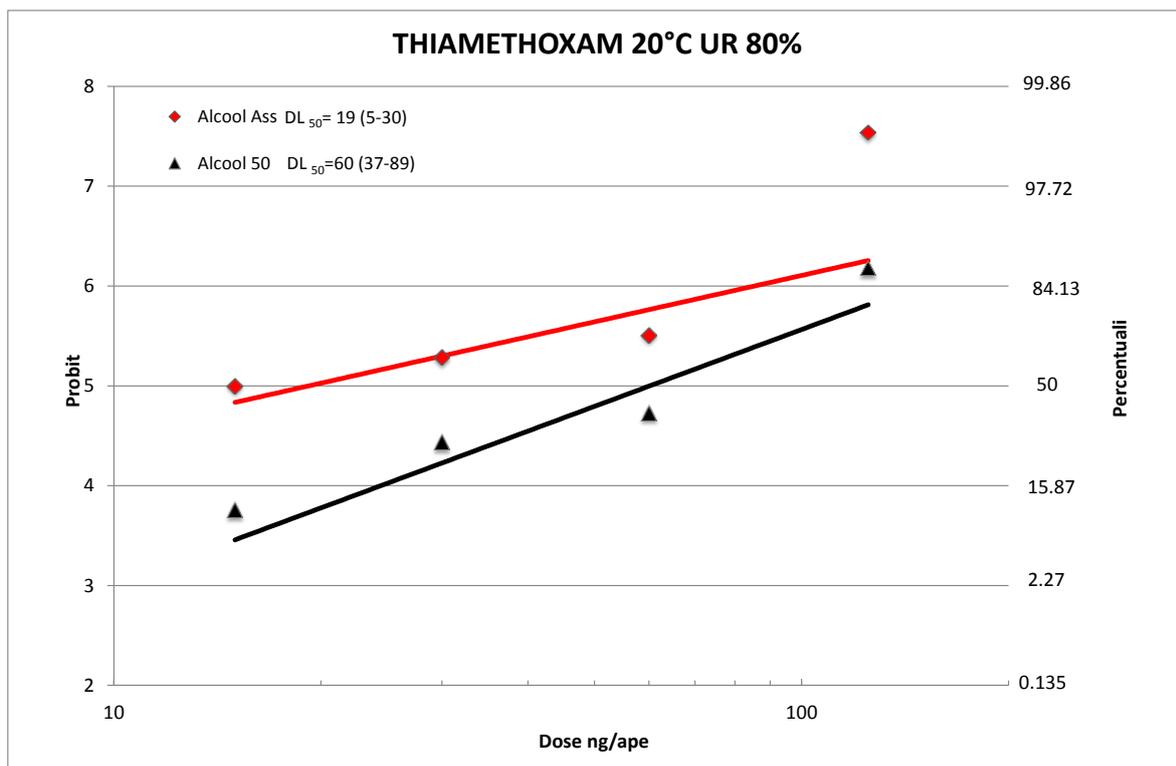


Grafico 3.4 probit p.a. Thiamethoxam con confronto tra soluzione in alcool assoluto e alcool 50% a temp. di 20°C e UR 80%

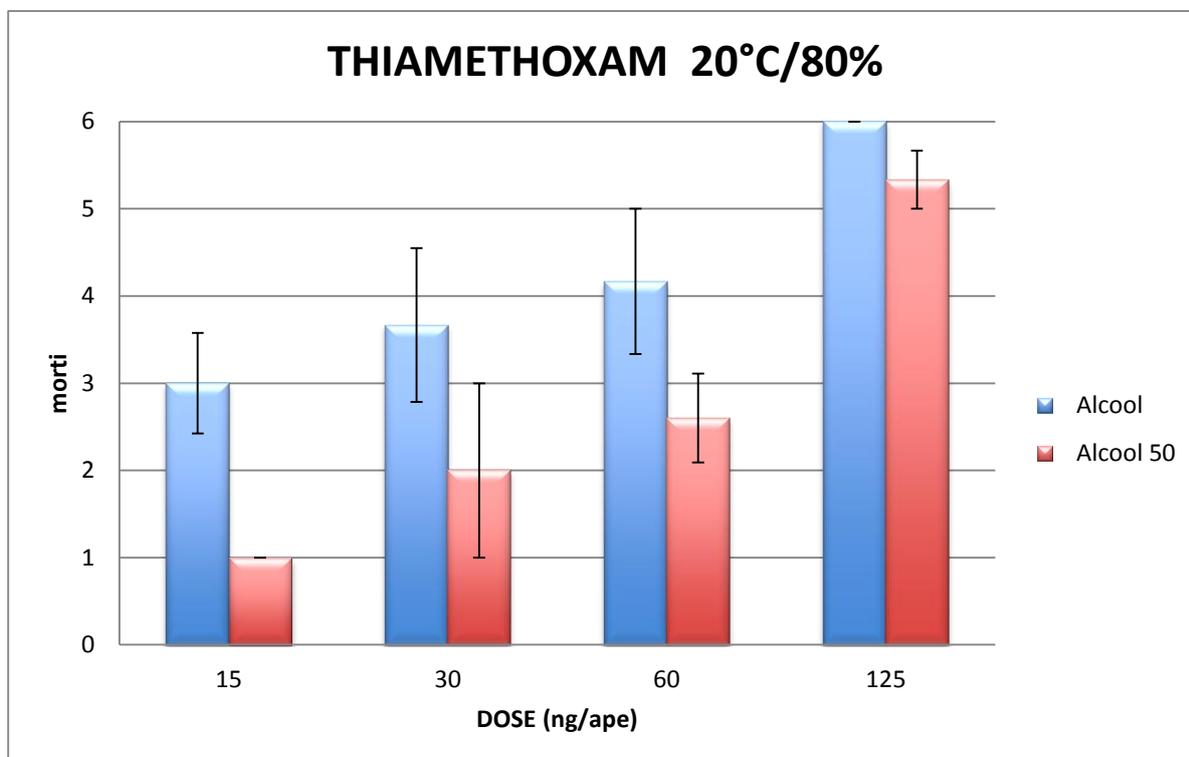


Grafico 3.5 confronto mortalità api con due diverse diluizioni del prodotto in riferimento alle tabelle 2 e 3

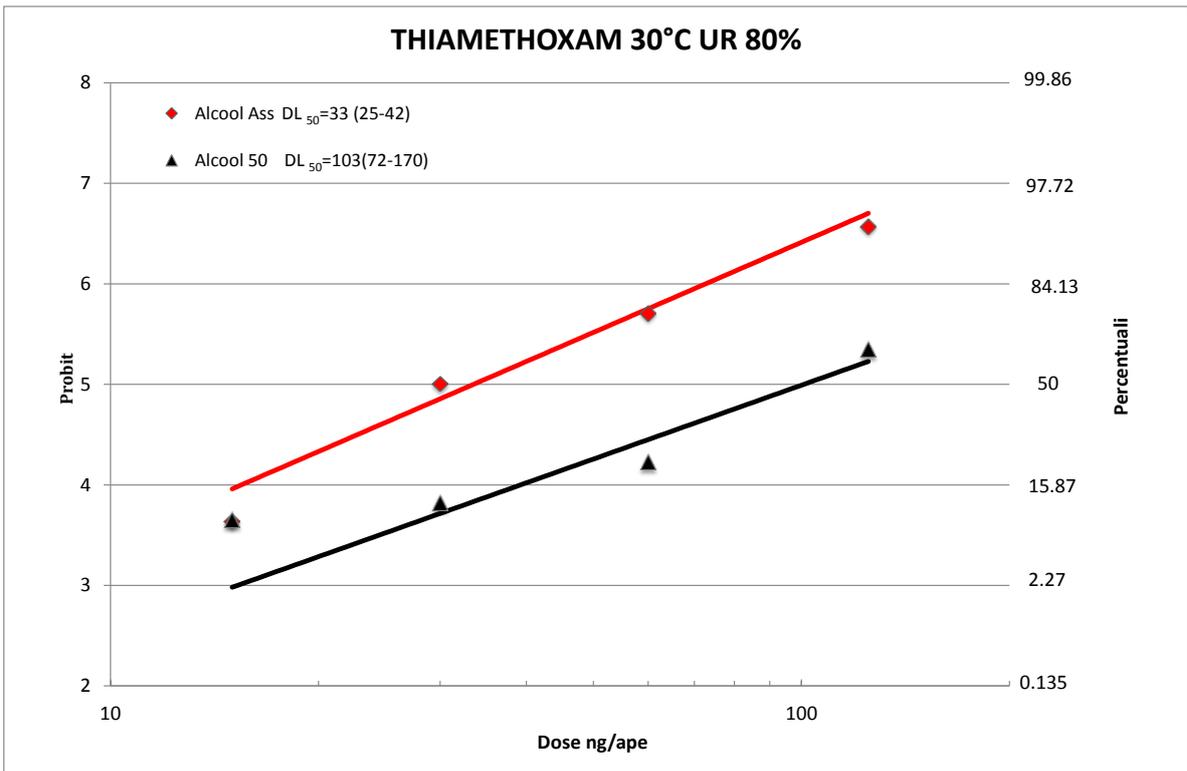


Grafico 3.6 probit p.a. Thiamethoxam con confronto tra soluzione in alcool assoluto e alcool 50% a temp. di 30°C e UR 80%

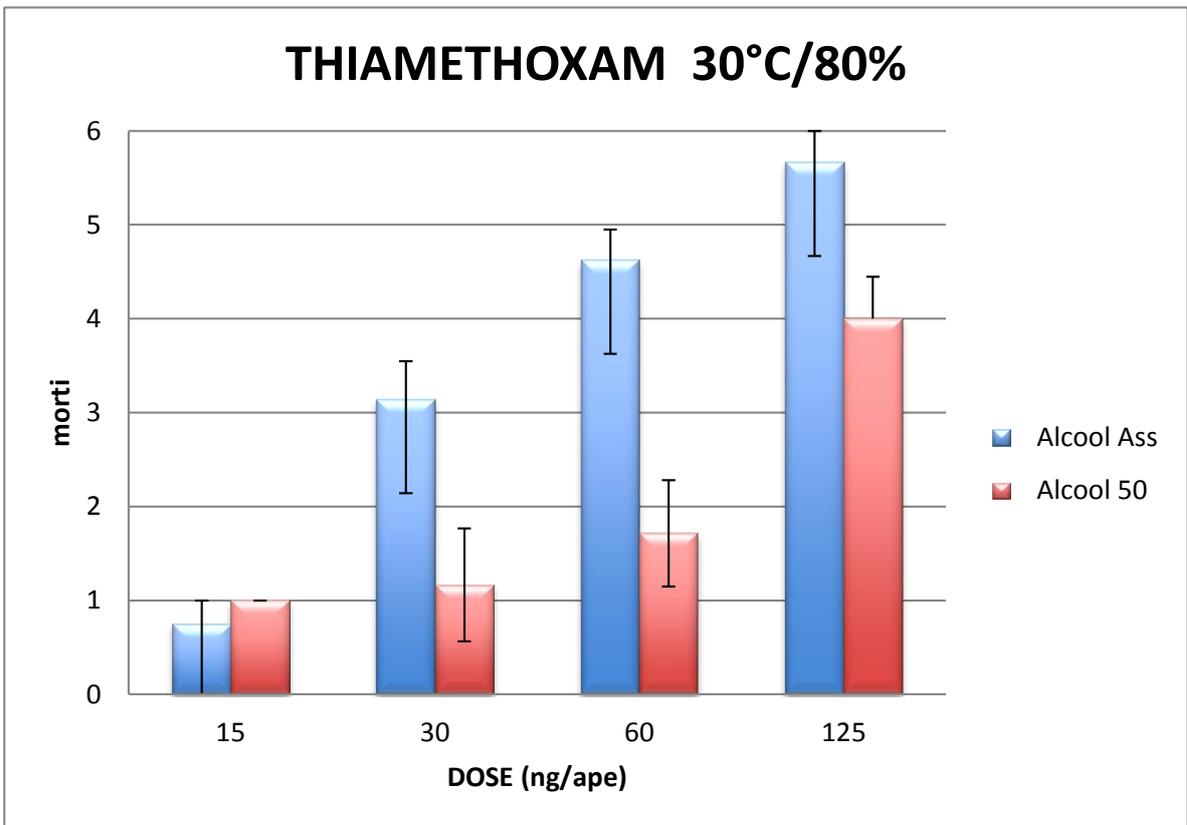


Grafico 3.7 confronto mortalità api con due diverse diluizioni del prodotto in riferimento alle tabelle 2 e 3

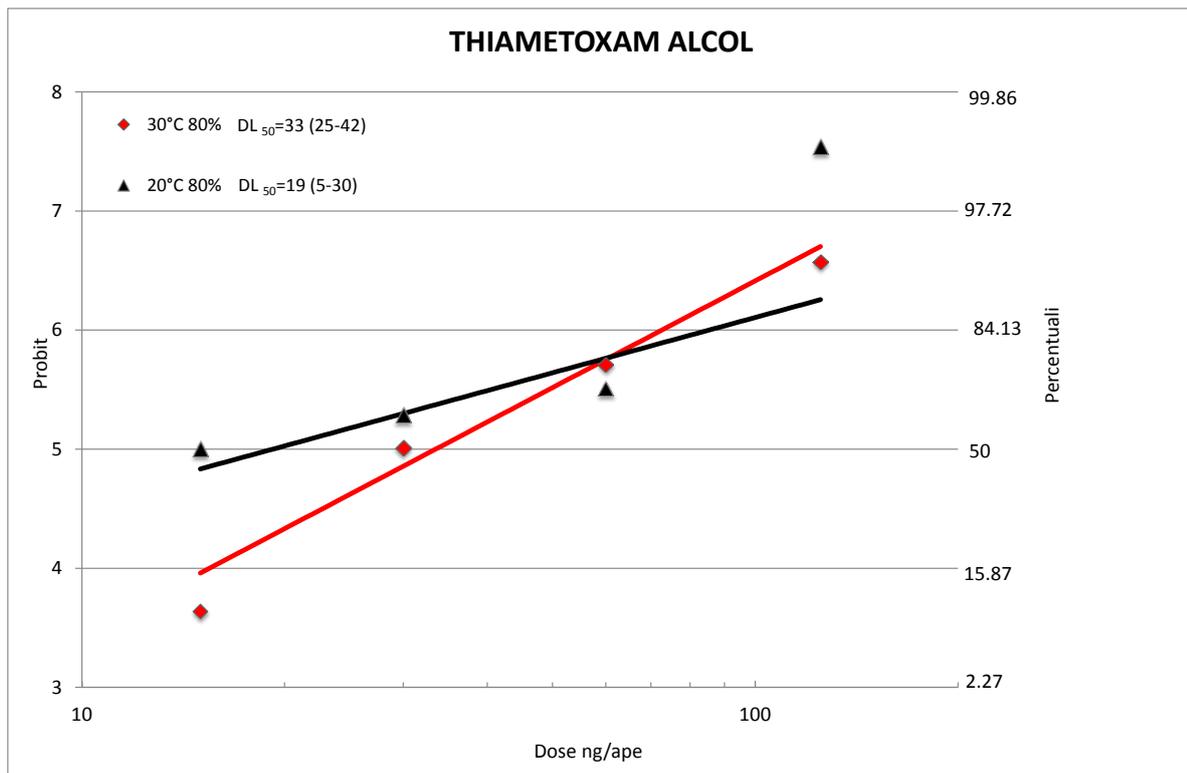


Grafico 3.8 probit Thiametoxam riferito alla Tabella 2

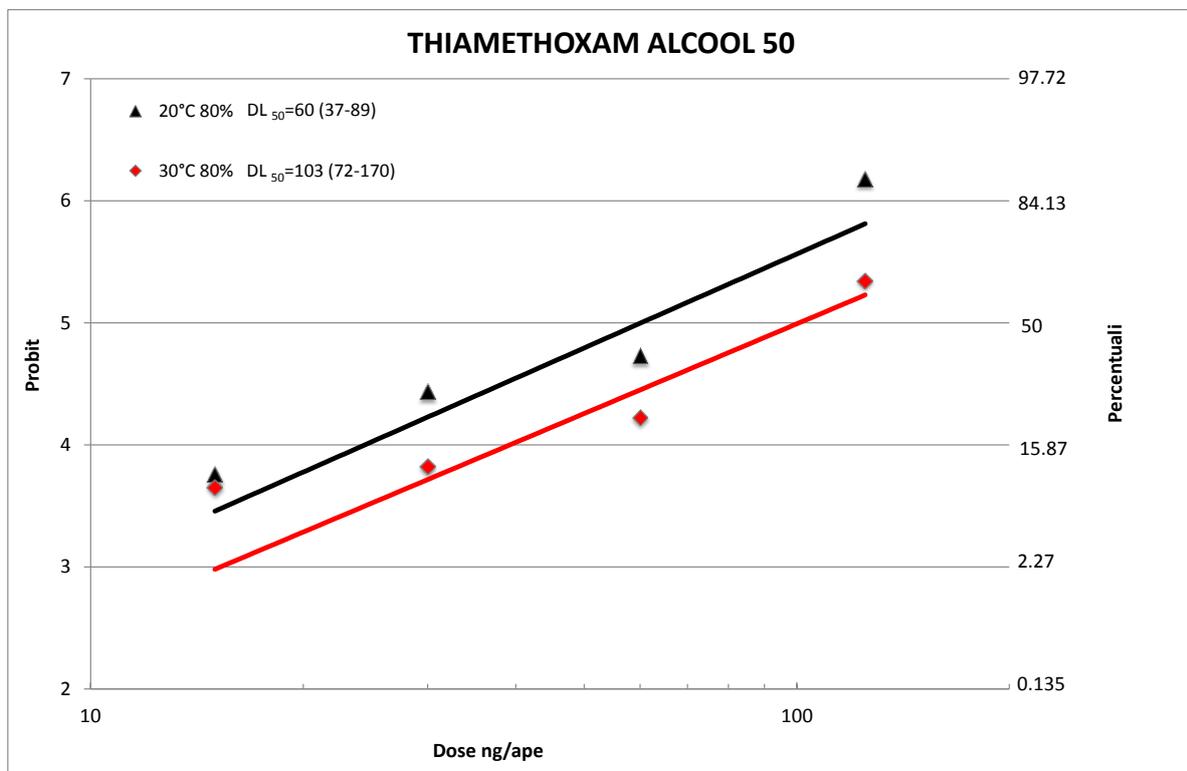


Grafico 3.9 probit p.a. Thiametoxam con confronto mortalità riferito alla Tabella 3

3.2.2. Influenza dell'umidità

La tesi è stata verificata per le umidità di 50%, 70%, 80% e 90%, sempre con soluzioni in alcool assoluto e acqua alcool.

La prima prova è stata sviluppata con p.a. diluito in alcool assoluto testando le api a trattate alle umidità di 50-55% e 80%. Per quanto riguarda la sperimentazione all'umidità del 50%, è stata utilizzata solamente la soluzione con una concentrazione di 60 ng/ape. La prova, con i relativi dati, è stata inserita su suggerimento del relatore perché non se ne perdesse memoria, vista l'alta significatività che ricopre il test svolto dato dall'alto numero di api utilizzate (v. Tabella 5).

Da questa sperimentazione non possiamo trarre delle conclusioni apprezzabili vista la mancanza di comparazione (v. Tabella 4 e Grafico 10).

L'altra prova è stata svolta in soluzione idroalcolica andando a testare le api trattate alle umidità di 70% e 90% (v. Tabella 6 e 7).

Dalle tabelle possiamo già vedere la percentuale di mortalità dell'uno e dell'altro caso ma dal grafico, riusciamo a valutare le eventuali differenze (v. Grafico 11).

Analizzando i risultati notiamo che non emergono differenze significative di mortalità tra i due valori di UR valutati; le differenze sono così lievi che possiamo concludere che l'umidità non influenza in alcun modo la mortalità dell'ape trattata.

THIAMETHOXAM (alcool) UR 80%				
DOSE (ng/ape)	MORTI (n)	VIVI (n)	Totali	% MORTALITA'
125	28	2	30	93,33333
60	26	4	30	86,66667
30	18	12	30	60
15	4	26	30	13,33333

Tabella 3.4 dati mortalità a temperatura costante di 30°C e umidità del 80% con p.a. diluito in alcool assoluto

THIAMETHOXAM (alcool) UR 50-55%				
DOSE (ng/ape)	MORTI (n)	VIVI (n)	Totali	% MORTALITA'
60	126	36	162	77,77778

Tabella 3.5 dati mortalità a temperatura costante di 30°C e umidità del 50-55% con p.a. diluito in alcool assoluto

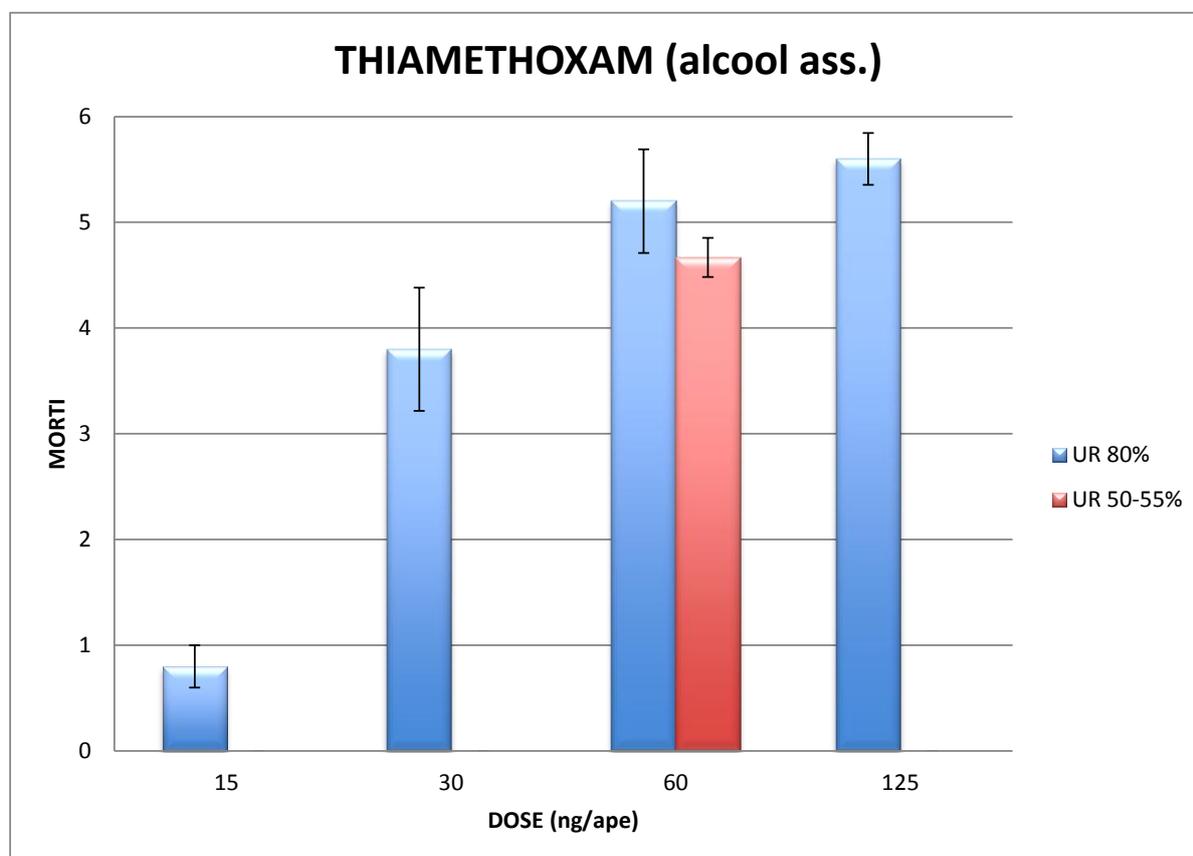


Grafico 3.10 mortalità riferita alle tabelle 4 e 5

THIAMETHOXAM (alcool + acqua) UR 70%				
DOSE (ng/ape)	MORTI (n)	VIVI (n)	Totali	% MORTALITA'
125	26	16	42	61,90476
60	7	17	24	29,16667
30	8	13	21	38,09524

Tabella 3. 6 dati mortalità a temperatura costante di 30°C e umidità del 70% con p.a. diluito in alcool e acqua

THIAMETHOXAM (alcool + acqua) UR 90%				
DOSE (ng/ape)	MORTI (n)	VIVI (n)	Totali	% MORTALITA'
125	16	2	18	88,88889
60	7	5	12	58,33333
30	1	11	12	8,333333

Tabella 3. 7 dati mortalità a temperatura costante di 30°C e umidità del 90% con p.a. diluito in alcool e acqua

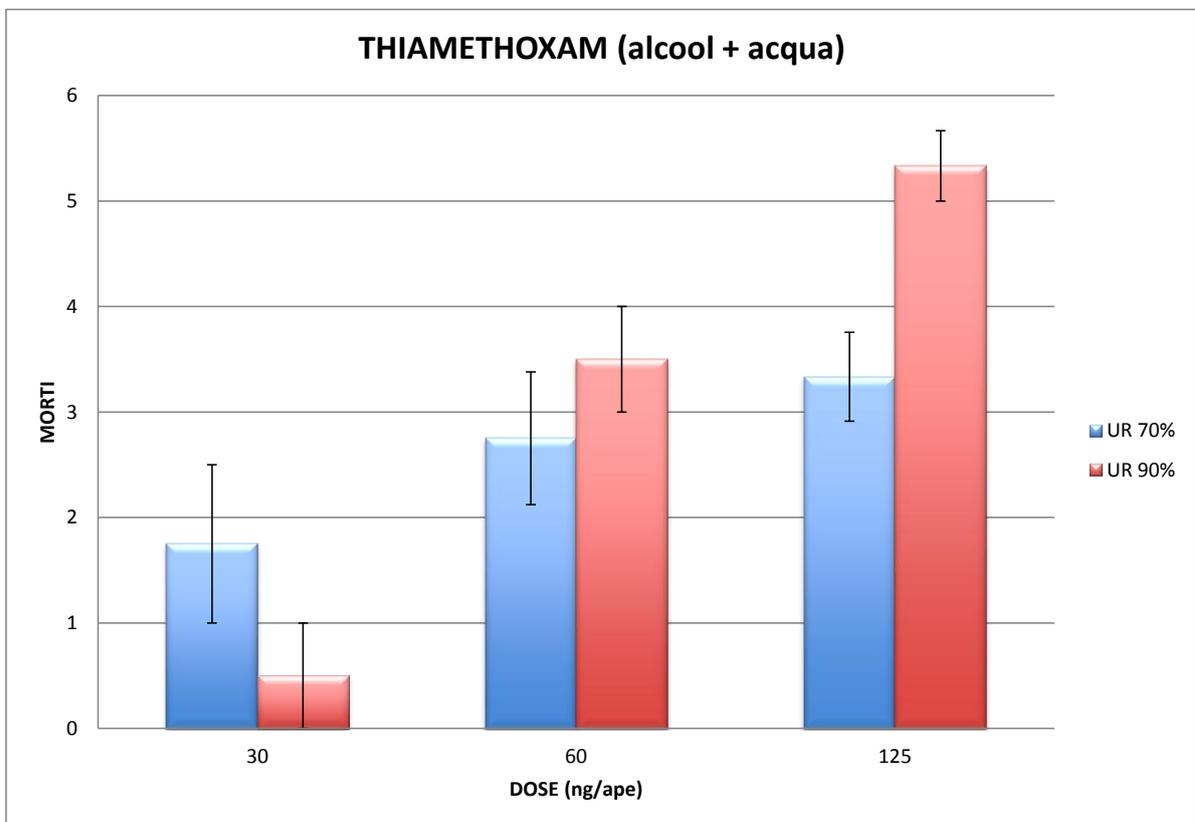


Grafico 3.11 mortalità con p.a. diluito in alcool e acqua a diverse umidità riferito alle tabelle 6 e 7

3.2.3. Prove con pretrattamento umidità

In queste prove abbiamo sottoposto l'ape trattata a due ambienti che differiscono per l'umidità.

Posta in ambiente secco o umido per 30 minuti e poi spostata in ambiente secco o umido, abbiamo valutato l'influenza dal cambiamento di umidità sulla mortalità delle api (v. Tabella 8).

Come possiamo osservare in modo chiaro dal grafico (v. Grafico 12), le differenze di umidità create all'interno della stessa replicazione non hanno portato a difformità tra le varie prove. Solamente in ambiente secco si è registrata una mortalità lievemente più elevata rispetto agli altri

Questa è un'ulteriore conferma della non incisione dell'umidità sulla mortalità delle api trattate.

PRE (UR)	POST (UR)	CONDIZIONE	MORTI (n)	TOTALE	MEDIA %
30-55%	55-60%	S – S	35	48	72,91667
30-55%	75-90%	S – U	11	18	61,11111
75-90%	55-60%	U – S	19	30	63,33333
85-90%	75-90%	U – U	18	30	60

Tabella 3.8 dati mortalità riferiti alle prove con pretrattamento valutato per l'umidità

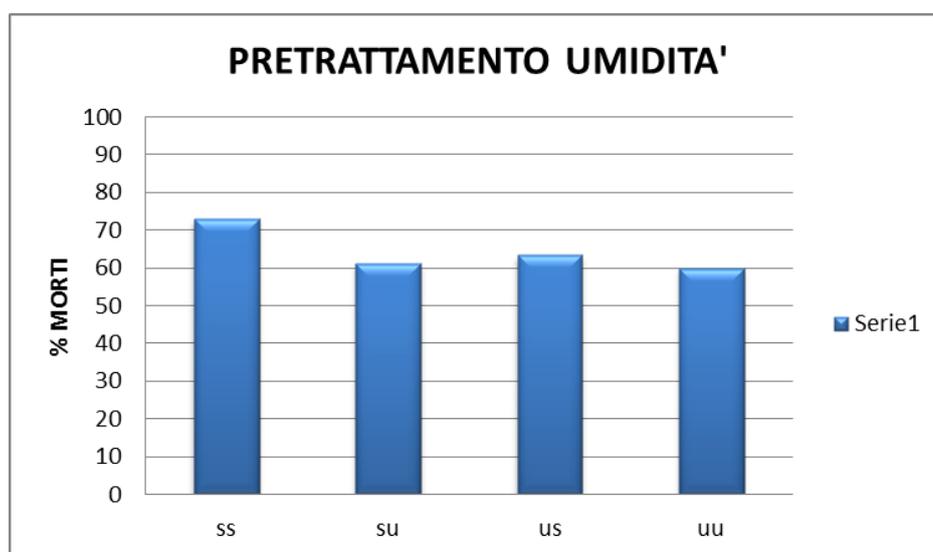


Grafico 3.12 mortalità in % riferita alla Tabella

3.2.4. Prove con pretrattamento temperatura

In queste prova abbiamo voluto verificare l'influenza della temperatura sulla mortalità dell'ape trattata ponendola in due condizioni differenti all'interno della stessa replicazione.

Le temperature utilizzate sono state di 30°C, 25°C e 20 °C per un totale di 6 combinazioni.

I risultati, esposti nel grafico (v. Grafico 13), ci illustrano le situazioni venutesi a creare.

L'esposizione dell'ape a temperature differenti sembra non influenzare in modo sensibile sulla mortalità della stessa.

PRE (T °C)	POST (T °C)	MORTI (n)	TOTALE	MEDIA %
30C°	30C°	9	12	75
30C°	20 C°	11	12	91,66667
25 C°	20-18	8	12	66,66667
20 C°	20 C°	10	12	83,33333
20 C°	30C°	10	12	83,33333

Tabella 3.9 dati mortalità riferiti alle prove con pretrattamento valutato per la temperatura

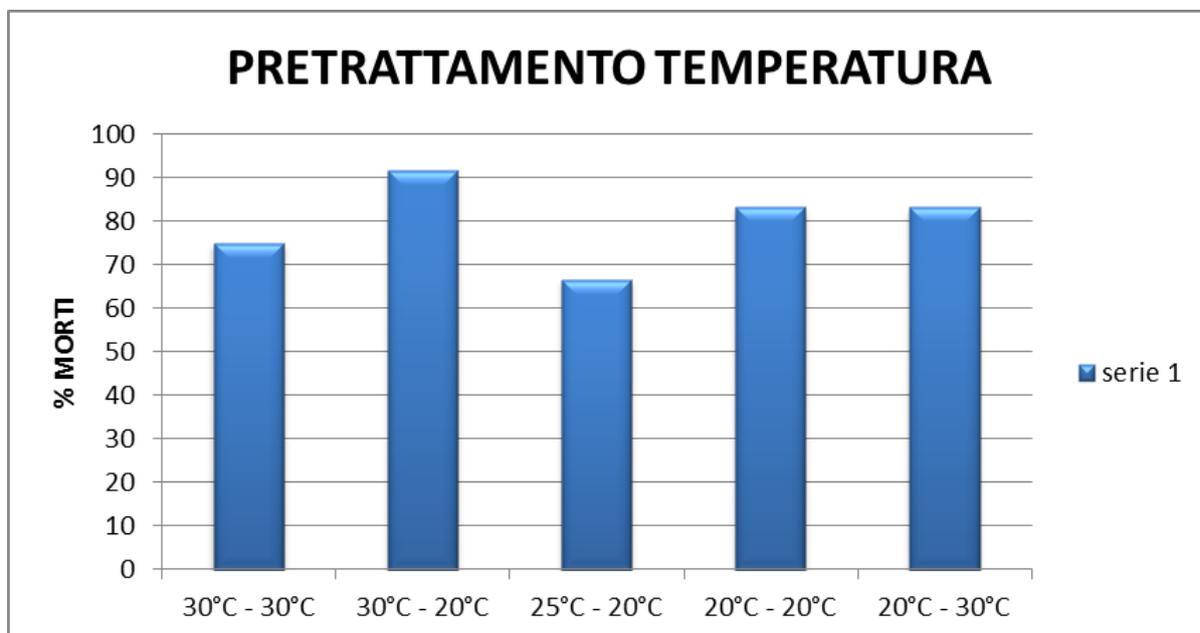


Grafico 3.13 mortalità in % riferita alla Tabella 9

3.3. Differenze di mortalità tra l'utilizzo della gabbia e della gabbia sul vaso

In questa sperimentazione abbiamo voluto valutare se vi fossero delle differenze tra le api poste in una gabbietta e poste all'interno di un vaso contenente un substrato erboso.

Lo scopo della prova era quello di verificare se l'erba potesse avere un ruolo sulla pulizia dell'ape del prodotto somministrato a differenza della classica prova di laboratorio nella sola gabbia.

La supposizione iniziale prevedeva che, visti i risultati ottenuti dalle gabbiette, ove l'ape trattata sull'addome era in grado di pulirsi dal prodotto sfregando sul tulle, l'ape trovasse giovamento dall'ambiente naturale.

Analizzando i dati raccolti (v. Tabella 10) possiamo vedere che la supposizione non ha avuto risvolto positivo. Mettendo a confronto i dati dei due ambienti (v. Grafico 14) vediamo che la mortalità risulta la stessa. Questo ci ha permesso di eliminare dalla sperimentazione l'utilizzo del vaso, in quanto l'utilizzo della gabbietta non crea un'ambiente a se stante ma anzi simula meglio un ambiente naturale più simile alle reali condizioni di campo. Abbiamo così potuto ridurre le variabili da considerare; l'ape presenta identica mortalità e grado di pulizia in entrambi gli ambienti studiati.

I dati sono relativi alla mortalità espressa in %.

THIAMETOXAM alcool (60 ng/ape)		
	Gabbia	Vaso
Vivi	9	11
Morti	69	61
Totale	78	72
% Mortalità	88	84

Tabella 3.10 differenze mortalità tra gabbia e vaso in %

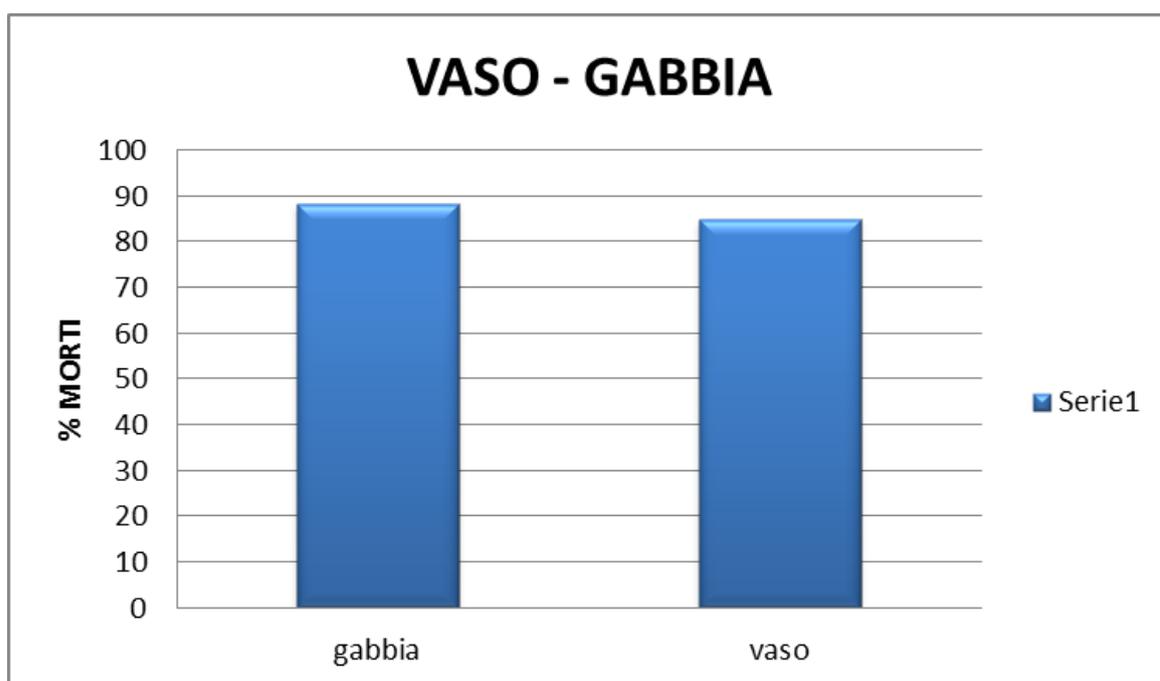


Grafico 3.14 differenza mortalità tra vaso e gabbia con dati riferiti alla tabella 10

3.4. Prove tossicologiche per la determinazione della DL₅₀

3.4.1. CHLORPYRIFOS

Per calcolare la DL₅₀ del principio attivo, abbiamo operato dimezzando di volta in volta la concentrazione utilizzata, sino ad arrivare alla dose che non uccideva nessun ape.

La dose più alta utilizzata è stata 750 ng/ape e siamo scesi fino a 6 ng/ape, dose non letale.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato un programma Probit che permette di calcolare la DL₅₀ e di disegnare una curva di tendenza (v. Grafico 16). In questo grafico troviamo la comparazione tra la DL₅₀ del prodotto diluito in soluzione alcolica e idroalcolica. Come possiamo vedere dal Grafico 15, il p.a. in soluzione alcolica, uccide di più rispetto a quello in soluzione idroalcolica.

Le relative DL₅₀ le sono riportate all'interno delle Tabelle 11 e 12.

Per l'alcool la DL₅₀ risulta essere di 60 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 50 e 74 ng/ape.

Per l'alcool 50% la DL₅₀ risulta essere di 96 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 82 e 113 ng/ape.

Questo ci indica che la differenza tra le due soluzioni è significativa, in quanto l'una non è compresa nel range di variazione dell'altra.

Dal Probit (v. Grafico 16) notiamo che le curve convergono a concentrazioni alte, segno che la differenza di mortalità la si ha a basse concentrazioni ad indicare che il prodotto in alcool assoluto ha una mortalità superiore rispetto all'altro.

Qui abbiamo trovato la DL₅₀ di contatto. Se confrontiamo il nostro valore con quello pubblicato dalla Commissione Europea (v. Tabella 1), 0,059 µg/ape (59 ng/ape), vediamo che non vi sono differenze con il prodotto diluito in alcool assoluto, ma risulta più bassa se confrontata con il prodotto in soluzione idroalcolica.

DOSE (ng/ape) Alcool	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
6	0	6	0
12	1	18	5.5
25	3	25	12
50	12	42	28.5
95	21	24	87.5
190	6	6	100
380	6	6	100
750	6	6	100
	DL₅₀		
	60	Range (50 – 74)	

Tabella 3.11 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Chlorpyrifos diluito in alcool assoluto

DOSE (ng/ape) Alcool + acqua	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
6	0	6	0
12	0	6	0
25	0	12	0
50	3	30	10
95	9	24	37.5
190	18	18	100
380	6	6	100
750	6	6	100
	DL₅₀		
	96	Range (82 – 113)	

Tabella 3.12 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Chlorpyrifos diluito in alcool e alcool 50%

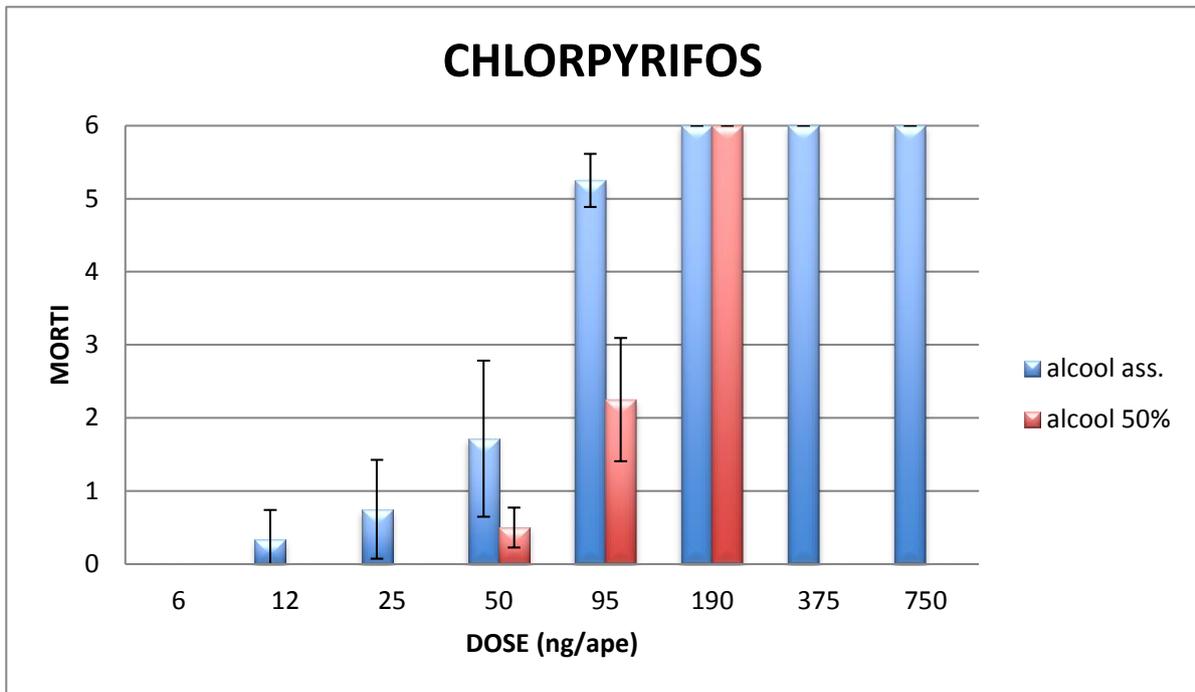


Grafico 3.15 mortalità api espressa con la media ed errore relativo

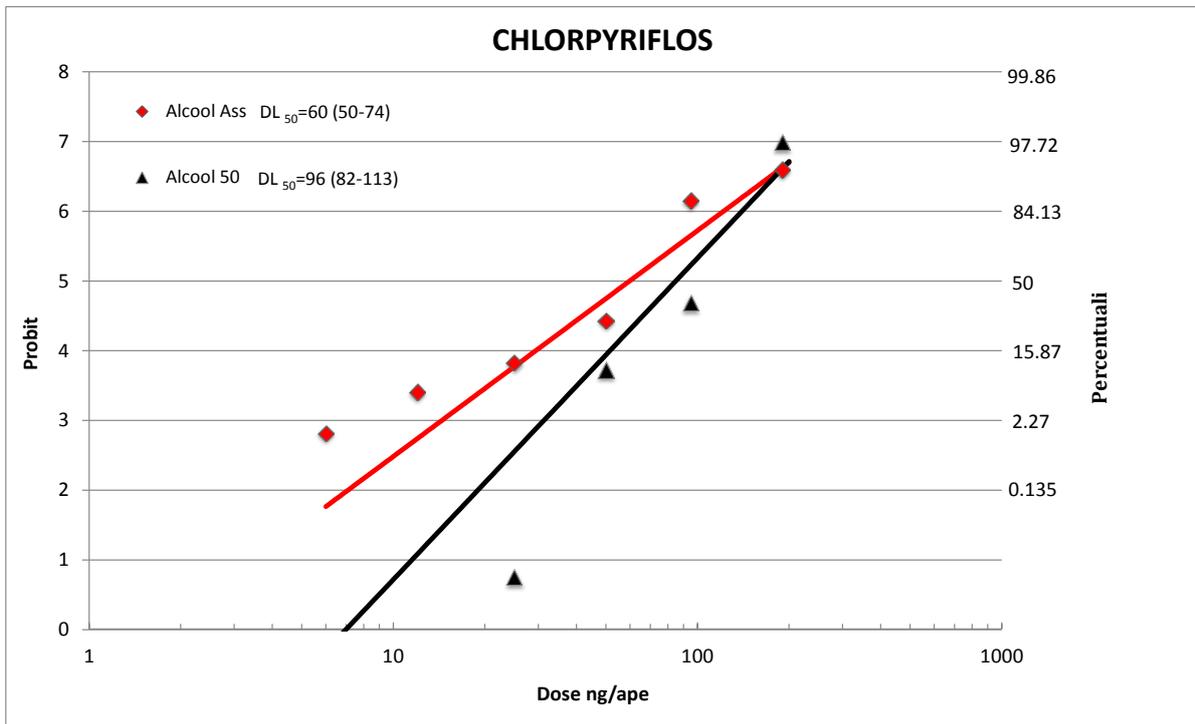


Grafico 3.16 probit p.a. Chlorpyrifos esprime la DL_{50} confrontando il p.a in soluzione alcolica e idroalcolica

3.4.2. CLOTHIANIDIN

Per calcolare la DL_{50} del principio attivo, abbiamo operato dimezzando di volta in volta la concentrazione utilizzata, sino ad arrivare alla dose che non uccideva nessun ape.

La dose più alta utilizzata è stata 160 ng/ape e siamo scesi fino a 10 ng/ape, dose non letale.

Per il calcoli ci siamo valse del programma Probit che permette di estrapolare la DL_{50} e di disegnare una curva di tendenza (v. Grafico 18). In questo grafico troviamo la comparazione tra la DL_{50} del prodotto diluito in soluzione alcolica e idroalcolica. Come possiamo vedere dal Grafico 17, il p.a. in soluzione alcolica, uccide di più rispetto a quello in soluzione idroalcolica.

Le relative DL_{50} sono riportate all'interno delle Tabelle 13 e 14.

Per l'alcool la DL_{50} risulta essere di 33 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 27 e 42 ng/ape.

Per l'alcool 50% la DL_{50} risulta essere di 67 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 54 e 86 ng/ape.

Questo ci indica che la differenza tra le due soluzioni è significativa, in quanto l'una non è compresa nel range di variazione dell'altra.

Dal Probit (v. Grafico 18) notiamo che le curve proseguono con andamento pressoché parallelo, ad indicare che il prodotto in alcool risulta sempre più tossico rispetto alla soluzione idroalcolica.

Qui abbiamo trovato la DL_{50} di contatto. Se confrontiamo il nostro valore con quello pubblicato dalla Commissione Europea (v. Tabella 1), 0,04426 $\mu\text{g}/\text{ape}$ (44 ng/ape), notiamo che risulta più elevata rispetto al p.a. in soluzione alcolica e anche al di fuori del range di variazione da noi calcolato e più basso rispetto alla soluzione idroalcolica.

DOSE (ng/ape) Alcool	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
10	0	12	0
20	8	37	21.62
40	18	30	60
80	12	12	100
160	6	6	100
	DL₅₀		
	33	Range (27 – 42)	

Tabella 3.13 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Clothianidin diluito in alcool assoluto

DOSE (ng/ape) Alcool + acqua	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
10	0	12	0
20	1	36	2.7
40	9	30	30
80	15	30	50
160	12	12	100
	DL₅₀		
	67	Range (54 – 86)	

Tabella 3.14 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Clothianidin diluito in alcool e alcool 50%

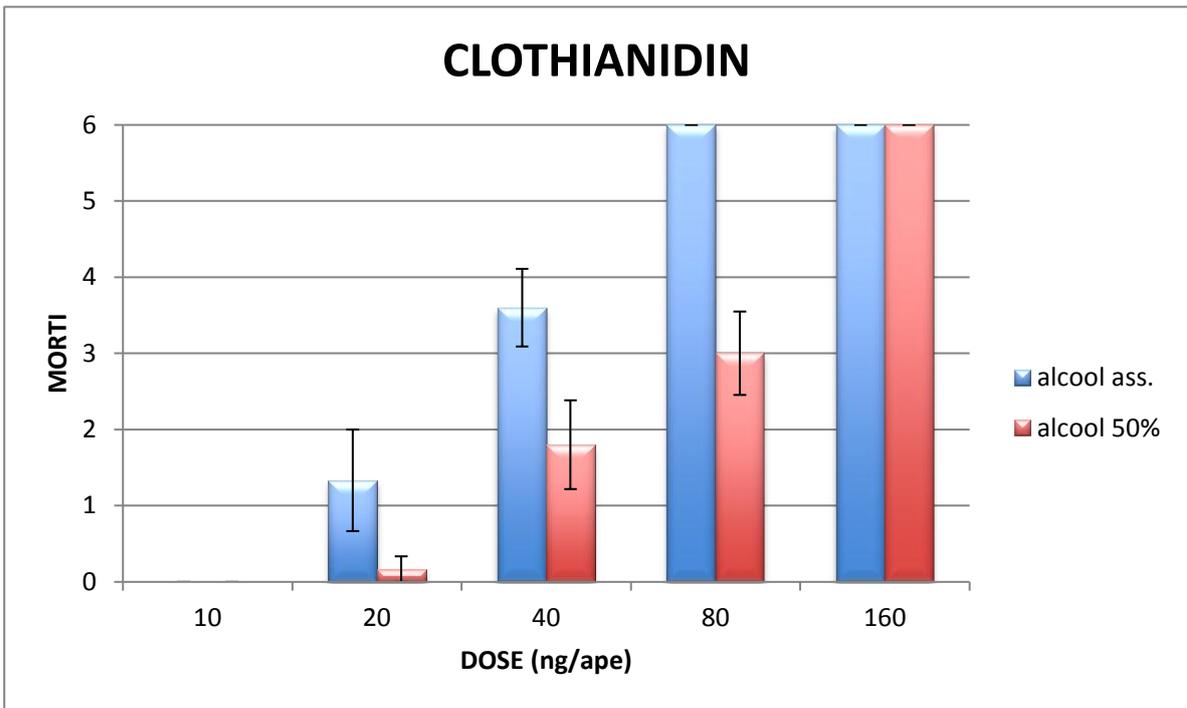


Grafico 3.17 mortalità api espressa con la media ed errore relativo

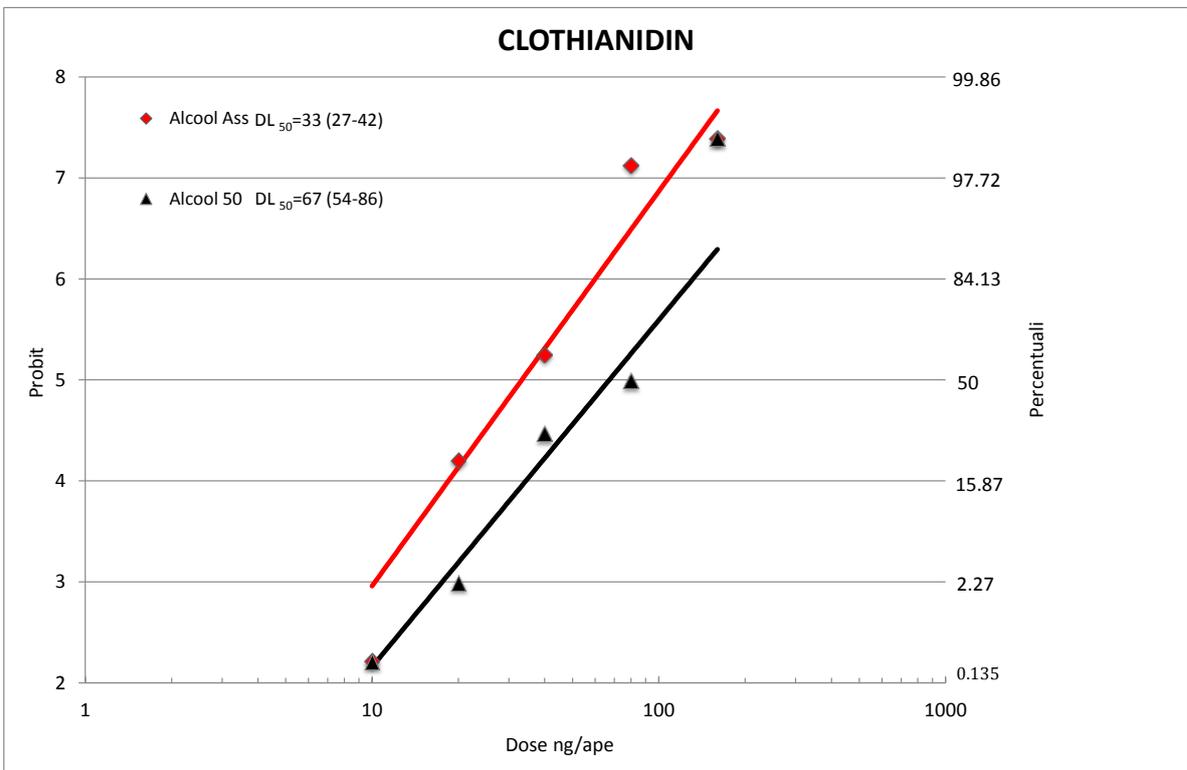


Grafico 3.18 probit p.a. Clothianidin esprime la DL_{50} confrontando il p.a in soluzione alcolica e idroalcolica

3.4.3. DIMETOATO

Per calcolare la DL_{50} del principio attivo, abbiamo operato dimezzando di volta in volta la concentrazione utilizzata, sino ad arrivare alla dose che non uccideva nessun ape.

La dose più alta utilizzata è stata 750 ng/ape e siamo scesi fino a 25 ng/ape, dose non letale.

Per i calcoli ci siamo valsi del programma Probit che permette di estrapolare la DL_{50} e di disegnare una curva di tendenza (v. Grafico 20). In questo grafico troviamo la comparazione tra la DL_{50} del prodotto diluito in soluzione alcolica e idroalcolica. Come possiamo vedere dal Grafico 19, il p.a. in soluzione alcolica, uccide di più rispetto a quello in soluzione idroalcolica.

Le relative DL_{50} sono riportate all'interno delle Tabelle 13 e 14.

Per l'alcool la DL_{50} risulta essere di 81 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 66 e 95 ng/ape.

Per l'alcool 50% la DL_{50} risulta essere di 211 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 180 e 250 ng/ape.

Questo ci indica che la differenza tra le due soluzioni è significativa, in quanto l'una non è compresa nel range di variazione dell'altra.

Dal Probit (v. Grafico 20) notiamo che le curve tendono a divergere, andando a rimarcare la differenza di tossicità tra l'alcool assoluto e l'alcool 50%

Qui abbiamo trovato la DL_{50} di contatto. Se confrontiamo il nostro valore con quelli trovati in letteratura (v. Tabella 1), 0,21-0,26 $\mu\text{g}/\text{ape}$ (210-260 ng/ape) e 0,15 $\mu\text{g}/\text{ape}$ (150 ng/ape), vediamo che vi sono notevoli differenze nei valori. Sono notevolmente più elevati rispetto a quello da noi trovato in soluzione alcolica, abbondantemente più del doppio, ma stanno all'interno del range di variazione per quanto concerne la soluzione idroalcolica.

DOSE (ng/ape) Alcool	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
25	0	6	0
50	1	24	4.16
95	18	24	75
190	24	24	100
380	12	12	100
750	6	6	100
	DL₅₀		
	81	Range (66 – 95)	

Tabella 3.15 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Dimethoate diluito in alcool assoluto

DOSE (ng/ape) Alcool + acqua	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
25	0	12	0
50	0	12	0
95	2	36	5.5
190	8	24	33.33
380	27	29	93.1
750	6	6	100
	DL₅₀		
	211	Range (180 – 250)	

Tabella 3.16 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Dimethoate diluito in alcool e alcool 50%

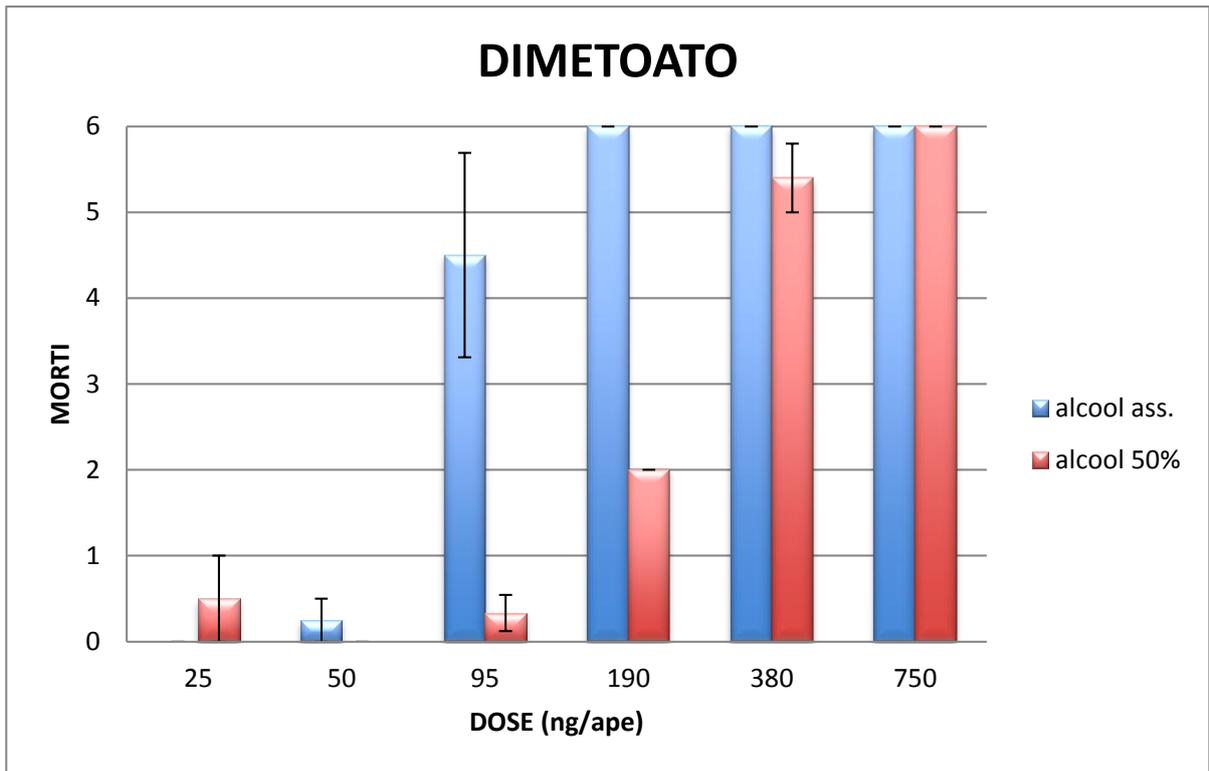


Grafico 3.19 mortalità api espressa con la media ed errore relativo

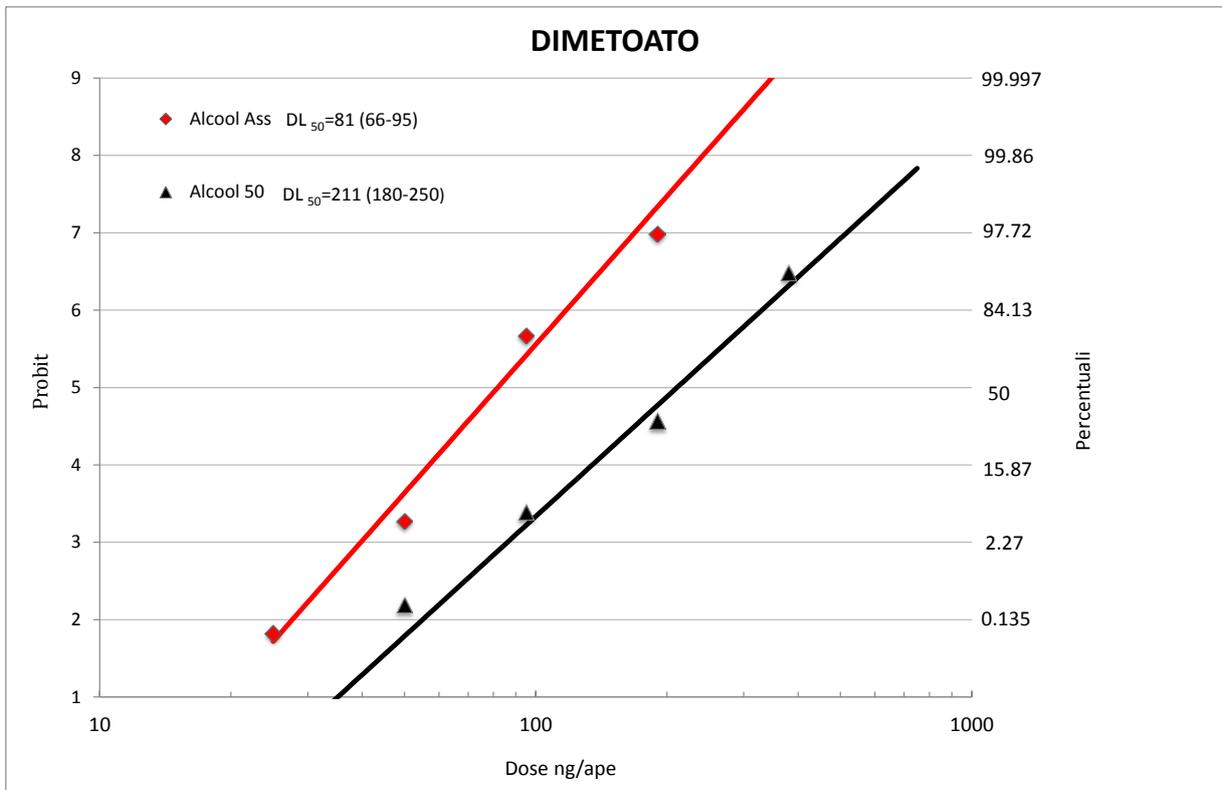


Grafico 3.20 probit p.a. Dimethoate esprime la DL₅₀ confrontando il p.a in soluzione alcolica e idroalcolica

3.4.4. FIPRONIL

Per calcolare la DL_{50} del principio attivo, abbiamo operato dimezzando di volta in volta la concentrazione utilizzata, sino ad arrivare alla dose che non uccideva nessun ape.

La dose più alta utilizzata è stata 95 ng/ape e siamo scesi fino a 3 ng/ape, dose non letale.

Per i calcoli ci siamo valse del programma Probit che permette di estrapolare la DL_{50} e di disegnare una curva di tendenza (v. Grafico 22). In questo grafico troviamo la comparazione tra la DL_{50} del prodotto diluito in soluzione alcolica e idroalcolica. Come possiamo vedere dal Grafico 21, il p.a. in soluzione alcolica e quello in soluzione idroalcolica non presentano sostanziali differenze di mortalità.

Le relative DL_{50} sono riportate all'interno delle Tabelle 15 e 16.

Per l'alcool la DL_{50} risulta essere di 8 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 7 e 8,5 ng/ape.

Per l'alcool 50% la DL_{50} risulta essere di 8,5 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 7 e 9 ng/ape.

Questo ci indica che la differenza tra le due soluzioni non è significativa, in quanto l'una è compresa nel range di variazione dell'altra.

Dal Probit (v. Grafico 22) notiamo che le curve sono molto vicine con una spazio tra le due molto stretto; la tossicità non varia significativamente tra le due soluzioni.

Qui abbiamo trovato la DL_{50} di contatto. Se confrontiamo il nostro valore con quelli trovati in letteratura (v. Tabella 1), 0,00593 $\mu\text{g}/\text{ape}$ (5,93 ng/ape), vediamo che i dati sono differenti. Il valore confrontato è inferiore a quello da noi calcolato ed esterno al range di variazione.

DOSE (ng/ape) Alcool	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
3	0	6	0
6	3	18	16,66667
8,5	17	30	56.6
12	30	30	100
25	30	30	100
50	18	18	100
95	12	12	100
	DL₅₀		
	8	Range (7 – 8.5)	

Tabella 3.17 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Fipronil diluito in alcool assoluto

DOSE (ng/ape) Alcool + acqua	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
3	0	6	0
6	1	18	5,555556
8,5	14	28	44.4
12	34	36	94.4
25	24	24	100
50	12	12	100
95	6	6	100
	DL₅₀		
	8.5	Range (7 – 9)	

Tabella 3.18 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Fipronil diluito in alcool e alcool 50%

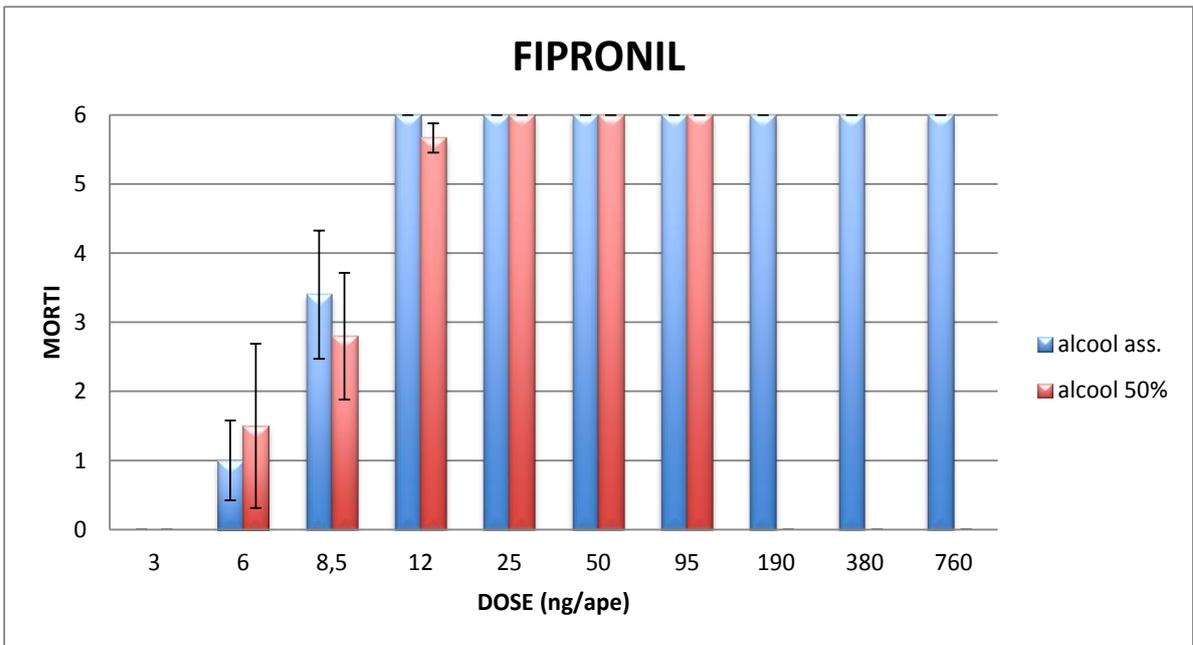


Grafico 3.21 mortalità api espressa con la media ed errore relativo

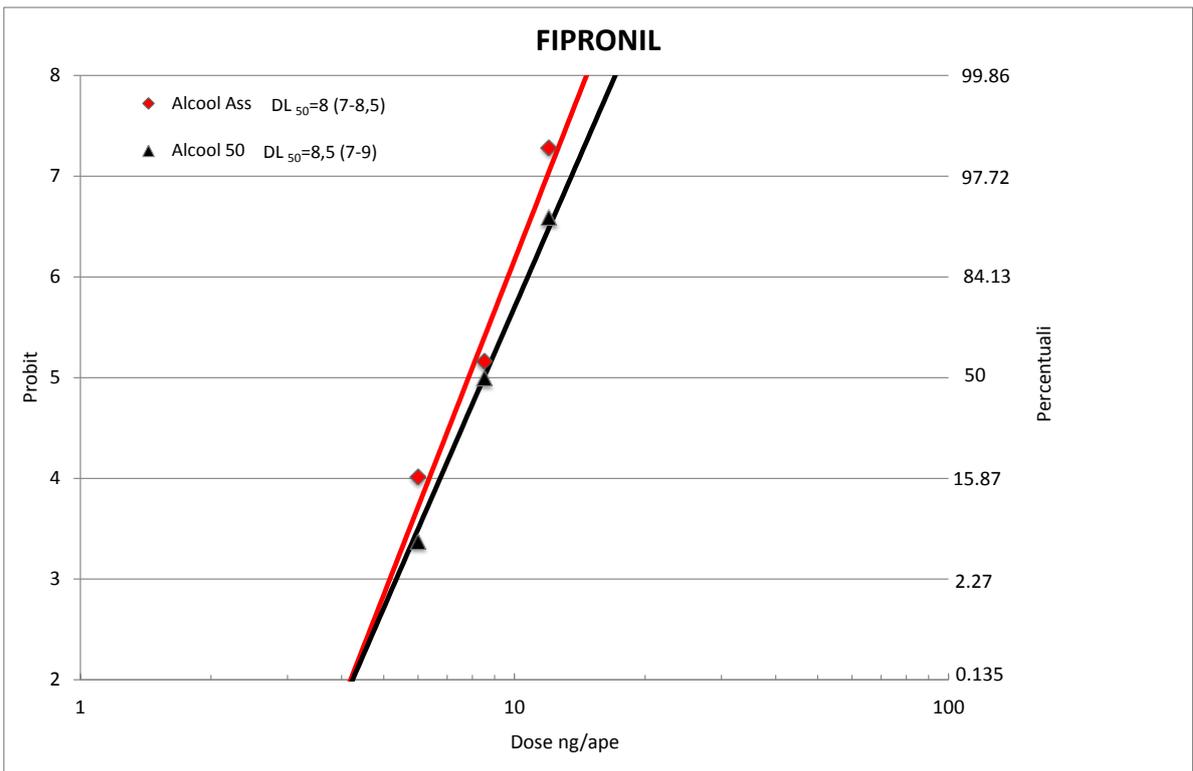


Grafico 3.22 probit p.a. Fipronil esprime la DL₅₀ confrontando il p.a in soluzione alcolica e idroalcolica

3.4.5. DELTAMETRINA

Per calcolare la DL_{50} del principio attivo, abbiamo operato dimezzando di volta in volta la concentrazione utilizzata, sino ad arrivare alla dose che non uccideva nessun ape.

La dose più alta utilizzata è stata 750 ng/ape e siamo scesi fino a 25 ng/ape, dose non letale.

Per il calcoli ci siamo valse del programma Probit che permette di estrapolare la DL_{50} e di disegnare una curva di tendenza (v. Grafico 24). In questo grafico troviamo la comparazione tra la DL_{50} del prodotto diluito in soluzione alcolica e idroalcolica. Come possiamo vedere dal Grafico 23, il p.a. in soluzione alcolica, uccide di più rispetto a quello in soluzione idroalcolica.

Le relative DL_{50} sono riportate all'interno delle Tabelle 19 e 20.

Per l'alcool la DL_{50} risulta essere di 87 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 56 e 121 ng/ape.

Per l'alcool 50% la DL_{50} risulta essere di 177 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 133 e 243 ng/ape.

Questo ci indica che la differenza tra le due soluzioni è significativa, in quanto l'una non è compresa nel range di variazione dell'altra.

Dal Probit (v. Grafico 24) notiamo che le curve proseguono con un andamento parallelo con una tendenza a convergere alle alte concentrazioni, rimarcando che ad alte concentrazioni la soluzione in alcool o alcool 50% non fa differenza.

Qui abbiamo trovato la DL_{50} di contatto. Se confrontiamo il nostro valore con quello pubblicato dalla Commissione Europea (v. Tabella 1), 1,5 ng/ape a 48ore, vediamo una notevole differenza di tossicità. C'è da far notare però, che il nostro valore è calcolato a 24 ore e non a 48. Questo potrebbe spiegare la profonda differenza tra i due dati.

DOSE (ng/ape) Alcool	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
25	2	12	16.6
50	6	18	33.3
95	13	24	54.16
190	21	30	70
380	12	12	100
750	6	6	100
	DL₅₀		
	87	Range (56 – 121)	

Tabella 3.19 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Deltamethrin diluito in alcool assoluto

DOSE (ng/ape) Alcool + acqua	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
25	0	12	0
50	1	18	5.5
95	10	36	27.77
190	17	30	56.6
380	15	18	83.3
750	6	6	100
	DL₅₀		
	177	Range (133 – 243)	

Tabella 3.20 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Deltamethrin diluito in alcool e alcool 50%

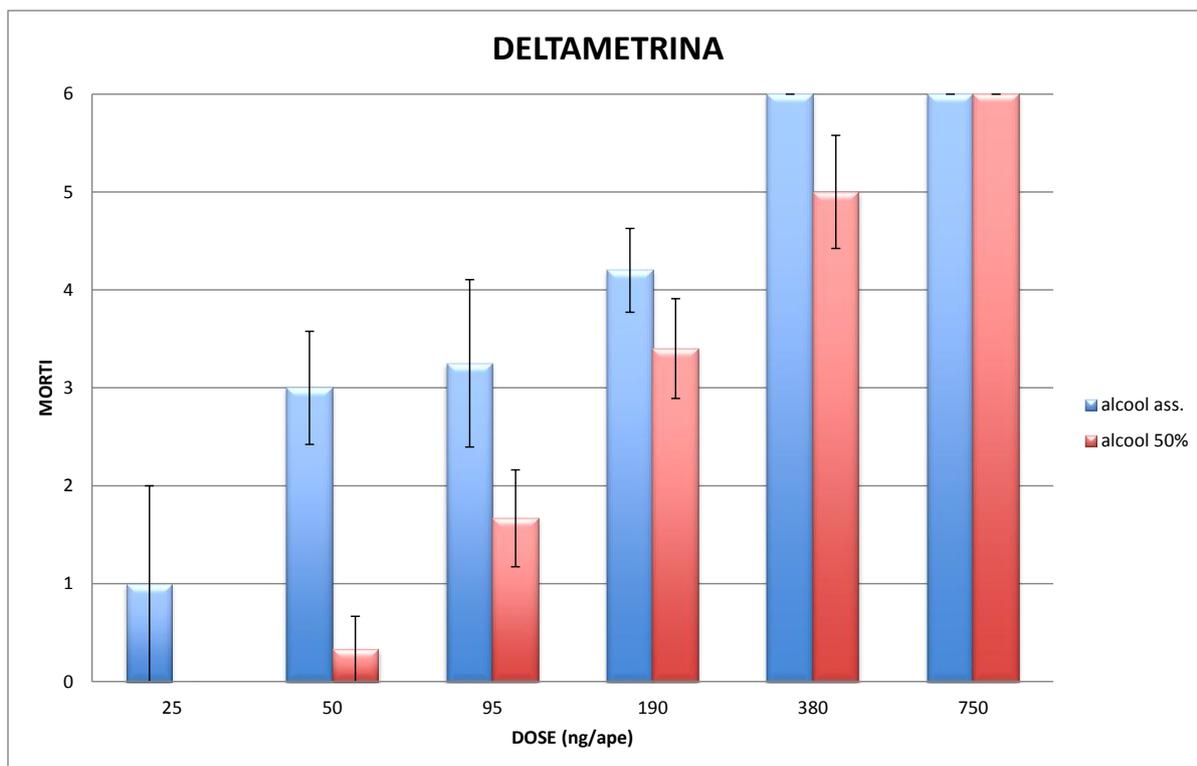


Grafico 3.23 mortalità api espressa con la media ed errore relativo

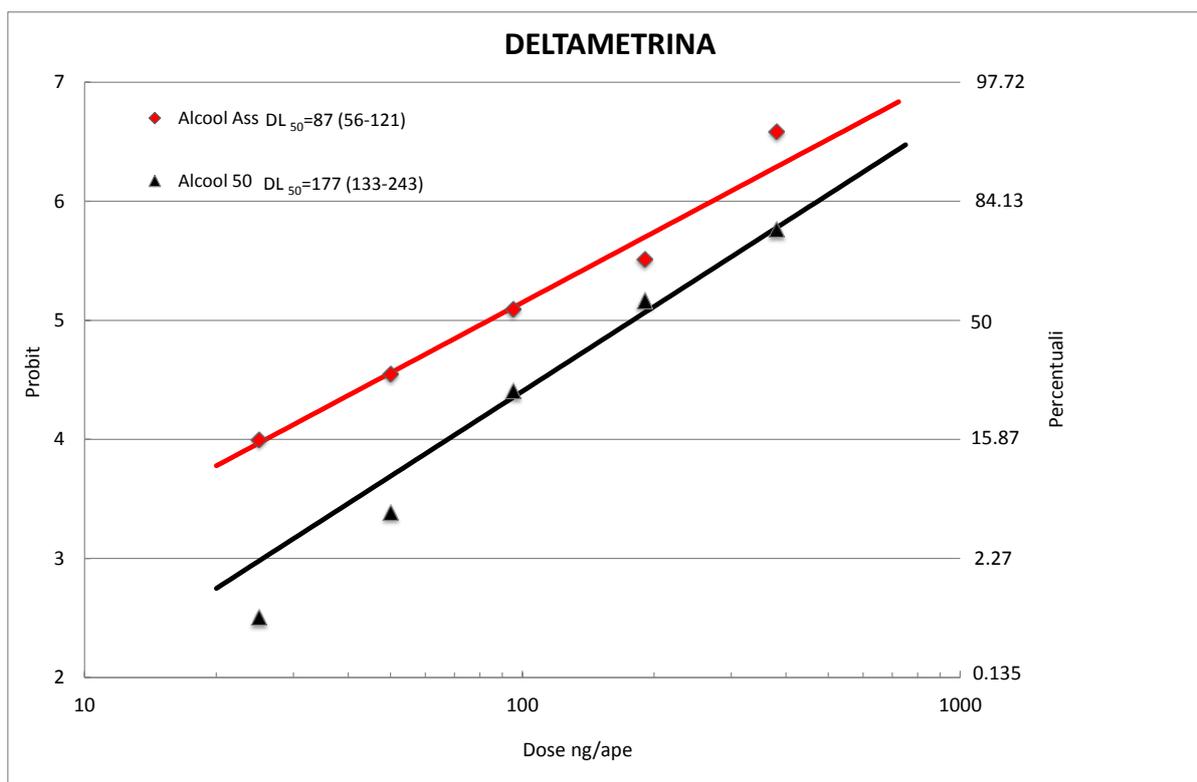


Grafico 3.24 probit p.a. Deltamethrin esprime la DL_{50} confrontando il p.a. in soluzione alcolica e idroalcolica

3.4.6. IMIDACLOPRID

Per calcolare la DL_{50} del principio attivo, abbiamo operato dimezzando di volta in volta la concentrazione utilizzata, sino ad arrivare alla dose che non uccideva nessun ape.

La dose più alta, 750 ng/ape, è stata utilizzata solamente in alcool 50%, in quanto in alcool assoluto abbiamo registrato la morte di tutte le api a dosi più basse e siamo scesi fino a 6 ng/ape, dose non letale.

Per il calcoli ci siamo valse del programma Probit che permette di estrapolare la DL_{50} e di disegnare una curva di tendenza (v. Grafico 26). In questo grafico troviamo la comparazione tra la DL_{50} del prodotto diluito in soluzione alcolica e idroalcolica. Come possiamo vedere dal Grafico 25, il p.a. in soluzione alcolica, uccide di più rispetto a quello in soluzione idroalcolica.

Le relative DL_{50} sono riportate all'interno delle Tabelle 19 e 20.

Per l'alcool la DL_{50} risulta essere di 44 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 34 e 54 ng/ape.

Per l'alcool 50% la DL_{50} risulta essere di 118 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 95 e 151 ng/ape.

Questo ci indica che la differenza tra le due soluzioni è significativa, in quanto l'una non è compresa nel range di variazione dell'altra.

Dal Probit (v. Grafico 26) notiamo che le curve proseguono con un andamento parallelo con una tendenza a divergere alle alte concentrazioni, rimarcando la diversa tossicità tra le due soluzioni.

Qui abbiamo trovato la DL_{50} di contatto. Se confrontiamo il nostro valore con quello pubblicato dalla Commissione Europea (v. Tabella 1), 0,081 $\mu\text{g}/\text{ape}$ (81 ng/ape), vediamo una notevole differenza di tossicità. Il dato della comm. Europea sta al di fuori del nostro range di variazione per entrambe le soluzioni, dimostrandosi più basso rispetto la soluzione idroalcolica.

DOSE (ng/ape) Alcool	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
6	0	6	0
12	3	24	12.5
25	5	30	16.6
50	16	30	53.3
95	24	30	80
190	24	24	100
380	18	18	100
750	6	6	100
	DL₅₀		
	44	Range (35 – 54)	

Tabella 3.22 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Imidacloprid diluito in alcool assoluto

DOSE (ng/ape) Alcool + acqua	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
6	0	6	0
12	1	18	5,555556
25	2	30	6.6
50	7	36	19.4
95	7	30	23,33333
190	25	31	80.6
380	16	18	88.8
750	6	6	100
	DL₅₀		
	118	Range (95 – 151)	

Tabella 3.21 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Imidacloprid diluito in alcool e alcool 50 %

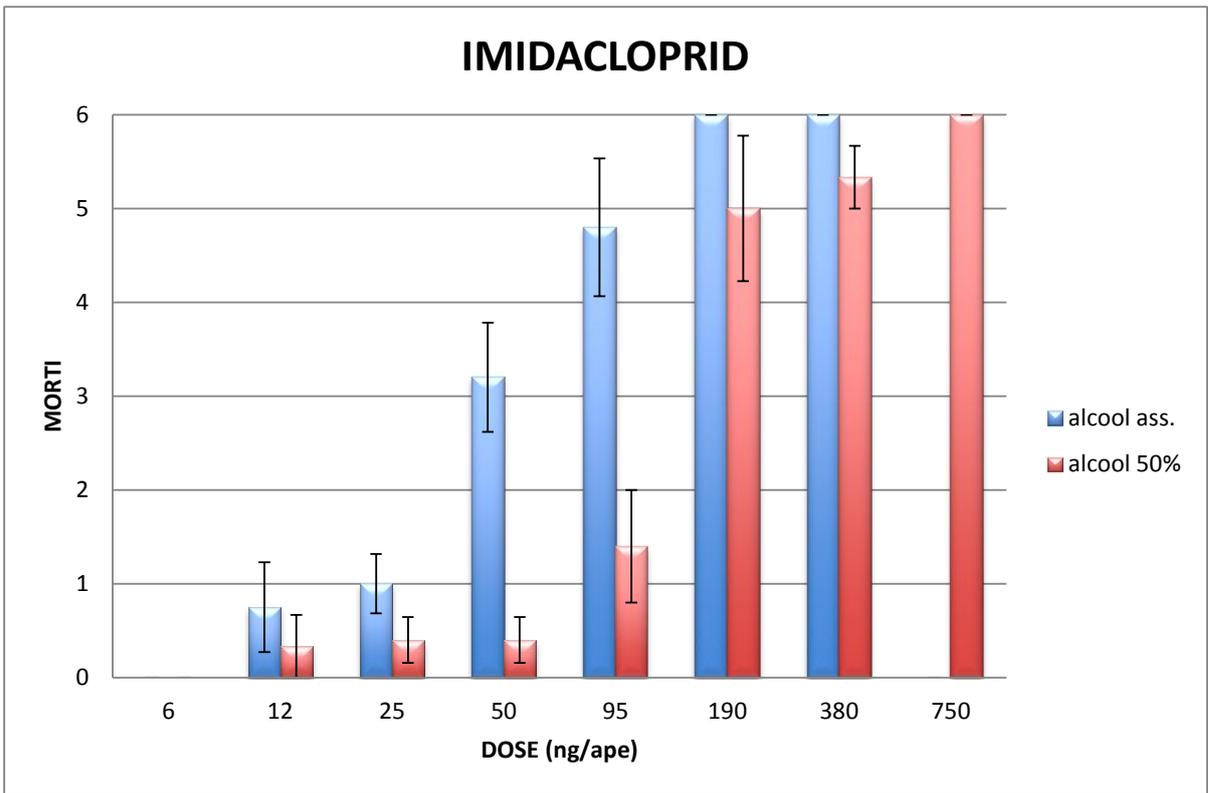


Grafico 3.25 mortalità api espressa con la media ed errore relativo

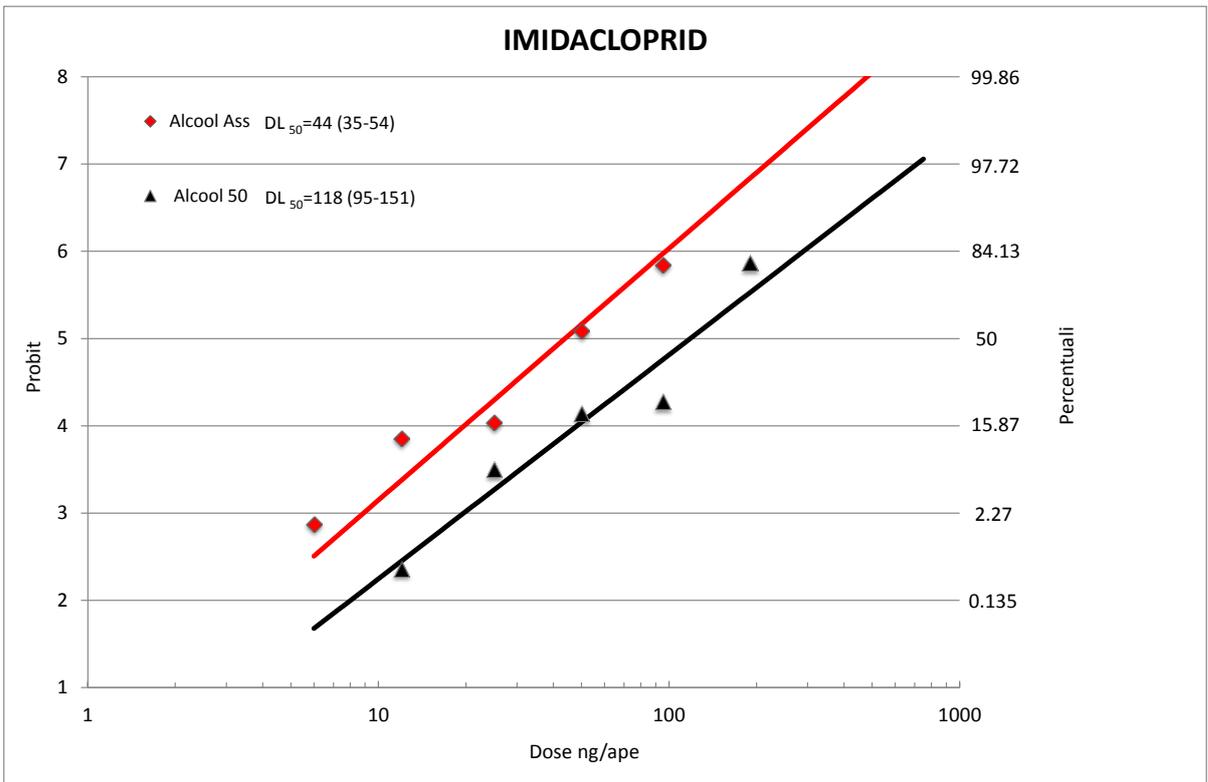


Grafico 3.26 probit p.a. Imidacloprid esprime la DL_{50} confrontando il p.a. in soluzione alcolica e idroalcolica

3.4.7. THIAMETHOXAM

Per calcolare la DL_{50} del principio attivo, abbiamo operato dimezzando di volta in volta la concentrazione utilizzata, sino ad arrivare alla dose che non uccideva nessun ape.

La dose più alta utilizzata è stata 250 ng/ape e siamo scesi fino a 7 ng/ape, dose non letale.

Per il calcoli ci siamo valse del programma Probit che permette di estrapolare la DL_{50} e di disegnare una curva di tendenza (v. Grafico 28). In questo grafico troviamo la comparazione tra la DL_{50} del prodotto diluito in soluzione alcolica e idroalcolica. Come possiamo vedere dal Grafico 27, il p.a. in soluzione alcolica, uccide di più rispetto a quello in soluzione idroalcolica.

Le relative DL_{50} sono riportate all'interno delle Tabelle 23 e 24.

Per l'alcool la DL_{50} risulta essere di 30 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 25 e 35 ng/ape.

Per l'alcool 50% la DL_{50} risulta essere di 94 ng/ape, con un range di variazione compreso tra 74 e 133 ng/ape.

Questo ci indica che la differenza tra le due soluzioni è significativa, in quanto l'una non è compresa nel range di variazione dell'altra.

Dal Probit (v. Grafico 28) notiamo che le curve proseguono con una andamento parallelo, mantenendo costante la differenza di tossicità.

Qui abbiamo trovato la DL_{50} di contatto. Se confrontiamo il nostro valore con quello pubblicato dalla Commissione Europea (v. Tabella 1), 0,024 $\mu\text{g}/\text{ape}$ (24 ng/ape), notiamo che questo valore è al di sotto del range di variazione di entrambe le soluzioni da noi testate.

DOSE (ng/ape) Alcool	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
7	2	18	11.1
15	4	30	13,33333
30	47	90	52,22222
60	73	96	76,04167
125	28	30	93,33333
250	6	6	100
	DL₅₀		
	30	Range (25 – 35)	

Tabella 3.23 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Thiamethoxam diluito in alcool assoluto

DOSE (ng/ape) Alcool + acqua	MORTI (n)	TOTALE	% MORTI
7	1	18	5.5
15	3	18	16,66667
30	10	60	16,66667
60	13	60	21,66667
125	29	42	69,04762
250	6	6	100
	DL₅₀		
	94	Range (74 –133)	

Tabella 3.24 dati sulla mortalità e tossicità riferiti al p.a. Thiamethoxam diluito in alcool e alcool 50%

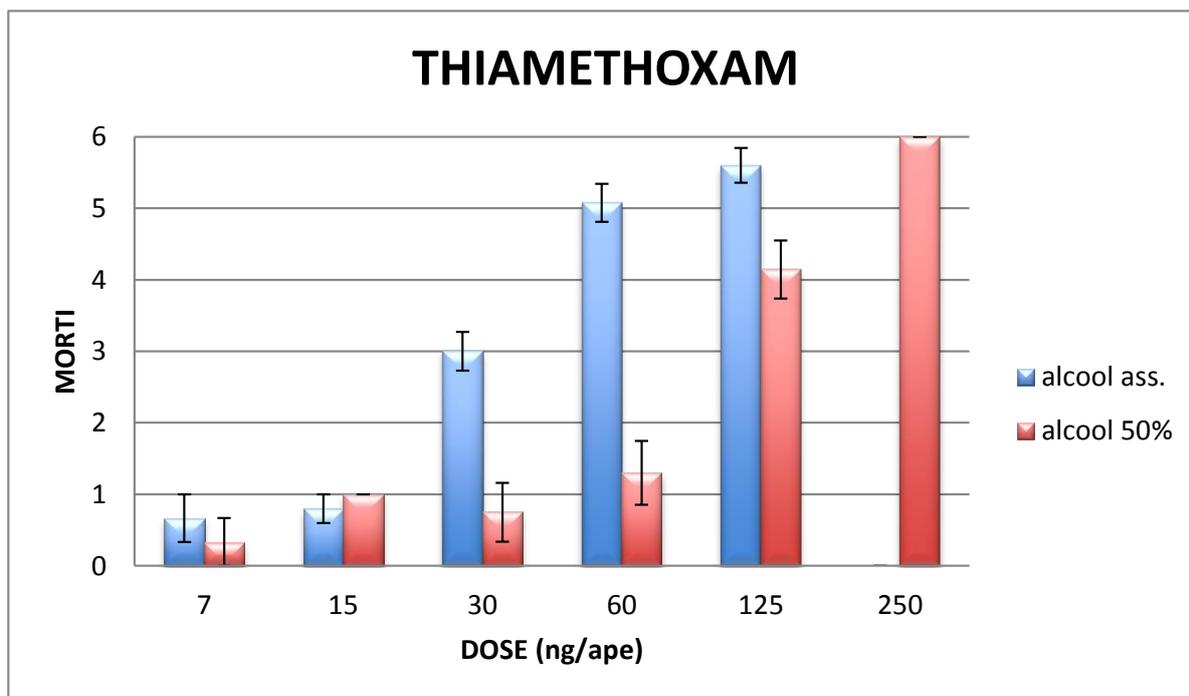


Grafico 3.27 mortalità api espressa con la media ed errore relativo

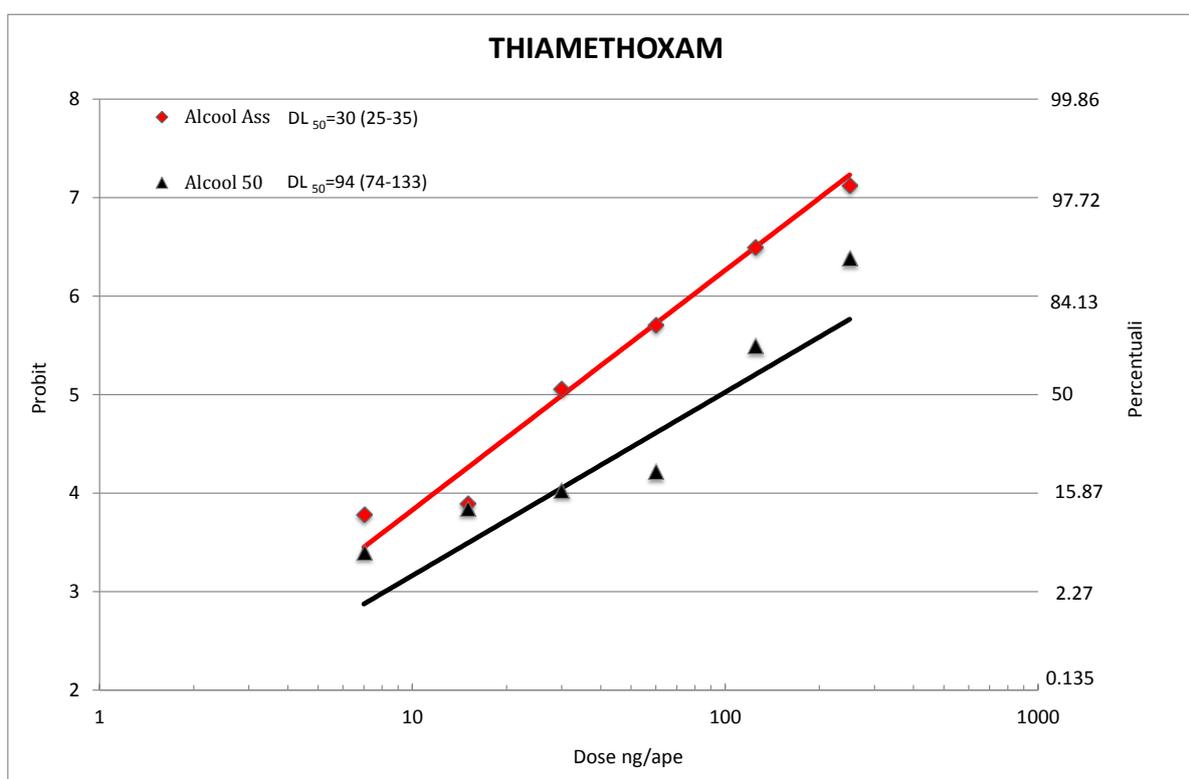


Grafico 3.28 probit p.a. Thiamthoxam esprime la DL_{50} confrontando il p.a. in soluzione alcolica e idroalcolica

4. CONCLUSIONI

Questo progetto di tesi fa parte di un lavoro più ampio che si prefigge di studiare gli effetti delle polveri concianti sulla moria delle api.

Inizialmente le api venivano trattate con l'utilizzo di polveri poste sull'addome, in quanto, essendo formato da uriti, le scaglie delle polveri potevano incastrarsi ed essere trattenute con facilità dall'addome dell'ape. In questa posizione, l'ape non era in grado di mangiarle e liberarsi dalla polvere. Questa tecnica risultava ottima per lo studio delle polveri ma creava seri problemi per lo studio di insetticidi in forma liquida. Le analisi effettuate dal Dipartimento di Chimica dell'Università di Padova, ci hanno permesso di constatare che la somministrazione del prodotto sul torace dell'ape anziché sull'addome, era molto più precisa. Le analisi qui sotto ci hanno confermato che la tecnica utilizzata per il drogaggio è valida ma bisogna prestare attenzione in quanto le ali dell'ape fungono da vettore per il risucchio del prodotto in soluzione alcolica posizionato sul torace dell'ape da parte dell'aspiratore compromettendo in parte le prove.

I campioni analizzati sono stati addormentati con CO₂, drogati con 2,5 µL in soluzione alcolica con 60 ng di Thiamethoxam.

Sono stati effettuati anche dei campioni di carta trattato ciascuno con 60 ng di Thiamethoxam.

Risultati api addormentate con CO₂, drogate con 60 ng/ape Thiamethoxam

CAMPIONE	CARTA (ng)	STANDARD (ng/ape)
APE 1	79.9	53.2
APE 2	63.2	60.6
APE 3	72.2	61.3
APE 4	79.7	61.6
APE 5	72.8	65.9
APE 6		56.5

Tabella 4.25 analisi chimiche sul drogaggio

Nella tabella 26 facciamo un riassunto delle DL₅₀ trovate per i vari p.a. suddivisi per classe chimica di appartenenza per rendere più immediata, da parte del lettore, il confronto delle tossicità.

Come possiamo notare, all'interno delle classi chimiche, le tossicità sono simili e non si discostano tanto le une dalle altre.

Tra i neonicotinoidi il prodotto a tossicità più elevata è il Clothianidin in soluzione idroalcolica e il Thiamethoxam in soluzione alcolica.

Tra i fosfororganici il Chlorpyrifos è il prodotto con la più alta tossicità.

Nel complesso, il principio attivo con la più alta tossicità acuta per contatto risulta essere il Fipronil con una DL₅₀ di 8 ng/ape, ben 4 volte inferiore ai neonicotinoidi, 10 volte rispetto ai fosfororganici e piretroidi.

L'idrosolubilità di queste molecole in acqua potrebbe avere una certa influenza tra i neonicotinoidi e i fosfororganici, in quanto la forbice che si crea tra le DL₅₀ della soluzione alcolica e idroalcolica, aumentano con l'aumentare della solubilità in acqua. Ciò non si verifica però per la Deltametrina e Fipronil; quest'ultimo, probabilmente dovuta all'altissima tossicità. il Dimetoato è il p.a. con solubilità in acqua più elevata, 23,3 g/L, mentre la Deltametrina è quello meno idrosolubile, con una solubilità di appena 2×10^{-7} g/L.

I sintomi di avvelenamento che si notano sulle api drogate sono distinti a seconda della classe chimica di cui fa parte il prodotto testato.

I sintomi di intossicazione da neonicotinoide osservati sono visibili fin da subito ad alte concentrazioni di principio attivo, e sono l'anormale e irregolare inarcamento dell'addome seguito da blocco delle ali, causato dalla paralisi dei muscoli del torace, con tempi diversi in base al tipo di insetticida.

Differenti i sintomi che si presentano in api drogate con fosfororganici. L'ape appare stordita e si muove alla rinfusa girando su se stessa.

NEONICOTINOIDI	FOSFORGANICI	PIRETROIDI	FENILPIRAZOLI
IMIDACLOPRID DL₅₀ (alcool): 44 DL₅₀ (alcool 50%): 118 Solubilità: 0.61	DIMETOATO DL₅₀ (alcool): 81 DL₅₀ (alcool 50%): 211 Solubilità: 23.3	DELTAMETRINA DL₅₀ (alcool): 87 DL₅₀ (alcool 50%): 177 Solubilità: 2×10^{-7}	FIPRONIL DL₅₀ (alcool): 8 DL₅₀ (alcool 50%): 8.5 Solubilità: 3×10^{-3}
CLOTHIANIDIN DL₅₀ (alcool): 33 DL₅₀ (alcool 50%): 67 Solubilità: 0.34	CHLORPYRIFOS DL₅₀ (alcool): 60 DL₅₀ (alcool 50%): 96 Solubilità: 1.05×10^{-3}		
THIAMETHOXAM DL₅₀ (alcool): 30 DL₅₀ (alcool 50%): 94 Solubilità: 4.1			

Tabella 4.26 riassunto DL₅₀ e solubilità in acqua dei prodotti testati suddivisi per classe chimica

Per meglio valutare la reale tossicità di questi prodotti su ape, abbiamo creato un parametro: il coefficiente di tossicità.

Questo parametro, esprime il numero di api che potrebbero potenzialmente morire ad ettaro su una superficie trattata con i prodotti in questione, ipotizzando che l'intero prodotto utilizzato per il trattamento aereo finisca sulle api. Il calcolo è semplice: consiste nel dividere la quantità di principio attivo contenuta in 10 hl di acqua (quantità utilizzata per trattare 1 ha di terreno) per la DL₅₀ del p.a. In questo modo otteniamo il coefficiente di tossicità che ci esprime il numero di api che potenzialmente potrebbero morire. L'utilità è molto alta, in quanto possiamo osservare che non sempre il prodotto a più alta tossicità è anche quello più pericoloso, ma tutto dipende oltre che dalla tossicità, anche dalla quantità che viene utilizzata per il trattamento.

Nonostante i neonicotinoidi siano i prodotti più tossici per le api (eccetto Fipronil), non sono quelli potenzialmente più pericolosi. Come possiamo notare dal Grafico 29, i fosfororganici si mostrano potenzialmente più pericolosi viste le più alte dosi utilizzate per il trattamento.

PRINCIPIO ATTIVO	DOSE ha (g/ha, ml/ha)	QUANTITA' DI P.A. (g/ha)	DL₅₀ (ng/ape)	COEFFICIENTE DI TOSSICITA' (api morte/ha)
Chlorpyrifos <i>Dursban 75 WG</i>	650-750	487-562	60	8,7 x 10 ⁹
Dimetoato <i>Rogor</i>	500-700	202-283	81	3 x 10 ⁹
Imidacloprid <i>Confidor 200 SL</i>	500	100	44	2,27 x 10 ⁹
Thiamethoxam <i>Actara 25 WG</i>	200-450	50-112	30	2,7 x 10 ⁹
Clothianidin <i>Dantop 50 WG</i>	80-225	40-112	33	2,3 x 10 ⁹
Deltametrina <i>Decis</i>	300-500	7,5-12,5	87	1,15 x 10 ⁸
Fipronil <i>Regent 200 SC*</i>	400	80	8	1 x 10 ¹⁰

Tabella 4.27 valori dei coefficienti di tossicità dei relativi prodotti commerciali

*non utilizzabile in Italia

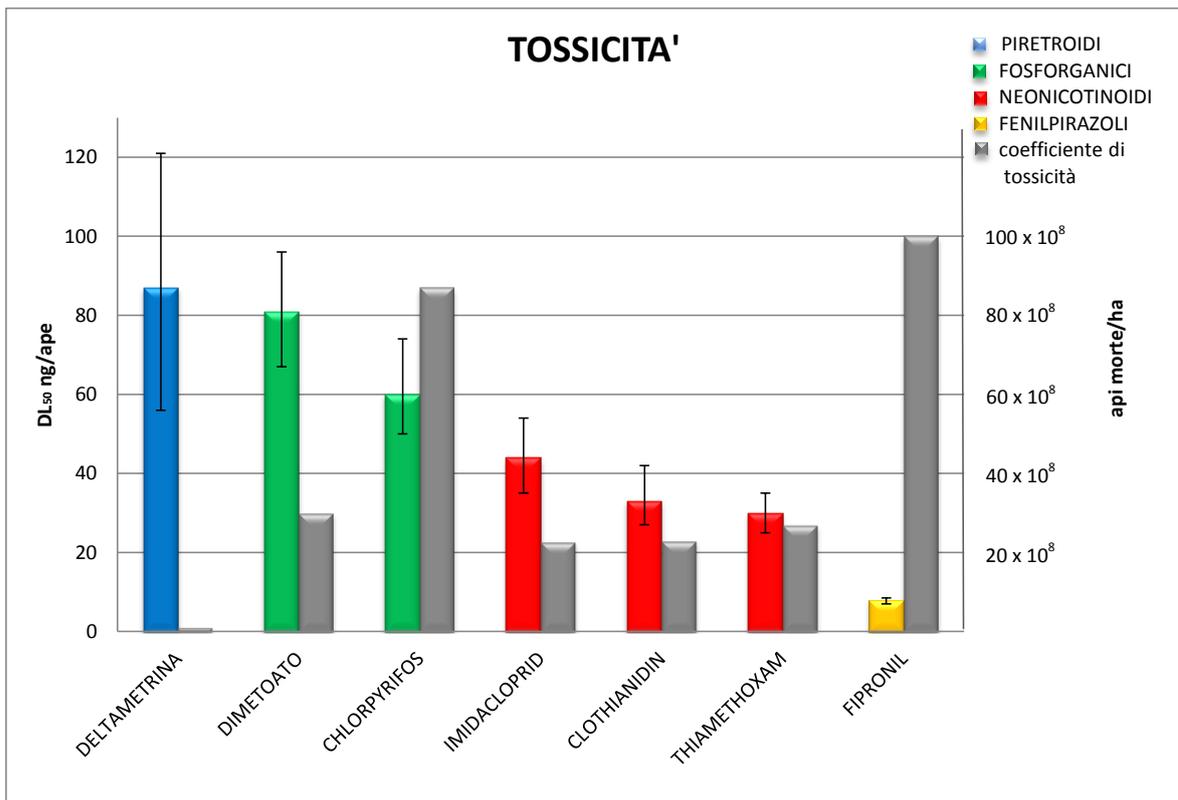


Grafico 4.29 confronto tra DL₅₀ con relativi range di variazione e coefficiente di tossicità

Tra le ipotesi fatte nella premessa di questo lavoro, avevamo ipotizzato una possibile influenza della temperatura e dell'umidità sulla sopravvivenza dell'ape drogata. Dai test effettuati abbiamo verificato che l'umidità non condiziona la sopravvivenza dell'ape nonostante le piccole differenze rilevate. Anche la temperatura non dà differenze significative nonostante le discrepanze viste alle temperature di 20 °C e 30 °C; siamo comunque portati a pensare che a temperature inferiori ai 20 °C l'ape abbia più difficoltà a sopravvivere, dovuto al fatto che il metabolismo rallenta e la detossificazione è minore.

5. BIBLIOGRAFIA

“AVIS de l’Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail relatif à une demande de modification des conditions d’emploi pour la préparation phytopharmaceutique CRUISER 350”, n.d., <http://www.anses.fr/cgi-bin/countdocs.cgi?Documents/DPR2010ha1332.pdf>.

“Conseil d’État N° 336647 Publié au recueil Lebon 3ème et 8ème sous-sections réunies M. Jacques Arrighi de Casanova, président Mme Emilie Bokdam-Tognetti, rapporteur M. Edouard Geffray, rapporteur public SCP BARTHELEMY, MATUCHANSKY, VEXLIARD, avocats”, n.d., <http://arianeinternet.conseil-etat.fr/arianeinternet/ViewRoot.asp?View=Html&DMode=Html&PushDirectUrl=1&Item=3&fond=DCE&texte=cruiser&Page=1&querytype=simple&NbEltPerPages=4&Puriels=True>.

“Spécialité : CRUISER 350 Société: SYNGENTA AGRO S.A.S Numéro d’autorisation: 2090190 Famille: Produits Phytopharmaceutiques (Produit de référence) Formulation: SUSPENS. CONC. TRAIT. SEMENCES Composition de la spécialité: Thiamethoxam 350. G/L”, n.d., <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/spe/2090190-10023318.htm>.

2008. DECRETO 17 settembre 2008. Sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego per la concia di sementi, dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil, ai sensi dell'articolo 13, comma 1, del decreto del Presidente della Repubblica 23 aprile 2001, n. 290. (G.U. Serie Generale n. 221 del 20 settembre 2008).

2009. DECRETO 14 settembre 2009 Proroga della sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego per la concia di sementi dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil. (09A10906) - GU n. 218 del 19-9-2009. Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

2009. Fissazione del limite temporale relativo alla sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego per la concia di sementi dei prodotti fitosanitari

contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid, fipronil, ai sensi dell'articolo 14, comm. 1, del Decreto del Presidente della Repubblica 23 aprile 2001, n 290 di cui al Decreto Dirigenziale del 17 settembre 2008. Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

2009. Revoca della sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego per la concia di sementi di barbabietola da zucchero dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil di cui al decreto dirigenziale del 17 settembre 2008. Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali

2010. Decreto 16 settembre 2010 Proroga della sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego, per la concia di sementi, dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil, di cui al decreto dirigenziale 14 settembre 2009. (10A11316) (G.U. Serie Generale, n. 219 del 18 settembre 2010).

2011. Decreto 25 ottobre 2011 Proroga della sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego per la concia di sementi dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil, di cui al decreto 28 giugno 2011. (11A14273) (G.U. Serie Generale, n. 254 del 31 ottobre 2011)

2011. Decreto 28 giugno 2011 Proroga della sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego per la concia di sementi dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil, di cui al decreto dirigenziale del 16 settembre 2010. (11A08962) (G.U. Serie Generale, n. 150 del 30 giugno 2011)

2012. Decreto 25 giugno 2012 Proroga della sospensione cautelativa dell'autorizzazione all'impiego di sementi trattate con prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil, di cui al decreto 25 ottobre 2011. (12A07361) (G.U. Serie Generale, n. 151 del 30 giugno 2012). Ministero della Salute

- A. Tapparo, D. Marton, C. Giorio, A. Zanella, L. Soldà, M. Marzaro, L. Vivian and V. Girolami. Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. Environmental science & technology
- Amrith S. Gunasekara and Tresca Troung. Environmental Fate of Fipronil. Environmental Monitoring Branch Department of Pesticide Regulation 1001 I Street California Environmental Protection Agency Sacramento, CA 95812, USA Revised March 5, 2007. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/fipronilrev.pdf>
- APAT - Agenzia per la protezione dell' ambiente e per i servizi tecnici. SINDROME DELLO SPOPOLAMENTO DEGLI ALVEARI. 29 Gennaio 2008
- APOidea. Rivista italiana di apicoltura, n.2/2008. Volume 5.
- Bessen Chemical, dimethoate, <http://www.chinese-pesticide.com/insecticides/dimethoate.html>
- Claudia Pecoraro. Le api, affascinanti animaletti della mitologia. <http://www.tanogabo.it/mitologia/vari/api.htm>
- Colony Collapse Disorder: European Bans on Neonicotinoid Pesticides <http://www.epa.gov/opp00001/about/intheworks/ccd-european-ban.html>
- Concianti, cosa succede in Francia. Continuano nel Paese transalpino le sentenze di annullamento di autorizzazioni di concianti con neonicotinoidi. <http://agronotizie.imagelinenetwork.com/normativa/2011/10/20/concianti-cosa-succede-in-francia/14226>. 20 ottobre 2011
- CRA-API. Relazione sull'attività svolta e sui risultati ottenuti nell'ambito del progetto APENET per la tematica "Effetti del mais conciato sulle api". 6 ottobre 2011
- D. vanEngelsdorp, M. Doris Meixner. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. Journal of invertebrate pathology 103: s80-s95.

Dennis vanEngelsdorp, Jay D. Evans, Claude Saegerman, Chris Mullin, Eric Haubruge, Bach Kim Nguyen, Maryann Frazier, Jim Frazier, Diana Cox-Foster, Yanping Chen, Robyn Underwood, David R. Tarpy, Jeffery S. Pettis. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. Plos ONE 2009; 4: e6481.

Dimethoate. FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES.http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/dimet_hoa.pdf (ultimo accesso 10 settembre 2012).

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE GENERAL. Directorate D - Food Safety: Production and distribution chain Unit D.3 - Chemicals, contaminants and pesticides. Chlorpyrifos SANCO/3059/99 - rev. 1.5 3 June 2005 http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/index_en.htm (ultimo accesso 8 settembre 2012).

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE GENERAL. Directorate E - Safety of the food chain Unit E.3 - Chemicals, contaminants and pesticides. Dimethoate SANCO/10047/2006 final - 17 November 2006.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE GENERAL. Directorate E - Food Safety: Production and distribution chain Unit E.3 - Chemicals, contaminants and pesticides. Clothianidin SANCO/10533/05 - final 18 January 2005.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE GENERAL. Directorate D - Safety of the food chain Unit D.3 - Chemicals, contaminants and pesticides. Fipronil SANCO/10033/2006 final rev 1 12 March 2010.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE GENERAL. Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions E1 - Plant health. Delamethrin 6504/VI/99-final - 17 October 2002.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE
GENERAL. Directorate E - Food Safety: Production and distribution chain Unit E.3 -
Chemicals, contaminants and pesticides. Imidacloprid SANCO/108/08 – rev. 1 - 20
June 2008.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE
GENERAL. Directorate E - Food Safety: Production and distribution chain Unit E.3 -
Chemicals, contaminants and pesticides. Thiamethoxam SANCO/10390/2002 – rev.
Final 14 July 2006.

Extension Toxicology Network Pesticide Information Profiles,
<http://extoxnet.orst.edu/pips/dimethoa.htm>.

FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES,
imidacloprid, [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Imidacloprid08.pdf)
[Pesticides/Specs/Imidacloprid08.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Imidacloprid08.pdf) (ultimo accesso 10 settembre 2012).

FAOSTAT. Beehives stocks in Italy year 2010.
<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor> (ultimo
accesso 30 agosto 2012).

Fipronil, [http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---](http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---F/Fipronil.htm)
[F/Fipronil.htm](http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---F/Fipronil.htm) (ultimo accesso 10 settembre 2012).

Fipronil. FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES.
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/S](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/fipronil09.pdf)
[pecs/fipronil09.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/fipronil09.pdf) (ultimo accesso 10 settembre 2012).

Fipronil. [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2001_eva/08%](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2001_eva/08%20Fipronil.pdf)
[20Fipronil.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2001_eva/08%20Fipronil.pdf) (ultimo accesso 10 settembre 2012).

Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. Natural
Resources Institute, University of Greenwich at Medway, Central Avenue, Chatham
Maritime, Kent ME4 4TB, UK. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442503>

Hendricks P, Chauzat MP, Debin M, Neuman P, Fries I, Ritter W, Brown M, Mutinelli F, Le Conte Y, Gregorc A. 2009. *Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe*. EFSA Scientific Report 1-217.

Imidacloprid. FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Imidacloprid08.pdf (ultimo accesso 10 settembre 2012).

Ingo TORNIER, Annette KLING, Andrea SCHUR. Honey bee testing in Southern Europe: from the laboratory to the relevant crop in the field. *GAB Biotechnologie GmbH, Niefern-Öschelbronn, Germany*. Bulletin of Insectology 56 (1): 185-187, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS 2012. <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, 19 de julho de 2012.

Kaplan K. Colon collapse disorder - A complex buzz (Reprinted from Agricultural Research, May/June. 2008. American Bee Journal, 148: 617-618.

Kluser S, Peduzzi P. "Global Pollinator Decline: A Literature Review". UNEP/GRIDEurope. © UNEP 2007.

M. Marzaro, L. Vivian, A. Targa, L. Mazzon, N. Mori, M. Greatti, E. Petrucco Toffolo, A. di Bernardo, C. Giorio, D. Marton, A. Tapparo, V. Girolami. 2011. Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. Bulletin of Insectology 64 (1): 119-126.

Ministero della Salute. Confermata la sospensione dei neonicotinoidi per la concia del mais. Comunicato n. 145 – 26 giugno 2012.

Muccinelli. Prontuario degli agrofarmaci. Dodicesima edizione.

Mutinelli F. 2008. La sindrome dello spopolamento degli alveari o colony collapse disorder. IASMA Notizie. 7 (3): 1-4.

PAN Pesticides Database – Chemicals, dimethoate http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33349 (ultimo accesso 6 settembre 2012).

- Panella F. Hanno fatto un deserto e lo hanno chiamato...agricoltura!. Dossier U.N.A.API 2007; 1-15.
- Piotr MEDRZYCKI, Rebecca MONTANARI, Laura BORTOLOTTI, Anna Gloria SABATINI, Stefano MAINI, Claudio PORRINI. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. Bulletin of Insectology 56 (1): 59-62.
- Todisco A. *Introduzione*. In Atti del Workshop “Sindrome dello spopolamento degli alveari”. Ed. V. Bellucci, 7. Roma 2008.
- V. Girolami, M. Marzaro, L. Vivian, L. Mazzon, C. Giorio, D. Marton & A. Tapparo. 2012. Aerial powdering of bees inside mobile cages and the extent of neonicotinoid cloud surrounding corn drillers. Journal of applied entomology. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2012.01718.x
- V. Girolami, M. Marzaro, L. Vivian, L. Mazzon, M. Greatti, C. Giorio, D. Marton & A. Tapparo. 2012. Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. Journal of applied entomology. 136: 17-26.
- vanEngelsdorp D, Cox-Foster D, Frazier M, Ostiguy N, Hayes J. “*Fall-Dwindle Disease*”: *Investigations into the causes of sudden and alarming colony losses experienced by beekeepers in the fall of 2006*. Rexrod C., USDA’s ARS, Statement before the Subcommittee on Horticulture and Organic Agriculture, U.S. House of Representative 2007; 1-2
- vanEngelsdorp D, Hayes J, Jr., Underwood RM, Pettis J. 2008. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the US, Fall 2007 to Spring 2008. Plos One. 3: e4071

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Vincenzo Girolami per la disponibilità mostratami, i Dottori Matteo Marzaro e Letizia Rossignolo per avermi aiutato a portare a termine questo progetto con tanta dedizione.

Un ringraziamento particolare alla mia famiglia, che mi ha dato la possibilità di compiere questa esperienza e portare a termine questi 3 anni.

