

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



**FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA

**VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DELLE API AGLI
INSETTICIDI NEONICOTINOIDI PRESENTI NEL
PARTICOLATO EMESSO DURANTE LA SEMINA DI
MAIS CONCIATO**

RELATORE: Prof. Andrea Tapparo

CONTRORELATORE: Prof. Andrea Trevisan

LAUREANDA: Ketty Costacurta

N° MATRICOLA: 584676-CH

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE

PREMESSA	V
1 INTRODUZIONE	
1.1 Colony Collapse Disorder (CCD) o sindrome da spopolamento degli alveari	1
1.2 Neonicotinoidi impiegati nella concia dei semi di mais	6
1.2.1 Caratteristiche generali dei principi attivi insetticidi	6
1.2.2 Modalità d'azione ed effetti dei neonicotinoidi sulle api	8
1.3 Provvedimenti normativi sull'utilizzo dei neonicotinoidi ed altri insetticidi	11
1.4 Dispersione e destino ambientale dei principi attivi insetticidi	13
1.4.1 Semina e polveri	13
1.4.2 La guttazione fogliare	15
1.4.3 La concia delle sementi	17
1.4.4 Persistenza, degradazione e destino ambientale	18
1.5 Cenni sui metaboliti rintracciabili in api ed altre matrici biologiche	21
2 MATERIALI E METODI	
2.1 Materiali	27
2.2 Procedure Sperimentali	29
2.2.1 Preparazione di soluzioni standard ad elevata concentrazione dei diversi principi attivi	29
2.2.2 Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione strumentale	30
2.2.3 Preparazione di diverse matrici per l'analisi dei neonicotinoidi	30
2.2.4 Campionamento del particolato durante simulazioni di semina di mais conciato	32
2.2.5 Metodo di somministrazione di principio attivo in api vive	34
2.2.6 Analisi del contenuto di principio attivo in diverse matrici ambientali mediante UFLC	35

3	RISULTATI E DISCUSSIONE	
3.1	Dispersione dei principi attivi insetticidi durante la semina di mais conciato	37
3.1.1	Misura della concentrazione di principio attivo in corrispondenza dello scarico dell'aspiratore centrifugo della seminatrice	37
3.1.2	Valutazione della concentrazione di principio attivo nelle polveri aerodisperse a 5 e 10 metri di distanza dalla seminatrice	41
3.1.3	Distribuzione dimensionale del particolato atmosferico generato dalle seminatrici	45
3.2	Analisi dei residui di principio attivo in campioni di api esposte al particolato di semina	47
3.2.1	Verifica del contenuto di insetticidi in api che hanno sorvolato il campo di semina	48
3.2.2	Esposizione diretta delle api (in gabbia) allo scarico della seminatrice	50
3.2.3	L'umidità come fattore determinante la tossicità dei neonicotinoidi	57
3.3	Degradazione dei principi attivi e formazione di metaboliti	60
3.3.1	Test di degradazione dei principi attivi nelle api	60
3.3.2	Analisi della formazione di metaboliti dai principi attivi neonicotinoidi	69
4	CONCLUSIONI	75
5	BIBLIOGRAFIA	77
6	RINGRAZIAMENTI	81

PREMESSA

L'Apis mellifera, detta anche ape domestica, è da considerare uno degli insetti più importanti per l'uomo. Essa non si limita alla sola produzione di miele e altre materie prime ma è anche dedita ad un silente lavoro quale l'impollinazione. L'ape, infatti, riveste un ruolo di fondamentale importanza nella produzione della maggior parte dei prodotti agricoli impollinando piante da frutto e ortaggi. Per alcune piante l'adattamento ambientale si è spinto ad un punto tale che oggi, senza l'intervento delle api, non sarebbe più possibile la loro fecondazione. Per molte altre essa può avvenire ugualmente ma si è riscontrato che l'intervento di questi insetti ne aumenta la quantità e la qualità dei frutti. Oltre ad impollinare le piante di interesse economico, le api svolgono anche un importante ruolo nella formazione e conservazione dell'ambiente, contribuendo al mantenimento della biodiversità delle specie vegetali e preservando altresì quest'ultime dalla possibile estinzione.

Purtroppo, malattie ed avvelenamenti hanno sempre rappresentato delle minacce alla vita delle api limitandone la proliferazione in determinati periodi del passato tuttavia le anormali e pesanti morie verificatesi nel mondo negli ultimi anni, in particolare fra il 2005 e il 2008, hanno creato un certo allarme tanto da indurre molti ricercatori ad intraprendere vari studi per comprenderne le cause scatenanti. A questo fenomeno, che è probabilmente imputabile a diversi fattori, è stato dato il nome di Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari. Uno dei fattori presi maggiormente in considerazione è l'utilizzo di insetticidi neonicotinoidi di nuova generazione in agricoltura, in quanto, durante lo spazio di tempo in cui sono stati impiegati, si è notato un incremento di api morte e scomparse.

I neonicotinoidi hanno avuto un grosso successo grazie alla loro elevata selettività per gli insetti rispetto ai mammiferi. Essi vengono comunemente somministrati alle colture mediante tecniche a spruzzo o come concianti per i semi di mais ed altre colture. In quest'ultimo caso essi vengono rilasciati nell'ambiente mediante due processi: primariamente durante l'atto della semina, essendo la pellicola che li lega ai semi stessi molto delicata e facilmente disgregabile per attrito meccanico; in secondo luogo attraverso il fenomeno guttativo, un processo naturale nel quale piccole gocce d'acqua

fuoriescono dalla piantina, nata da pochi giorni, ricca nel principio attivo usato per la concia del seme; queste soluzioni si rendono così disponibili come fonte di acqua per i vari insetti presenti.

E' attraverso questi due meccanismi di esposizione che le api possono intossicarsi, provocando all'insetto la perdita dell' orientamento e, nel caso di maggiore contaminazione, ad una fase di spasmi seguita da morte per paralisi.

Questo lavoro di tesi, effettuato in collaborazione con il Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova, si è focalizzato sul campionamento e l'analisi di api esposte a polveri aerodisperse emesse durante l'attività di semina, anche mediante la caratterizzazione delle polveri stesse prodotte da differenti tipi di seminatrici. Nelle semine effettuate in campo per questo lavoro di tesi sono stati utilizzati semi di mais confettati con differenti principi neonicotinoidi quali: Imidacloprid, Clothianidin e Thiamethoxam.

E' stata inoltre effettuata un'indagine per quantificare la degradazione dei principi attivi insetticidi in api morte a seguito della contaminazione in campo o drogate in laboratorio, simulando le differenti condizioni climatiche ambientali. Nel corso di questi esperimenti si è anche studiata la formazione nel tempo di Clothianidin, il principale metabolita dell'insetticida Thiamethoxam.

1 INTRODUZIONE

1.1 Colony Collapse Disorder (CCD) o sindrome da spopolamento degli alveari

L'apicoltura, in base ai dati FAO e APIMONDIA, è presente in quasi tutti i Paesi del mondo con oltre 60 milioni di alveari appartenenti a circa 6.5 milioni di apicoltori. La densità maggiore di questi allevamenti si registra ancor oggi in Europa con circa 2.8 alveari per Km².

In Italia sono presenti circa 1'100'000 alveari dai quali deriva, sia in maniera diretta che come impollinatrici, un valore economico dell'ordine di 1'600 milioni di euro l'anno, pari a 1'240 euro annui



Figura 1.1.1 *Apis mellifera* durante la raccolta del polline

per singolo alveare. Nel mondo si stima che il valore economico dell'impollinazione si attesti tra i quaranta e i cento miliardi di euro l'anno ma vi sono altre fonti che azzardano valori che toccano i 215 miliardi di dollari annui. [1; 2]

Per quanto concerne poi il miele, nel 2005 la produzione mondiale ha raggiunto un valore di 1'381'000 tonnellate generando quindi un cospicuo giro d'affari. [3]

Questo quadro d'insieme fa comprendere le motivazioni alla base dell'allarmismo che si è creato in tutto il mondo a partire dai primi anni duemila quando si è cominciata a riscontrare una grave perdita di colonie sia in America che in Europa.

Le morie di api negli alveari non sono infrequenti; una vasta documentazione attesta che nel passato ci sono state numerose perdite di colonie a causa di parassiti, agenti patogeni e malattie. Le infestazioni da acari sono invece un fenomeno relativamente nuovo; i primi episodi verificatisi negli anni '80 hanno visto grandi morie causate dalla *Varroa destructor* e dall'acaro della trachea *Acarapis woodi* mentre successivamente le infestazioni dovute all'acaro Varroa, segnalate a metà degli anni '90 negli Stati Uniti,

hanno causato l'eliminazione della maggior parte delle api selvatiche nord americane.[4]

L'incidenza di queste morie dovute a parassiti ed altre malattie è stata ridotta nel corso dei successivi anni grazie all'uso di antibiotici e ad un aumento dei programmi di ispezione nelle arnie tanto che dalla fine degli anni '90 le morie dovute a questi agenti infestanti si sono ridotte con medie che si attestano tra il 17% e il 20% annuo.

Le perdite di colonie d'api verificatesi nell'ultimo decennio sembrano però differire dalle pregresse morie in quanto, osservando il comportamento delle api sopravvissute, si sono riscontrati sintomi non appartenenti alla sola infestazione parassitaria.[4]

Nel corso dell'inverno 2006 – 2007 molti apicoltori degli USA segnalavano una rilevante moria di colonie di api con perdite comprese fra il 30 ed il 90% e tra il settembre 2006 e il marzo 2007 l'Apiary Inspectors of America (AIA) condusse un programma di sorveglianza su un gran numero di apicoltori sparsi in quindici stati americani per verificare l'entità di queste morie. La perdita delle api tra tutti gli apicoltori contattati da questa organizzazione corrispose mediamente a circa il 38%.

Dai dati raccolti si osservò inoltre che, tra tutti gli apicoltori interpellati, il 50% aveva subito delle morie eccezionalmente elevate all'interno delle loro colonie e di queste il 55% era stato completamente sterminato. Mettendo a confronto questi dati con quelli delle normali perdite invernali, che si collocano al di sotto del 20%, si osserva un evidente e notevole divario.

Episodi di morie di intere colonie si erano però già verificati negli Stati Uniti anche fra il 2002 e il 2005 seppur in maniera meno diffusa. Anche in Europa si erano osservate perdite di intere colonie con una sintomatologia simile a quella descritta negli USA. Perdite estremamente elevate si registrarono nell'inverno 2002 - 2003, stimate nell'ordine del 20% in Francia, del 38% in Svezia, del 30% in Italia e in Germania, su oltre un milione di colonie, ne andarono perdute circa il 32%. [1]

Questa condizione patologica sconosciuta e non identificabile in un singolo fattore, che ha assunto intensità particolarmente preoccupante fra il 2005 ed il 2008, è stata denominata dagli studiosi Colony Collapse Disorder (CCD) ovvero sindrome da spopolamento degli alveari.

I sintomi che caratterizzano gli alveari colpiti da CCD comprendono: (i) una improvvisa scomparsa delle api adulte della colonia e presenza di poche api rimaste in

prossimità della colonia stessa; (ii) la presenza di molti favi con covata opercolata non alterata con bassi livelli di infestazioni da varroa; (iii) la presenza di 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; (iv) una minima presenza di *Aethina tumida*, tarma della cera e (v) la presenza della regina che depone circondata da un piccolo 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 con difficoltà di coordinamento motorio. [1; 5; 6]

Tra le numerose discussioni svolte in campo scientifico le attuali ipotesi sulle cause del CCD prendono fondamentalmente in considerazione quattro tipi di fattori: a) stress di tipo gestionale causato dal metodo di utilizzo delle api come impollinatrici; b) infezioni batteriche, fungine o virali; c) possibili attacchi da parte di parassiti; d) stress di tipo ambientale, causato dall'avvelenamento dovuto a pesticidi agricoli o ai trattamenti antiparassitari delle arnie.

Altre ipotesi avanzate quali l'inquinamento ambientale, le mutazioni climatiche, i campi elettromagnetici e le coltivazioni geneticamente modificate sono state proposte come ulteriori cause riconducibili allo spopolamento degli alveari ma tali fattori appaiono ragionevolmente del tutto marginali se non addirittura irrilevanti e privi di dati consistenti a sostegno.[1; 4]

Le teorie che fanno risalire questi spopolamenti ad uno stress con effetto immunodepressivo sulle api lo descrivono come una combinazione di molteplici situazioni tra cui: 1) una nutrizione di scarso valore proteico dovuta al decremento della biodiversità vegetale e disponibilità di polline o nettare; 2) un sovraffollamento dell'alveare; 3) uno spostamento delle api su lunghe distanze dovuto alla necessità di fornire il servizio di impollinazione. Attraverso il confinamento durante il trasporto, infatti, aumenta il contatto fra colonie di diversi arnie che può portare ad un aumento della trasmissione di agenti patogeni e all'irreversibile ibridazione delle specie autoctone. Proprio per questi motivi i ricercatori sospettano che le condizioni di stress sarebbero in grado di compromettere il sistema immunitario delle api rendendo le colonie più sensibili alle tradizionali malattie.[1; 6]

Tra le cause di tipo infettivo in primo luogo si è posta attenzione alla *Varroa Jacobsoni* e alla *Varroa destructor*, acari parassitari visibili ad occhio nudo che si possono riprodurre solo nella covata delle api.

L'acaro attacca la covata succhiando l'emolinfa ma questo non ne determina il decesso bensì un indebolimento, una diminuzione di peso, deformità, una riduzione della durata di vita e cambiamenti comportamentali al termine dello sviluppo delle



larve. Una conseguenza nefasta della parassitosi è senza dubbio il fatto che l'indebolimento

Figura 1.1.2 Pupa di ape attaccata da *Varroa*

aumenta la sensibilità delle api alle infezioni fungine, batteriche e virali.[7;8]

Numerose analisi biomolecolari effettuate sul contenuto intestinale di api infette hanno inoltre portato alla determinazione della presenza del parassita *Nosema apis* e della variante asiatica *Nosema ceranae*, funghi parassitari unicellulari che attaccano l'intestino dell'ape adulta.[1]

Si è visto inoltre che, la combinazione di pesticidi neonicotinoidi con un comune parassita delle api quale *Nosema apis*, ha un effetto sinergico sulla "immunità sociale" dell'arnia inibendo la produzione di sostanze sterilizzanti per il cibo e rendendo così la colonia meno resistente all'attacco di altri agenti patogeni a lungo termine.[9]

Nel tentativo di porre rimedio a queste inspiegabili morie 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 state inoltre le correlazioni, segnalate frequentemente in diversi stati europei, fra le semine primaverili di mais impieganti sementi "conciate" con principi attivi insetticidi neonicotinoidi e le repentine morie negli alveari situati nei dintorni.[1]

Appare pertanto evidente che il fenomeno della scomparsa delle api rappresenta una seria minaccia per l'intera società, così come per la biodiversità e per l'agricoltura. Minacce queste che, se sommate, invocano e giustificano immediate azioni di approfondimento e conseguenti interventi di controllo.

A livello nazionale sono stati compiuti grossi sforzi per trovare soluzioni al problema. A livello legislativo, l'uso delle sementi conciate con insetticidi neonicotinoidi è stato sospeso con il DM del 17 settembre 2008 e successive proroghe. Contemporaneamente è stato creato un coordinamento fra i vari Istituti di Ricerca presenti sul territorio con l'istituzione del progetto "APENET", coordinato dal Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-API) 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.

I risultati ottenuti dal monitoraggio condotto da Apenet in questi ultimi anni, hanno portato ad osservare una decisa diminuzione nelle segnalazioni di grosse morie e spopolamenti degli alveari legati alla semina impiegante semi conciate. Nelle primavere 2010 e 2011 in Italia, infatti, non sono stati segnalati episodi di morie essendo stato rispettato il divieto, tuttora in vigore, di utilizzo di sementi di mais conciate con i neonicotinoidi.[10]

I risultati fin qui ottenuti fanno quindi ben sperare per un costante e progressivo miglioramento della compatibilità fra le pratiche agricole e quelle apistiche e ad una riduzione o, ancor meglio, all'eliminazione di uno dei principali fattori incriminati per la sindrome del collasso degli alveari.

1.2 Neonicotinoidi impiegati nella concia dei semi di mais

1.2.1 Caratteristiche generali dei principi attivi insetticidi

Si è sempre cercato di controllare la proliferazione di parassiti in modo da proteggere i raccolti fin dall'antichità e per questo motivo si sono sviluppati nel tempo sempre più mirati ed efficaci insetticidi. Negli ultimi due decenni, il mercato degli insetticidi è stato dominato da tre grandi classi chimiche: gli organofosfati, i quali agiscono come neurotossine; i carbammati e i piretroidi, che agiscono attraverso l'inibizione enzimatica. Ad oggi però, l'efficacia è stata limitata in quanto gli insetti hanno sviluppato una buona resistenza alle tre categorie sopra citate, e questo ha portato all'introduzione di una nuova classe di insetticidi sistemici, i neonicotinoidi.

Tre dei quattro principi attivi insetticidi indagati in questo lavoro di tesi fanno parte della famiglia dei neonicotinoidi, mentre il Fipronil (solo citato), fa parte di quella dei Fenilpirazoli.

Di seguito vengono riportate alcune informazioni riguardanti i principi attivi insetticidi studiati in questo lavoro di tesi.[25]

Tabella 1.2.1: Proprietà chimico-fisiche dei principi attivi studiati

Principio Attivo	MM (g/mol)	Punto di fusione (°C)	Densità (g/mL)	Solubilità in acqua a 20°C (mg/L)	Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (a pH 7, 20°C)		Pressione di vapore a 25°C (mPa)	Costante di Henry a 25°C (Pa m ³ mol ⁻¹)
					K _{ow}	log K _{ow}		
Thiamethoxam	291.71	139.1	1.57	4100	0.741	-0.13	6.60 x 10 ⁻⁰⁶	4.70 x 10 ⁻¹⁰
Clothianidin	249.70	176.8	1.61	340	8.04	0.905	2.8 x 10 ⁻⁰⁸	2.90 x 10 ⁻¹¹
Imidacloprid	255.66	144	1.54	610	3.72	0.57	4.0 x 10 ⁻⁰⁷	1.70 x 10 ⁻¹⁰
Fipronil	437.15	203	1.71	3.78	5620	3.75	0.002	2.31 x 10 ⁻⁰⁴

I punti di ebollizione non sono riportati tra le caratteristiche chimico-fisiche perché questi principi attivi degradano a temperature inferiori.

Tabella 1.2.2 Formula di struttura, formula chimica e nome IUPAC dei p.a. indagati

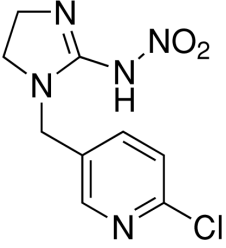
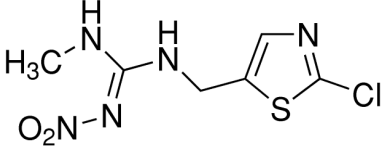
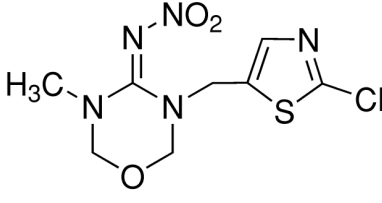
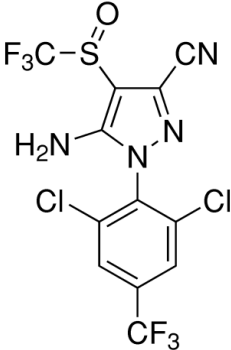
Nome	Nome IUPAC Formula bruta Peso molecolare	Formula
<p>Imidacloprid <i>Nome commerciale: Gaucho</i></p>	<p>1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine C₉H₁₀ClN₅O₂; MM=255.7</p>	
<p>Clothianidin <i>Nome commerciale: Poncho</i></p>	<p>(E)-1-(2-Chloro-5-thiazolylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine C₆H₈ClN₅O₂S; MM=249.7</p>	
<p>Thiamethoxam <i>Nome commerciale: Cruiser</i></p>	<p>3-(2-Chloro-5-thiazolylmethyl)tetrahydro-5-methyl-N-nitro-4H-1,3,5-oxadiazin-4-imine C₈H₁₀ClN₅O₃S; MM=291.71</p>	
<p>Fipronil <i>Nome commerciale: Regent</i></p>	<p>(±)-5-amino-1-(2,6-dichloro-α,α,α-trifluoroparatolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile C₁₂H₄Cl₂F₆N₄O_S; MM=437.15</p>	

Tabella 1.2.3: Caratteristiche tossicologiche ed eco tossicologiche dei p.a. indagati

Principio Attivo	Tossicità per le api		Frase di rischio EC	Frase di sicurezza EC
	LD50 (48 h) orale (ng/ape)	LD50 (48 h) per contatto (ng/ape)		
Thiamethoxam	5.0 ^a	29.9 ^e	R22 R50/53	S2, S60, S61
Clothianidin	3.77 ^a	21.8 ^e	R22 R50/53	S2, S46, S60, S61
Imidacloprid	3.7 ^a	17.9 ^e	R22 R50, R53	S2, S22, S57, S60, S61
Fipronil	4.17 ^d	5.93 ^d	R23/24/25, R48/25, R50, R53	S1/2, S28, S36/37, S45, S60, S61

aRiferimento [11]; bRiferimento [12]; cRiferimento [13]; dRiferimento [8]; eRiferimento [9].

1.2.2 Modalità d'azione ed effetti dei neonicotinoidi sulle api

L'efficacia degli insetticidi è dovuta al fatto che essi riescono a penetrare e ad interagire all'interno del sistema nervoso centrale grazie alla loro idrofobicità. Negli insetti, gli insetticidi neonicotinoidi agiscono come agonisti sui recettori postsinaptici nicotinici dell'acetilcolina (nAChR) bloccando la normale azione di scambio di ioni attivata dall'acetilcolina.

La neurotrasmissione colinergica mediante le sinapsi nicotiniche viene effettuata sostanzialmente in due fasi (Figura 1.2.1). Inizialmente l'acetilcolina viene rilasciata dalla membrana presinaptica per esocitosi e interagisce con il sito di legame situato nel dominio extracellulare del complesso costituito dal canale ionico del recettore dell'acetilcolina modificandone la conformazione; in un secondo momento, questa modificazione conformazionale porta all'apertura del canale promuovendo l'ingresso di cationi Na⁺ extracellulare e l'uscita di cationi K⁺ intracellulare per mantenere lo stato di equilibrio del potenziale di membrana. Negli insetti, la nAChR è ampiamente distribuita nelle regioni neuropilo del sistema nervoso centrale.

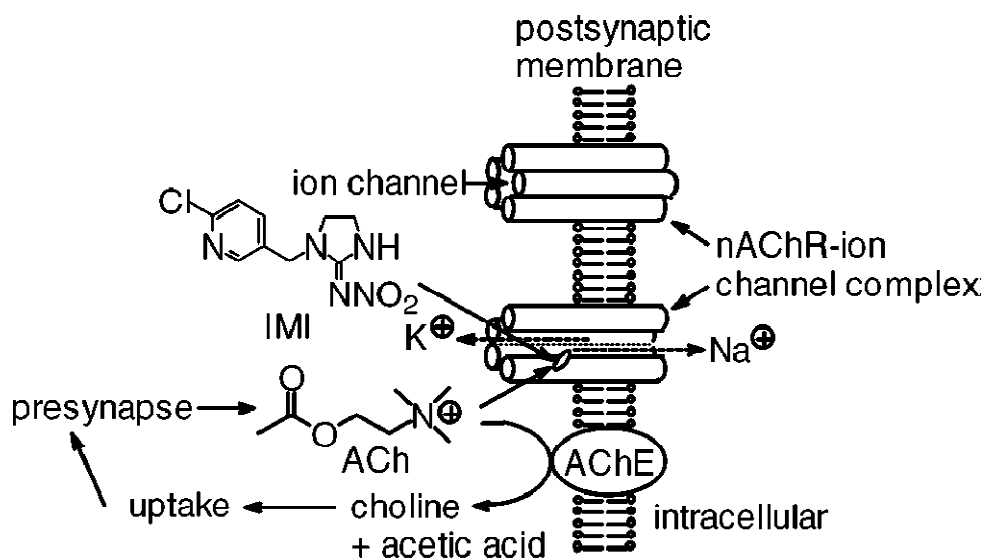


Figura1.2.1 Neurotrasmissioni colinergiche mediate dal recettore nicotinico dell'acetilcolina (nAChR) sulla membrana postsinaptica. Il neurotrasmettitore ACh rilasciato dalla presinapsi si lega al nAChR portando all'attivazione del canale ionico. L'acetilcolina è successivamente idrolizzata dall'enzima acetilcolinesterasi (AChE) [14]

L'enorme importanza che hanno avuto i neonicotinoidi nella loro commercializzazione è dovuta alla loro selettività, in quanto essi sono molto più tossici nei confronti di afidi, cicaline ed altri insetti rispetto ai mammiferi. Questa efficacia è verificabile se viene osservato attentamente il sito di destinazione: la zona carica negativamente del gruppo nitro, presente nei neonicotinoidi, è in grado di formare legami ad idrogeno o interazioni di tipo elettrostatico con i residui cationici degli aminoacidi presenti in quella zona. Al contrario, nei mammiferi, la zona dove si andrebbero a posizionare i gruppi carichi negativamente dei neonicotinoidi è anch'essa negativa e causerebbe quindi una repulsione, determinando l'inefficacia di questi insetticidi.

Ne consegue che l'esposizione degli insetti ai neonicotinoidi a dosi elevate, provoca stati di eccitazione permanente, che porta poi alla morte per paralisi; ma se la quantità con cui vengono a contatto è a livello subletale, cioè al di sotto del valore di LD₅₀, le conseguenze cambiano.

L'esposizione prolungata delle api al Fipronil con una dose di 0.1 ng/ape (LD₅₀/50), ha mostrato una mortalità indotta completa in individui esposti per una settimana; al

contrario, il contatto con una dose acuta di 0.1 ng/ape non ha indotto mortalità nelle 24 h dopo il trattamento ma solo deficit comportamentali. Questo effetto di mortalità non è stato osservato invece con l'esposizione ai neonicotinoidi. Con il Thiamethoxam, per esempio, l'esposizione ripetuta a una dose prolungata non ha avuto alcun effetto, mentre se si applicano delle dosi acute compaiono alcuni deficit comportamentali.[15] Quindi per osservare modifiche comportamentali nelle api è sufficiente utilizzare concentrazioni inferiori a $DL_{50}/500$ per il Fipronil e nell'intervallo $LD_{50}/5-LD_{50}/100$ per i neonicotinoidi.

Per quanto concerne gli aspetti comportamentali dipendenti dagli effetti neuronali, precedentemente indicati, si è notato come con bassissimi dosaggi (fino ad 1.25 ng/ape di Imidacloprid) l'attività motoria delle api risulta ampliata mentre aumentando le dosi di pesticida fornito alle api (da 2.5 a 20 ng/ape) queste tendono a diminuire sempre più i loro movimenti.[14]

Un secondo effetto comportamentale è quello legato alla navigazione e all'orientamento. Si è visto che le api, una volta contaminate, perdono totalmente o in parte l'orientamento e ciò le porta a vagare senza riuscire più a ritornare all'arnia [16].

I molti esperimenti effettuati hanno infatti dimostrato come il recupero del cibo da parte delle api richiedesse da parte loro un tempo sempre maggiore all'aumentare del dosaggio di insetticida, causando inoltre una variazione nei percorsi e addirittura la perdita dell'ape per alcune ore, giorni o definitivamente.[17]

Un altro aspetto di queste modificazioni comportamentali è la difficoltà nell'approvvigionamento del cibo, questa è causata da una ridotta capacità olfattiva, che si spiega con delle alterazioni nei riflessi di estensione della proboscide (PER, Proboscis Extension Reflex) nonché dalla ridotta sensibilità delle antenne a percepire le fonti di saccarosio. Il PER è deputato alla memorizzazione di gusti ed odori, se esso non funziona correttamente le api non sono più in grado di riconoscere il cibo, di portarlo all'arnia e di sfamare le altre api e loro stesse[17; 18] Con la somministrazione di 0.1 ng/ape di Thiamethoxam si è visto che l'ape subisce una diminuzione della memoria nelle prime 24 ore, recuperandola poi, nelle 48 ore successive; grazie a questo e molti altri studi si è dimostrato quindi che la parte di memoria intaccata, con dosi subletali, è quella a breve e medio termine.

Altri effetti osservati e riportati in letteratura sono: l'apatia, la respirazione affannosa, la perdita di coordinazione e le convulsioni.

1.3 Provvedimenti normativi sull'utilizzo dei neonicotinoidi ed altri insetticidi

A livello italiano il primo provvedimento preso per affrontare il problema della moria delle api è stato il Decreto Ministeriale del 17 settembre 2008, che disponeva la sospensione dell'autorizzazione alla vendita e all'impiego di sementi conciate con le sostanze attive insetticide Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid e Fipronil, in virtù di un possibile nesso di causa effetto tra l'utilizzo di sementi di mais, colza, girasole e barbabietola da zucchero conciate con tali principi e la moria delle api. Successivamente, il D.M. del 26 gennaio 2009 del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali precisava i limiti temporali di questa sospensione, fissandoli al 20 settembre 2009.

In un secondo tempo, in considerazione delle particolari caratteristiche agronomiche e di confettatura del seme della barbabietola da zucchero, è stato emanato l'ulteriore Decreto Ministeriale del 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.

Ad un anno circa dalla prima sospensiva, con il Decreto dirigenziale del 14 settembre 2009, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali ha prorogato fino al 20 settembre 2010 la sospensione d'impiego dei quattro principi attivi nella concia di sementi. Infine, con ulteriori provvedimenti ministeriali (il più recente del 31 ottobre 2011), lo stesso ministero ha prorogato il termine della sospensione al 30 giugno 2012. Questa proroga fu inizialmente motivata dalla necessità di attendere la conclusione del progetto APENET, finanziato per valutare l'efficacia e gli effetti del decreto di sospensione dei neonicotinoidi nella concia delle sementi di mais e fornire risposte alle problematiche legate ai fenomeni di mortalità e di spopolamento delle colonie di api. La recente proroga è invece legata alla necessità di acquisire i pareri

dell'UE e delle regioni italiane particolarmente interessate al fenomeno. Ufficialmente vi è quindi una certa prudenza riguardo ai dati ottenuti fino ad ora, a quanto pare considerati non ancora sufficienti per decretare una sospensione definitiva, anche se i risultati emersi dal progetto APENET sono in accordo nell'incriminare i neonicotinoidi quale principale causa della moria delle api.[11]

A livello europeo la situazione dei blocchi cautelativi si presenta eterogenea e differisce per ognuno 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 Ministero dell'Agricoltura e ad oggi il divieto d'impiego di prodotti concianti a base di Imidacloprid risulta esteso anche per il mais e la colza. Per quanto riguarda concianti a base di Thiamethoxam invece, nel 2008 era stata concessa l'autorizzazione "annuale" dell'impiego di prodotti utilizzati per il mais, ma oggi tale concessione è stata revocata grazie al Consiglio di Stato Francese che, nel febbraio 2011, dopo continui ricorsi legali da parte delle associazioni di apicoltori, ha emesso il giudizio d' illegalità anche per le autorizzazioni "annuali" nell'utilizzo di tali prodotti. [11]

In Germania dopo le intense morie registrate in particolare nelle regioni meridionali del paese durante la primavera 2008, frequentemente concomitanti con le semine di mais conciato, 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. A suffragare il primo blocco normativo ha anche influito la sentenza di un giudice che aveva condannato la Bayer a risarcire circa 700 apicoltori della regione del Baden-Württemberg per una moria di 11'500 colonie di api avvenuta durante il periodo di semina del mais conciato con Clothianidin [19].

Anche in Slovenia, come in Germania, dopo l'iniziale sospensione d'impiego per i neonicotinoidi Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam, per la concia di tutte le tipologie di sementi, è stato ripristinato l'utilizzo di tali p.a. ma solo per sementi di

colza. Tale decisione però ha portato a pesanti morie verificatesi nella primavera del 2011 portando così il governo sloveno ad emanare un nuovo provvedimento legislativo atto a bloccarne nuovamente l'utilizzo.

1.4 Dispersione e destino ambientale dei principi attivi insetticidi

1.4.1 Semina e polveri

Studi effettuati in Italia fra il 2003 ed il 2006, coordinati dal Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-API) ed alcune Università italiane, verificarono come la semina con seminatrici pneumatiche di sementi di mais contenenti fitofarmaci, fosse la causa del rilascio nell'ambiente di una notevole percentuale in massa di tali prodotti sotto forma di polveri, create con l'abrasione meccanica dei semi che avviene all'interno del macchinario.

Ulteriori studi a livello regionale e di 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.[20]

Seppur esistano studi effettuati dalla Bayer, i quali negano che la morte delle api possa in qualche modo essere riconducibile all'abrasione delle sementi conciate e alla successiva dispersione di queste nell'aria, numerose ricerche scientifiche ben documentate hanno comprovato come invece questo rapporto esista e sia particolarmente forte. In particolare, in tali ricerche si è evidenziato che vi possono essere due tipi di interazione tra le api e le polveri prodotte dalle seminatrici: una diretta, causata dal passaggio delle api nei campi durante i periodi di semina, ed una indiretta dovuta alla deposizione di queste polveri sulla flora circostante i campi in questione, con cui le api possono venire a contatto nei giorni successivi alla semina.

Le moderne seminatrici sono per la quasi totalità di tipo pneumatico ad alta precisione e permettono di seminare, a distanze regolabili, un determinato numero di semi per metro quadrato. Quelle impiegate nel presente lavoro di tesi sono la

“Monosem NG Plus”, utilizzata con e senza modifica, e la “Gaspardo”, di costruzione più recente, in quanto progettata con l’obiettivo di ridurre la nube di particelle prodotta dalla “Monosem”. Il funzionamento delle seminatrici è piuttosto semplice; una vasca contenente le sementi è collegata per mezzo di una tramoggia ad un secondo contenitore di semi molto più piccolo, chiuso in un lato da un disco girevole forato, nel quale viene trattenuto un seme per ogni foro mediante aspirazione; il seme che si trova all’interno del foro mano a mano che il disco gira viene a trovarsi in una zona ove non vi è più aspirazione, ed è a questo punto che cade per gravità all’interno del solco creato dalla seminatrice. In Figura 1.4.1 sono rappresentati un particolare della seminatrice e lo schema di funzionamento.

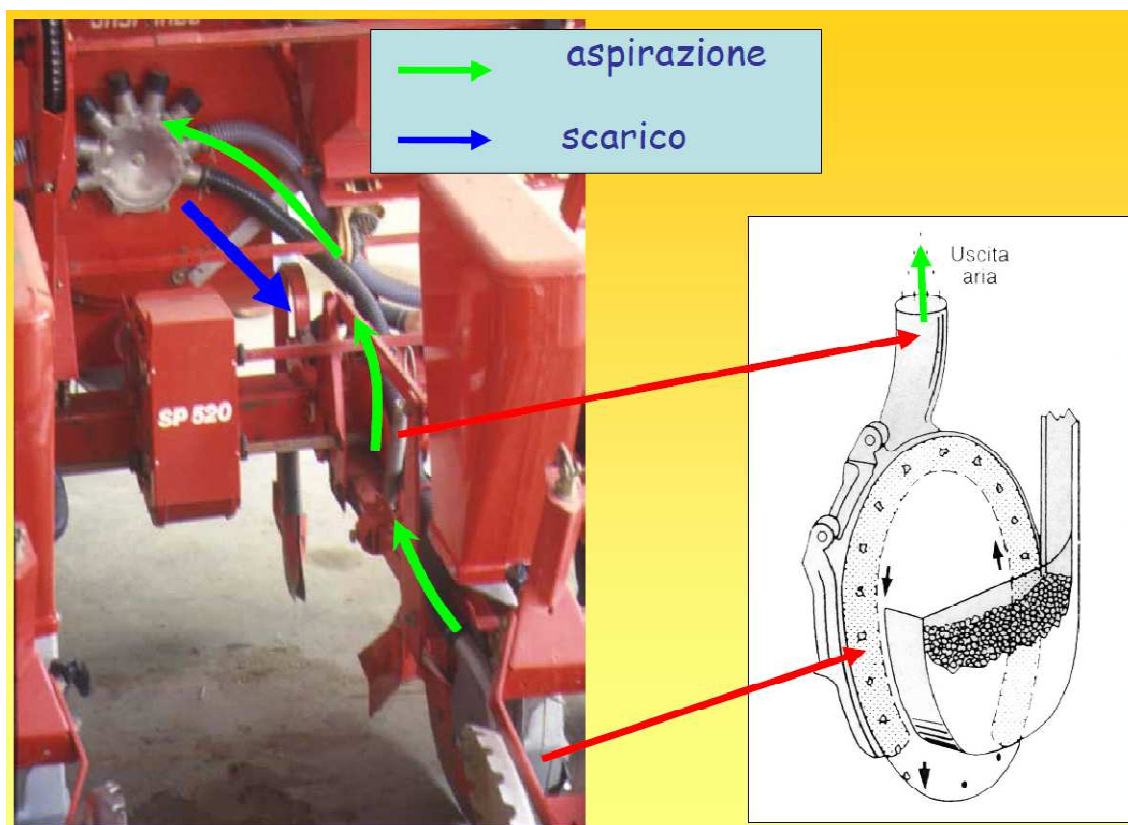


Figura 1.4.1 Una seminatrice pneumatica e il relativo schema illustrativo dell’apparato di rilascio del seme. Le frecce verdi indicano il percorso dell’aria fino all’aspiratore centrifugo mentre quella blu l’uscita dell’aria dallo stesso.

Essendo la pellicola di rivestimento del seme, che contiene i principi attivi insetticidi, abbastanza delicata, tutti i passaggi che ne causano un movimento o lo

strusciamento, tra seme e seme o con altre superfici, causano abrasione con conseguente formazione di polveri.

Le polveri, una volta prodotte, vengono aspirate dalla seminatrice ed attraverso il sistema pneumatico vengono quindi espulse all'esterno, generando un flusso pressoché costante di polveri di concia, con conseguente immissione nell'aria di ingenti quantità di principio attivo.

A seconda della loro dimensione, dell'intensità del vento e di altri fattori climatici, le polveri possono rimanere sospese in aria per più o meno tempo, e disperdersi in atmosfera da poche centinaia di metri fino a qualche km dai campi seminati.

1.4.2 La guttazione fogliare

Negli stadi giovanili di alcune specie di piante si osserva un particolare fenomeno di fuoriuscita di acqua, localizzato soprattutto alle estremità fogliari, detto "guttazione". Tale processo fisiologico, che non deve essere confuso con la normale traspirazione fogliare e tantomeno con la rugiada, permette ad un'aliquota d'acqua di uscire attraverso specifici fori posizionati lungo i lembi fogliari, denominati idatodi.

La guttazione ha luogo quando l'elevata pressione radicale dell'acqua non riesce ad esser controbilanciata totalmente dalla traspirazione fogliare, e perciò una frazione di quest'acqua viene dirottata all'esterno attraverso gli idatodi. Tale situazione si verifica quindi in piante con elevate disponibilità d'acqua nel terreno, ed in situazioni di chiusura degli stomi fogliari con limitata traspirazione[21]. Per questo motivo il fenomeno della guttazione si manifesta soprattutto durante la notte, quando gli stomi sono prevalentemente chiusi per la ridotta attività metabolica, ed il livello d'umidità atmosferica risulta più elevato. Le gocce di guttazione (Figura 1.4.2) sono quindi ben visibili sulle foglie il mattino successivo, ma questo processo si può osservare durante tutto l'arco della giornata seppur in misura inferiore.



Figura 1.4.2 Particolare di gocce di guttazione sull'estremità di una foglia di mais

La formazione di acqua di guttazione da parte delle piante di mais, è un fenomeno che si verifica limitatamente alle prime tre/quattro settimane di vita, la produzione da ogni singola pianta si attesta su volumi che variano tra gli 0.1 mL e i 0.3 mL al giorno nei periodi iniziali di forte produzione, diminuendo a volumi inferiori agli 0.1 mL durante gli ultimi giorni in cui questo fenomeno si manifesta.

In campo, l'acqua di guttazione fogliare può fornire comunque volumi d'acqua non indifferenti, soprattutto se addizionata all'eventuale rugiada. Durante stagioni primaverili ed estive secche, le gocce d'acqua di guttazione provenienti da piante di mais, possono costituire una fonte sicura per gli insetti, i quali ne richiedono elevate quantità per il loro metabolismo, come le api. L'utilizzo diretto di acqua di guttazione fogliare da parte di api è stato già verificato in letteratura ed è maggiormente verificabile in ambienti caratterizzati da monocolture di mais diffuse.

Le piante, se sono conciate con composti sistemici quali i neonicotinoidi, possono secernere gocce di guttazione contenenti concentrazioni molto elevate di principio attivo, più che sufficienti ad uccidere un'ape che dovesse per necessità abbeverarsi di tali gocce.[22; 23]

Va tuttavia osservato che tale esposizione non può avvenire in concomitanza con la semina del mais (quando cioè vengono segnalate le morie primaverili) ma a distanza di

diversi giorni con l'emergenza dei germogli. Inoltre, nelle nostre zone, le guttazioni appaiono non essere una fonte primaria di approvvigionamento idrico. Sotto il profilo ecotossicologico le guttazioni sono pertanto un interessante meccanismo di diffusione ambientale dei neonicotinoidi, ma difficilmente associabili alle morie primaverili di api per le quali l'esposizione al particolato da semina risulta invece assai più rilevante.

1.4.3 La concia delle sementi

Il processo di concia delle sementi è una tecnica sviluppata da più di una decina d'anni che consiste nell'avvolgere il seme da piantare in una pellicola contenente una certa dose di fitofarmaco. Tale composto, se agisce in modo sistemico come nel caso dei neonicotinoidi, viene portato all'interno dei tessuti della pianta una volta che questa inizia il suo processo di sviluppo, proteggendola su gran parte dei tessuti ed assicurando una buona persistenza della protezione sia dai principali fitofagi radicali, sia dai principali insetti fitofagi e fitomizi che attaccano i tessuti aerei della pianta. Tali modalità di impiego degli agrofarmaci ha portato ad una forte riduzione delle quantità di questi prodotti necessarie per un'adeguata protezione delle colture nei campi rispetto alle precedenti tecniche agronomiche utilizzate. Queste prevedevano infatti l'uso massiccio di geodisinfestanti o di prodotti irrorati con spray. Con questa modalità di somministrazione si sono così ridotte drasticamente le quantità di p.a. disperse nell'ambiente con relativi vantaggi sia economici che ambientali [24].

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

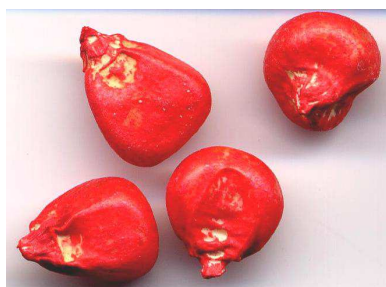


Figura 1.4.3 Aspetto dei semi di mais conciati



Figura 1.4.4 Principali fitofagi della pianta di mais

1.4.4. Persistenza, degradazione e destino ambientale

La presenza dei p.a. nell'ambiente si possono riscontrare quasi esclusivamente nei suoli, nelle acque e negli eventuali esseri viventi che ne siano venuti a contatto, in quanto presentano bassissima volatilità, determinata dai bassi valori relativi alla costante di Henry e della di pressione di vapore (Tabella 1.2.1).

Alcune delle caratteristiche di degradazione ambientale per questi principi attivi sono riportate in Tabella 1.4 [25].

Tabella 1.4.1 dati di degradazione dei principi attivi indagati e relativi coefficienti di ripartizione suolo/acqua espressi come μg di p.a. per grammo di carbone attivo

Principio Attivo	Persistenza nel suolo	Fotolisi in acqua a pH 7	Idrolisi a 20 °C e pH 7	Persistenza in acqua	K_{oc} ($\mu\text{g/g}$)
	$t_{0,5}$ (giorni)	$t_{0,5}$ (giorni)	$t_{0,5}$ (giorni)	$t_{0,5}$ (giorni)	
Thiamethoxam	39 - 50	2.7	Stabile	30.5 - 40	70
Clothianidin	121.2 - 545	0.1	Stabile	40.3 - 56	160
Imidacloprid	174 - 191	0.2	Stabile	30 - 129	225
Fipronil	65 - 142	0.33	Stabile	54 - 68	577

Come si può vedere, la persistenza di questi principi attivi nell'ambiente è moderatamente lunga. Se si osserva in particolare la persistenza nel suolo, luogo in cui vengono solitamente posti i semi concitati con questi principi attivi, si vedono tempi di dimezzamento che vanno dai 39 ai 545 giorni e, anche se le stime di alcuni autori azzardano tempi di dimezzamento superiori ai 1000 giorni [26], la loro reale persistenza nell'ambiente può perdurare per più di due - tre anni a seconda dei tipi di terreno e della presenza di acqua, rimanendo così sempre disponibili per il prelievo da parte dell'apparato radicale delle piante. Analisi sulle foglie di mais hanno verificato una persistenza dei principi attivi all'interno delle stesse in concentrazioni apprezzabili anche dopo 60 - 80 giorni dalla semina.[27] Questi principi attivi, essendo molto o discretamente solubili in acqua, possono inoltre diffondersi non solo nei terreni adiacenti ai campi seminati ma anche nei fiumi e persino nelle falde acquifere. [28]

L'Imidacloprid è stato il primo insetticida ad essere sintetizzato e utilizzato in campo, per questo motivo si trovano numerose informazioni riguardanti il suo destino ambientale. Una visione schematica della degradazione di questo principio attivo nel suolo e in acqua è riportata nelle Figure 1.4.5 e 1.4.6. [29]

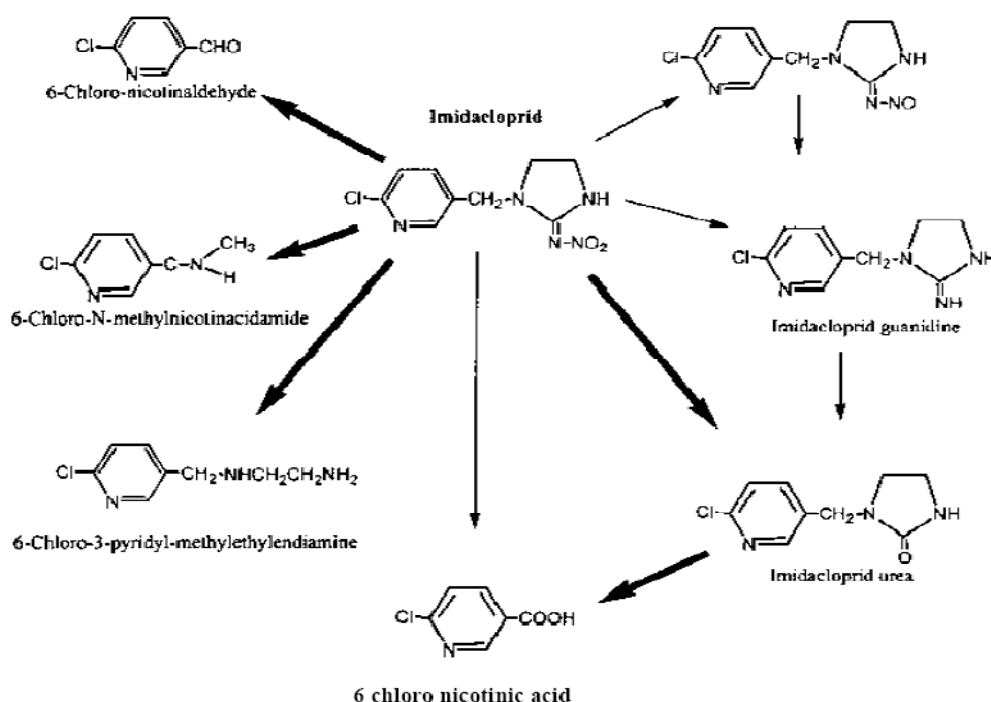


Figura 1.4.5 Schema di degradazione dell'Imidacloprid in acqua.

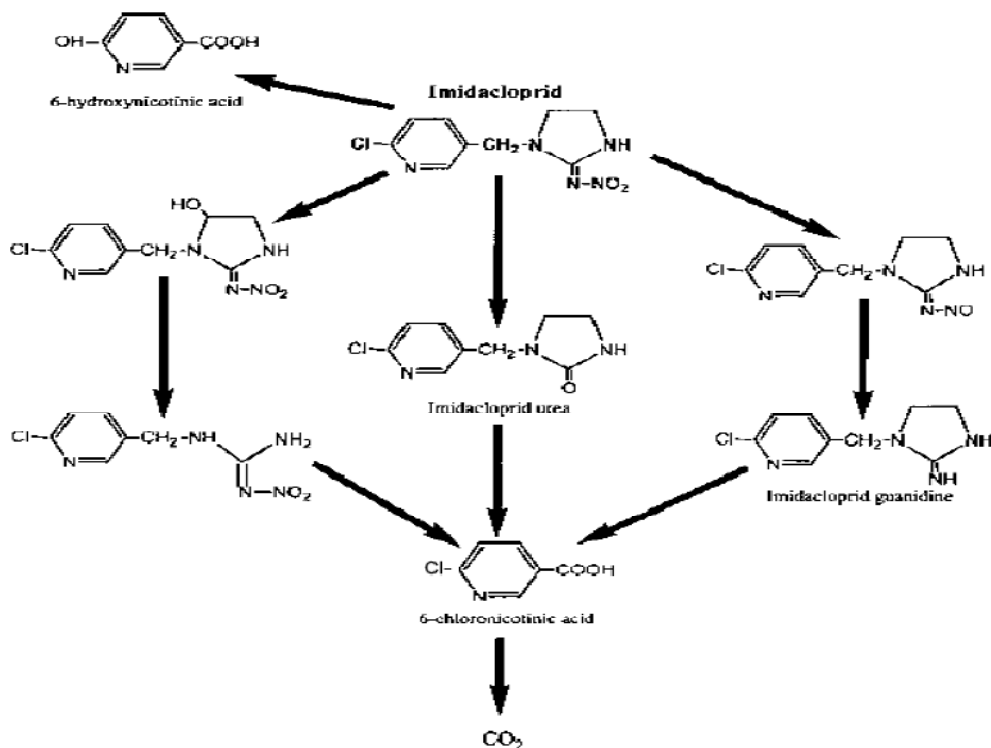


Figura 1.4.6 Schema di degradazione dell'Imidacloprid con relativi metaboliti nel suolo.

Studi sulle acque hanno dimostrato come la degradazione del p.a. sia dovuta principalmente alla fotolisi, ed alla presenza di specie reattive riducenti nei confronti di substrati organici. In acque superficiali dunque la sua presenza si attesta attorno ai 30 giorni, nelle acque sotterranee invece, la persistenza aumenta considerevolmente in quanto viene a mancare uno dei fattori di degrado quale la luce solare. Questi valori però possono diminuire rapidamente se il principio attivo si trova in un ambiente tendenzialmente alcalino.[30]

La buona solubilità in acqua contrapposta ad un basso valore di K_{oc} (coefficiente di ripartizione nel carbonio organico), determina una scarsa tendenza dell'insetticida ad essere adsorbito dalle particelle del terreno. Studi in campo hanno prodotto dati contrastanti sull'emivita, dimostrando come la degradazione di p.a. dipenda fortemente da diversi fattori quali: il pH (il quale aumentando prolunga il tempo di emivita), la composizione del terreno, la quantità di carbonio organico presente, ed inoltre, anche dalla frequenza di coltivazione del terreno.

In assenza di luce, il valore più elevato di emivita in campo è stato di 229 giorni; questa persistenza nel suolo rende l'imidacloprid particolarmente adatto per il trattamento delle sementi in quanto permette una continua disponibilità di assorbimento da parte delle radici.[30]

1.5 Cenni sui metaboliti rintracciabili in api ed altre matrici biologiche

Per quanto riguarda il destino ambientale dei neonicotinoidi, oltre ai cammini degradativi di tipo chimico e fisico vi sono da considerare anche quelli di tipo biologico. Il luogo in cui avvengono le prime fasi biodegradative di Fipronil, Thiamethoxam, Clothianidin ed Imidacloprid è il suolo, nel quale intervengono microorganismi che comunemente vi risiedono capaci di produrre sostanze che spesso risultano anche più tossiche per gli insetti dei principi attivi iniziali. Un secondo substrato di degradazione risulta essere la stessa pianta trattata, che in più può rendere disponibili anche i metaboliti del terreno mediante assorbimento radicale arricchendo così la varietà di molecole in essa contenute.

I metaboliti così prodotti vengono quindi a rendersi disponibili agli insetti che infestano la vegetazione e ai mammiferi selvatici di varie specie con cui entrano in contatto, andando ad aumentare l'effetto di tossicità del principio attivo utilizzato.

I principali metaboliti riscontrati nel terreno vengono di seguito esposti nella Tabella riassuntiva 1.5.1. [31]

Tabella 1.5.1 Metaboliti principali prodotti nel suolo a partire dai p.a. insetticidi indagati

Principio Attivo	Metaboliti più comuni
Thiamethoxam	Clothianidin
Clothianidin	N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N'-nitroguanidine, N-metil-N-nitroguanidina
Imidacloprid	1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]N-nitro-1H-imidazol-2-amine (olefina), acido 6-cloronicotinico
Fipronil	Fipronil-ammide, Fipronil-solfone, Fipronil-solfuro

I metaboliti non vengono però solo assunti tramite l'alimentazione o per contatto ma tendono anche a formarsi all'interno dei soggetti dopo la loro contaminazione con i diversi principi attivi insetticidi.

Test effettuati somministrando concentrazioni al di sotto o pari al valore di LD₅₀ su diverse tipologie di insetti e mammiferi hanno dimostrato come, una volta assunti i principi attivi insetticidi, questi vengano metabolizzati in concentrazioni più o meno elevate a seconda dell'organismo ospite preso in esame.

Per quanto concerne il Fipronil, la cui degradazione raggiunge il 90% nei test effettuati su mosche, si è osservato che in diversi studi condotti su matrici quali larve, mosche, moscerini, topi, pesci e uccelli di piccola taglia, il metabolita che accumuna tutte queste specie risulta essere il Fipronil-solfone, il quale dimostra una maggiore attività rispetto al Fipronil nell'effetto insetticida. Tale metabolita è risultato infatti avere una tossicità nove volte superiore nei topi e venti volte maggiore negli insetti rispetto al principio attivo, mostrando inoltre che questa molecola ha una maggiore efficacia negli insetti piuttosto che nei mammiferi.[32; 33]

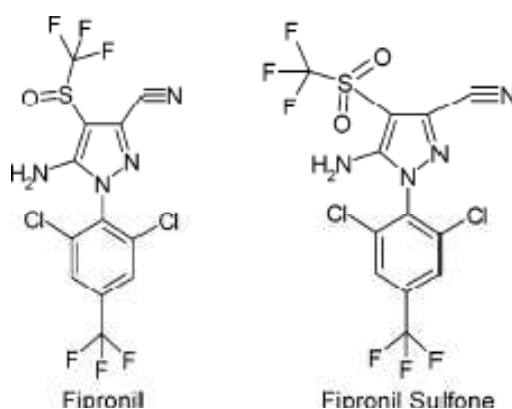


Figura1.5.1 Struttura del Fipronil e uno dei principali metaboliti

Analogo discorso può essere esplicito per il Thiamethoxam, in quanto studi effettuati su differenti tipologie di insetti quali gli insetti infestanti del mais, larve, topi e api, hanno portato a riconoscere il Clothianidin quale principale e comune metabolita.

Uno studio più approfondito su larve e topi ha dimostrato inoltre la trasformazione del Thiamethoxam non solo a Clothianidin ma anche in altri metaboliti corrispondenti alle molecole demetilate; non c'è quindi da escludere che anche queste ultime sostanze

possano essere presenti negli altri insetti ma, per verificare ciò, bisognerà attendere ulteriori studi.

Anche nel caso del Thiamethoxam i metaboliti generati dimostrano di avere una maggiore efficacia nell'effetto tossicologico sulle matrici indagate. A conferma di ciò la tossicità dovuta al principio attivo in sé si è dimostrata decisamente inferiore rispetto agli altri neonicotinoidi, ma grazie al contributo del Clothianidin che possiede un'elevatissima affinità con i siti recettori postsinaptici nicotinici dell'acetilcolina del sistema nervoso degli insetti, l'insetticida risulta avere una efficacia pari a quella degli altri insetticidi della categoria di appartenenza. [34; 35]

Uno schema molto rappresentativo della via di degradazione del Thiamethoxam e del suo principale metabolita Clothianidin studiato approfonditamente nei topi è di seguito mostrato in Figura 1.5.2:

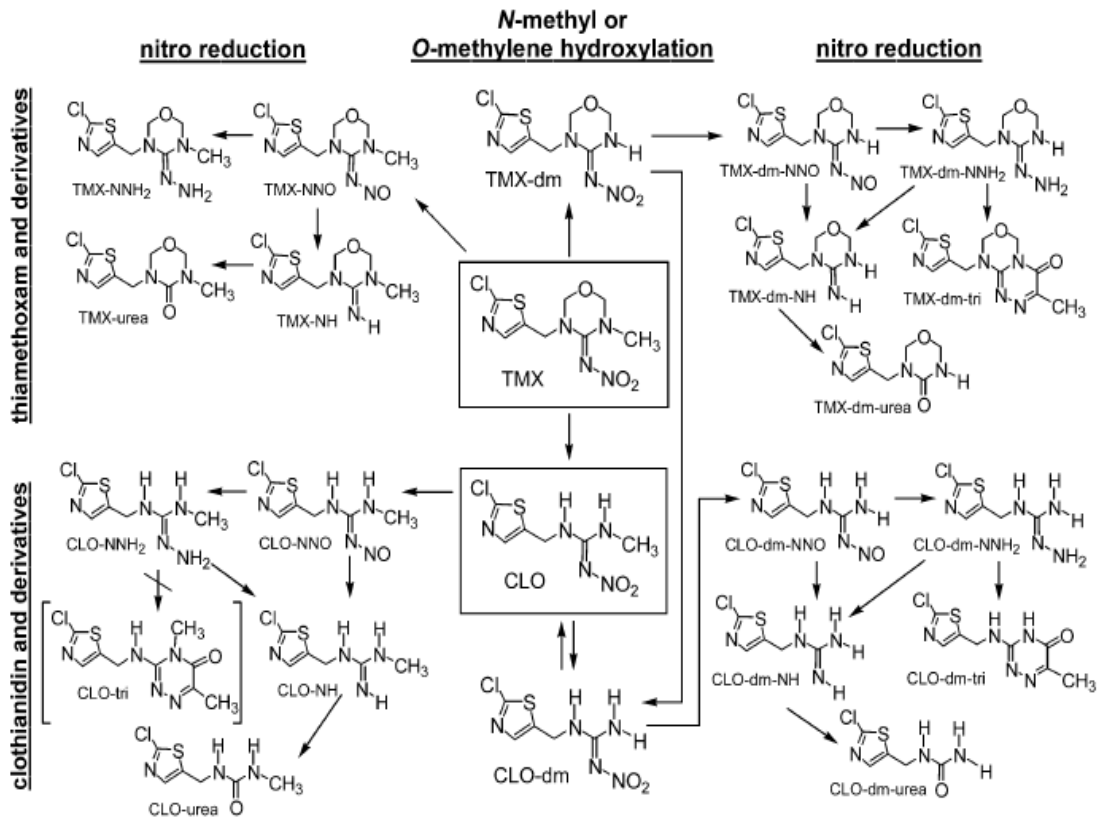


Figura 1.5.2 Principali vie metaboliche del Thiamethoxam e del Clothianidin all'interno dell'organismo di un topo.

Altri studi effettuati trattando delle api con Imidacloprid, in bassi dosaggi, hanno portato a scoprire che già dopo 20 minuti dall'assunzione le api sono in grado di metabolizzare ben il 50% di questo principio attivo e che entro le 24 ore successive non è più possibile rinvenirne traccia. La degradazione dell'Imidacloprid determina la comparsa di due metaboliti quali il 5-hydroxyimidacloprid e l'Imidacloprid olefina. La loro individuazione con una percentuale massima per entrambi intorno al 10% si è verificata dopo quattro ore dall'ingestione alla quale era sopraggiunta la morte.

Osservando dunque gli effetti imputati alla somministrazione dell'insetticida Imidacloprid a diversi livelli di dosaggio si è potuto notare come, a concentrazioni uguali o superiori al valore di LD₅₀, i sintomi di neurotossicità e la conseguente morte siano dovuti all'azione dell'Imidacloprid stesso mentre, a concentrazioni subletali, sono i suoi metaboliti con la loro elevata tossicità a decretare la morte delle api.

Questi due metaboliti non sono gli unici a formarsi poiché ben il 30% delle sostanze prodotte dalla degradazione dell'Imidacloprid non sono state ancora individuate; tali metaboliti sono però i soli ad essere stati attualmente identificati e studiati per i loro effetti tossici sull'insetto.[36; 37]

Le strutture dei due metaboliti messe a confronto con quella dell'Imidacloprid vengono di seguito mostrate in Figura 1.5.3:

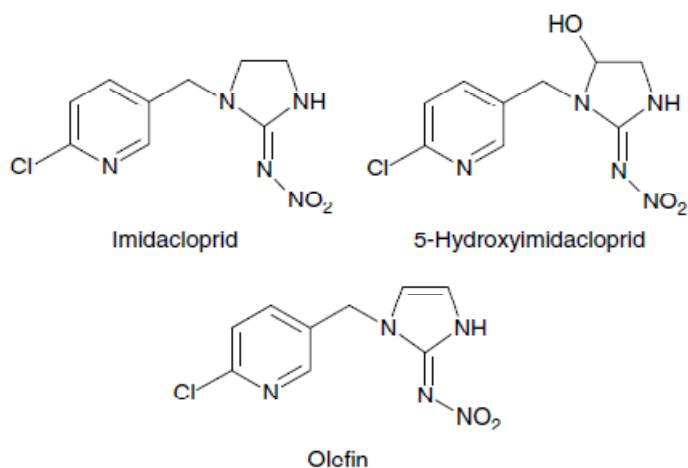


Figura 1.5.3 Struttura chimica dell'Imidacloprid e dei suoi principali metaboliti

Risulta dunque chiaro come l'azione degli insetticidi neonicotinoidi sia imputabile non solo ai principi attivi stessi ma anche ai loro metaboliti che vengono a formarsi su molteplici substrati e all'interno degli organismi contaminati stessi, manifestando spesso, come si è visto, una tossicità ancora più elevata dei principi attivi d'origine.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

Apparati per misurazioni sul particolato atmosferico

- Campionatori di PM: - Zambelli Explorer Plus
- Zambelli ZB1
- Teste di prelievo per PM 10 e per PTS (per il particolato totale)
- Filtri in fibra di vetro Whatman GF/C, diametro 47 mm, porosità 1.2 µm
- Anemometro (modello Darcy) con registratore dati Solomat MPM 4000
- Cabina per il condizionamento dei filtri QBOX³ Momo Line
- Sonda isocinetica (UNI EN 13284-1)

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

- Sistema di pompaggio LC-20AD XR
- Degasatore DGU-20A3
- Iniettore automatico SIL-20AC XR
- Forno termostato per colonne CTO-20A
- Rivelatore diodi – array SPD- M20A
- Modulo gestione CBM-20A
- Software di gestione “LC Solution”
- Colonna: Phenomenex Kinetex 2.6u C18 100A (100 x 2,10 mm)
Phenomenex Kinetex 2.6u PFP 100A (100 x 2.10 mm)
Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2,2 (100 x 2 mm)
- Precolonna: Phenomenex Security Guard - Phenomenex ODS (4 x 2.0 mm)
- Miscela eluente: acetonitrile – acqua MilliQ
- Flusso: 0.4 mL/min
- Temperatura colonna: 45 °C

Attrezzatura da laboratorio

- Bilancia analitica con limite di sensibilità di 0.01 mg
- Bagno Ultrasoni
- Centrifuga
- Liofilizzatore con pompa Speedvac Edwards High Vacuum
- Sistema di filtrazione eluenti con filtro in nylon 66 con pori da 0.45 μm
- Micropipette tarate con puntali monouso
- Beute, matracci, becker, imbuti di vetro e vetrini da orologio di varie dimensioni
- Siringhe in polipropilene con ago in acciaio
- Filtri per siringa in PVDF (polivinilidene fluoruro) Phenomenex (diametro 4 mm) con diametro pori da 0.20 μm
- Pinze e spatoline in acciaio
- Provette da 25 mL in vetro con tappi a vite in plastica
- Provette da 10 mL in polipropilene con tappi a pressione
- Fiale di vetro da 4 mL con tappo a vite
- Fiale di vetro da 1.5 mL con tappo a vite e setto in PTFE
- Microprovette Eppendorf da 1.5 mL
- Vaschette per pesate Sigma-Aldrich in polistirene

Reagenti e principi attivi impiegati

- Acetonitrile: LiChrosolv® gradient grade per cromatografia liquida
purezza: $\geq 99.9\%$
- Metanolo: HiPerSolv Chromanorm VWR per HPLC gradient grade
purezza $\geq 99.8\%$
- Acqua MilliQ: prodotta con apparecchiatura Millipore MilliQ
- Acetone: Fluka, Riedel De Haen, Pestanal, per analisi di residui, purezza $\geq 99.8\%$
- Thiamethoxam (Purezza: 99.7%) Fluka Analytical, Pestanal
- Clothianidin (Purezza: 99.9%) Fluka Analytical, Pestanal
- Imidacloprid (Purezza: 99.9%) Fluka Analytical, Pestanal
- Fipronil (Purezza: 97.6%) Fluka Analytical, Pestanal
- N-desmetilthiamethoxam (Purezza: 98%) Fluka Analytical, Pestanal

Sementi utilizzate

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

Le sementi utilizzate sono:

- sementi conciate Cruiser 350 FS (Syngenta), p.a. di concia Thiamethoxam, in dose nominale di 1.0 mg/seme (concia 2009) e 0.60 mg/seme (concia 2010);
- sementi conciate Poncho (Bayer Cropscience), p.a. di concia Clothianidin, in dose nominale di 1.25 mg/seme (conce 2009 e 2010);
- sementi conciate Gaucho 350 FS (Bayer Cropscience), p.a. di concia Imidacloprid, in dose nominale di 0.5 mg/seme (concia 2009) e 1.00 mg/seme (concia 2010);

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

2.2 Procedure Sperimentali

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

La preparazione delle soluzioni madre dei diversi p.a. si attua sciogliendo una quantità nota degli stessi, in formulazione solida ad elevato grado di purezza (> 99.7 %, solo per Fipronil la purezza è del 976 %) in una quantità misurata di solvente. Il composto, in polvere, viene pesato mediante una bilancia con sensibilità di 0,01 mg su vaschetta in polistirene. La polvere così pesata viene quindi trasferita quantitativamente in un matraccio da 100 mL portando a volume con metanolo puro. Il matraccio viene quindi chiuso con tappo e sigillato esternamente con del Parafilm. La soluzione viene conservata in frigorifero a 4 °C.

2.2.2 Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione strumentale

Le soluzioni standard a bassa concentrazione nei diversi p.a. per la determinazione delle funzioni di calibrazione strumentali, vengono preparate mediante opportune diluizioni della soluzione madre. Una determinata aliquota di questa viene trasferita in un matraccio da 10 mL attraverso l'utilizzo di micropipette tarate dotate di puntale monouso. Si porta infine a volume con metanolo ed acqua MilliQ in modo da ottenere una soluzione finale al 50 % in volume in entrambi i solventi, chiudendo poi il matraccio con tappo e sigillando ulteriormente l'esterno dell'imboccatura con del Parafilm. La soluzione viene conservata in frigorifero a 4 °C. Nel presente lavoro, per le normali determinazioni quantitative di p.a. insetticidi mediante UFLC sono state impiegate soluzioni standard, a seconda dei campioni, nell'intervallo tra i 0.250 e i 10.000 mg/L.

2.2.3 Preparazione di diverse matrici per l'analisi dei neonicotinoidi

La preparazione per l'analisi di tutti i tipi di matrice consta di un processo in tre fasi:

- 1) preparazione dei campioni all'estrazione;
- 2) estrazione vera e propria dei principi attivi effettuata mediante l'aggiunta di un'opportuna quantità di metanolo, trattamento in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti, aggiunta di una pari aliquota di H₂O MilliQ e ulteriore trattamento di sonicazione per 30 minuti attendendo sempre, dopo ogni trattamento ultrasonico, di operare su soluzioni a temperatura ambiente;
- 3) purificazione dei campioni prima dell'analisi mediante filtrazione su filtri con pori da 0.20 µm preceduta da una centrifugazione;

a) Preparazione delle polveri aerodisperse raccolte su filtri per il campionamento del particolato atmosferico

I filtri provenienti dai diversi tipi di campionamento vengono introdotti interi in fiale di polipropilene da 10 mL. La procedura di estrazione dei p.a. in essi contenuti si differenzia in base al tipo di campionamento effettuato:

i) con i filtri in fibra di vetro provenienti dai campionamenti isocinetici l'estrazione viene effettuata aggiungendo 5 mL di metanolo e altrettanti di H₂O MilliQ;

ii) con i filtri in fibra di vetro provenienti dal campionamento delle polveri totali (PTS) e PM 10 si utilizzano 2.5 mL di metanolo e analoghe quantità di acqua;

Il trattamento finale di filtrazione con siringhe munite di filtri in PVDF con diametro dei pori da 0.20 µm è comune a tutti i filtri.

b) Preparazione all'analisi di una singola ape

La preparazione ottimizzata per una singola ape consta di un processo preparativo, preventivo all'estrazione, che prevede il congelamento dell'ape, posta all'interno di una fiala di vetro da 4 mL con tappo a vite, a -20 °C per alcune ore prima di un trattamento di liofilizzazione della durata di 16 ore. L'estrazione dei p.a. si effettua, dopo aver sminuzzato l'ape con una palettina metallica, mediante l'aggiunta di 0.5 mL di metanolo prima e di 0.5 mL di H₂O MilliQ poi, entrambe seguite da un trattamento di 30 minuti in bagno ad ultrasuoni. La purificazione dell'estratto si attua centrifugandolo per 60 minuti a 10'000 giri al minuto e successivamente filtrando il liquido ottenuto mediante filtri in PVDF con pori del diametro di 0.20 µm prima dell'analisi cromatografica.

2.2.4 Campionamento del particolato durante simulazioni di semina di mais conciato

Per il campionamento delle polveri aerodisperse, generate durante l'attività di semina di mais conciato con p.a. insetticidi, sono stati condotti esperimenti di simulazione di semina nei terreni adiacenti la serra entomologica del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali. Questi esperimenti hanno avuto luogo in giornate caratterizzate da cielo sereno, in condizioni di vento variabile nella direzione, ma in ognuna di queste giornate non si sono verificate folate di forte intensità.

La prima giornata di semina, svoltasi il 14 Maggio, è stata effettuata utilizzando mais conciato "Poncho" (p.a. di concia Clothianidin – 1.25 mg/seme) confettatura 2010 simulando le normali condizioni agronomiche tramite una seminatrice pneumatica "Gaspardo". Per questi esperimenti si è provveduto a disporre la seminatrice in campo collegandone il meccanismo di distribuzione del seme, mediante un giunto cardanico, ad un secondo trattore posto in posizione perpendicolare al primo. Le ruote della seminatrice erano rialzate da terra in modo da poter girare a vuoto annullando quindi la formazione di polveri dal terreno.

Le condizioni di semina adottate sono state di 20 cm come distanza interseme per una densità di semina approssimativa di 66'667 semi/ha. La velocità di semina del trattore è stata di 21 Km/h e il tempo di semina per ettaro di 6 minuti (calcolato considerando una distanza interfila di 18,5 cm).

Nelle semine del 20 maggio, invece, sono state utilizzate sementi di mais conciato "Poncho" (p.a. di concia Clothianidin – 1,25 mg/seme, concia 2009 e 2010) e successivamente "Cruiser" (p.a. di concia Thiamethoxam – 0.6 mg/seme, concia 2010), seminato con la seminatrice " Monosem NG PLUS" opportunamente modificata collegando allo scarico, ubicato in alto, un opportuno raccordo dal quale partono due tubi di uguale fattezze che, in questo modo, portano lo scarico a 20 centimetri dal suolo. Le condizioni prese in questo caso sono state di 20 cm come distanza interseme per una densità di semina totale di 66'667 semi/ha. La velocità di avanzamento del trattore è stata di circa 16 Km/h ed il tempo di semina per ettaro di 12 minuti (calcolato considerando una distanza interfila di 20 cm). Le velocità di semina stimate per il trattore fermo, 12 o 16 Km/h corrispondenti al numero di giri impostato nel trattore

ausiliario, sono molto più elevate di quelle che si realizzano in campo. Poiché la portata della ventola di aspirazione è regolata dal numero di giri del trattore primario e risulta circa costante ($230 \text{ m}^3/\text{h}$), il calcolo dei fattori emissivi è stato effettuato considerando una velocità di semina (e relativi tempi) di 6 Km/h .

Negli esperimenti tra una semina e l'altra è stata fatta lavorare la seminatrice per circa 30 minuti a vuoto per pulire il sistema pneumatico prima della semina successiva.

I campionamenti effettuati sono stati di tre tipi:

a) Campionamento isocinetico del particolato all'uscita dell'aspiratore centrifugo della seminatrice

Preventivamente al campionamento vero e proprio è stata effettuata una misura della velocità dell'aria in uscita dallo scarico dell'aspiratore centrifugo collegato al trattore con la seminatrice non in funzione, al fine di impostare il campionamento delle polveri in regime isocinetico e valutare la portata del sistema di aspirazione e distribuzione dei semi. La velocità dell'aria in uscita è stata determinata mediante un misuratore di flusso Darcy.

L'emissione di polveri generate dalla semina all'altezza dello scarico d'aria è stata misurata attraverso un campionatore di particolato totale (PTS) equipaggiato con un campionatore Zambelli ZB-1 regolato, in base ai dati ottenuti dalle misure di velocità, ad un flusso di aspirazione di circa 10 L/min ed un ugello di 6 mm di diametro per poter effettuare i campionamenti in condizioni isocinetiche della durata 5 minuti, cosa che non è stato possibile effettuare nella prima giornata di semina in quanto la conformazione dello scarico nella seminatrice Gaspardo non l'ha permesso.

Durante l'esperimento l'aria campionata in uscita dalla seminatrice veniva convogliata verso le teste di prelievo del campionatore attraverso uno dei due tubi di ferro (diametro interno 10 cm) mantenuti in posizione perpendicolare al suolo.

In entrambi gli esperimenti la testa di campionamento è stata posta nella zona della parte centrale del tubo in cui la velocità del flusso dell'aria rimaneva maggiormente costante.

Le prove sono state eseguite con un tempo di campionamento di 5 minuti in entrambi i casi.

b) Valutazione del particolato a 5 e 10 metri dalla seminatrice

In entrambe le giornate, per i campionamenti del particolato atmosferico a 5 metri dalla seminatrice è stato utilizzato un campionatore per le PTS con pompa Zambelli ZB1 impostata ad un flusso di aspirazione di 20 L/min. Per il campionamento del particolato atmosferico a 10 metri di distanza dal trattore, invece, sono stati utilizzati: un campionatore fisso per le PTS (polveri totali sospese) con pompa Zambelli ZB1 impostata per un flusso di aspirazione di 20 L/min e un impattore inerziale per il PM10 con sistema Zambelli Explorer plus impostato ad un flusso di aspirazione di 38.3 L/min

I filtri utilizzati durante le varie prove, in fibra di vetro, sono stati subito prelevati con pinze metalliche e richiusi nelle proprie scatole di plastica. Tali filtri venivano poi conservati in frigorifero a 4 °C in vista della successiva analisi.

c) Determinazione della distribuzione dimensionale di particelle emesse durante il funzionamento di una macchina seminatrice

La misura del numero di particelle presenti per unità di volume d'aria durante la semina, distinte per classe dimensionale, è stata effettuata tramite un contatore ottico OPC – Grimm. Lo strumento utilizzato può dividere le particelle rilevate fino ad un massimo di 15 intervalli (classi dimensionali), tra gli 0.3 e i 30 µm. Tramite una preventiva misura del numero di particelle presenti in aria con la seminatrice in funzione senza semi, è stato possibile determinare l'effettivo numero di particelle emesse in aria dalla semina di mais conciato, distinte per classe dimensionale.

2.2.5 Metodo di somministrazione di principio attivo in api vive

Le api catturate vive dall'alveare sono state tenute immobili, sul bancone da laboratorio, mediante una retina di tulle e successivamente drogate (a seconda degli esperimenti) con 500, 250 o 125 ng di Thiamethoxam. La somministrazione del principio attivo avviene ponendo 5 µL di una soluzione idroalcolica contenente

l'insetticida sul tegumento dell'ape tramite l'uso di una micropipetta. Le soluzioni utilizzate presentano concentrazioni rispettivamente di 100, 50 o 25 µg/mL. Le api ancora immobilizzate vengono trattenute in tali condizioni fino al completo assorbimento della soluzione e successivamente collocate all'interno di opportune gabbiette in tulle, contenenti una soluzione zuccherina, fino al loro decesso.

I campioni di api mantenuti con umidità superiori all' 80% vengono posti in un box di plexiglas delle dimensioni di 1,20 x 0,5 x 0,5 m. Tale box è munito di termometro ed igrometro con i quali vengono impostati temperatura ed umidità.

I campioni di api con umidità inferiore, invece, sono state mantenute alle normali condizioni di laboratorio.

Al termine dei diversi tipi di prova i campioni vengono posti all'interno di un congelatore a -80°C fino al momento dell'analisi.

2.2.6 Analisi del contenuto di principio attivo in diverse matrici ambientali mediante UFLC

Il sistema cromatografico Shimadzu, dotato di rivelatore UV-DAD (Diode Array Detector), opera a maggiori pressioni rispetto ai tradizionali HPLC e può utilizzare quindi colonne ad altissima efficienza per ottenere risoluzioni elevate in tempi brevi.

Il sistema cromatografico, dotato di autocampionatore, prevede che i campioni siano precedentemente caricati in fialette di vetro da 1.5 mL dotate di un opportuno setto forabile. Il campione deve essere in soluzione liquida e non deve presentare sospensioni solide per non correre il rischio che le eventuali particelle di solido presente siano iniettate in colonna o vadano ad otturare l'ago di prelievo.

Il metodo cromatografico utilizzato consiste nell'iniezione in colonna di 5 µL di campione mantenendo un flusso costante di eluente, formato da acqua e acetonitrile, a 0.4 mL/min e la temperatura del forno, contenente la colonna, ad una temperatura fissata a 45 °C; il programma di eluizione utilizzato per indagare tutti i principi attivi viene di seguito schematizzato in Tabella 2.2.1

Tabella 2.2.1 Programma di eluizione

Metodo (p.a. rivelati)	Tempi (min.)	Variatione della % di acetonitrile
Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid e Fipronil	0 – 2.05	16 – 36
	2.05 – 2.10	36 – 66.5
	2.10 – 3.95	66.5 – 68.5
	3.95 – 4.00	68.5 – 100
	4.00 – 4.60	100
	4.60 – 4.65	100 – 16
	4.65 – 7.00	16

C'è da premettere che in determinate analisi, in cui non sono stati indagati tutti gli insetticidi, il programma veniva terminato dopo l'uscita dell'ultimo analita e anticipando la fase di pulizia.

La determinazione quantitativa dei p.a. nei campioni analizzati sfrutta il metodo della retta di taratura (calibrazione esterna). L'identificazione dei diversi principi attivi viene effettuata sfruttando il rivelatore DAD, impostato per registrare lo spettro delle sostanze eluite fra i 200 ed i 300 nm, corrispondente alla finestra utile per riconoscere i p.a. in questione. Vengono impostati da uno a quattro canali d'acquisizione del segnale strumentale a lunghezze d'onda diverse, corrispondenti circa alle λ massime d'assorbimento di ogni principio attivo o ad un massimo relativo (Tabella 2.1).

Tabella 2.2.2 λ_{\max} d'assorbimento per i p.a. indagati

Principio Attivo	λ_{\max} d'assorbimento (nm)
Thiamethoxam	252
Clothianidin	269
Imidacloprid	269
Fipronil	210

Ogni analisi viene svolta in doppio, ossia si operano due determinazioni cromatografiche per ogni singolo campione.

3 RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 Dispersione dei principi attivi insetticidi durante la semina di mais conciato

La semina di mais conciato con principi attivi insetticidi è una delle attività maggiormente incriminate per le morie di api verificatesi negli ultimi anni. Nel nostro paese, in particolare, questo problema ha riguardato soprattutto la Pianura Padana dove il mais rappresenta un'elevata percentuale dell'intera superficie agricola. La stretta correlazioni fra le semine primaverili e le morie di api negli alveari posti nelle vicinanze dei campi su cui erano state compiute, ha portato alcuni gruppi di ricercatori a studiare quale potesse essere il nesso fra tali fenomeni. Questo legame è stato riconosciuto in seguito essere la dispersione di notevoli quantità di insetticidi attraverso il flusso d'aria prodotto dalla seminatrice pneumatica. Tale emissione è causata dalla disgregazione meccanica delle pellicole di conca che avvolgono i semi. [38; 39]

Di grande interesse risulta quindi la quantificazione della dispersione ambientale delle molecole insetticide utilizzate nella conca del mais durante le normali attività di semina. A questo fine sono stati eseguiti dal 2009 al 2011 vari esperimenti in campo, in cui le polveri emesse dal trattore sono state campionate su filtri secondo determinati schemi di raccolta. Dai campionamenti a bordo campo durante le semine vere e proprie si sono potute ricavare informazioni qualitative sulla dispersione del particolato e le sue ricadute sulla vegetazione limitrofa; per ottenere informazioni analiticamente più valide e quantitative in merito ai fattori emissivi e alle concentrazioni di insetticida nelle vicinanze della seminatrice si è dovuto ricorrere a misure a trattore fermo con campionamenti a distanze costanti e note.

3.1.1 Misura della concentrazione di principio attivo in corrispondenza dello scarico dell'aspiratore centrifugo della seminatrice

In un precedente lavoro di tesi [19] sono state ottimizzate le condizioni di campionamento e misura del particolato emesso dalla seminatrice ed effettuate le prime

valutazioni sui fattori emissivi. Con il presente lavoro di tesi, tale valutazione si è estesa a tutte le tipologie di sementi disponibili, anche a quelle di più recente produzione che avrebbero dovuto garantire una minore dispersione nell'ambiente delle polveri tossiche per le api (Clothianidin 2009 e 2010 e Thiamethoxam 2010).

Come effettuato in precedenza il campionamento isocinetico del particolato emesso è stato eseguito posizionando la sonda di campionamento al centro del condotto di scarico della seminatrice Monosem Plus "modificata" (Figura 3.1.1); il flusso emissivo totale era di 230 m³/h e la temperatura dell'aria all'uscita della seminatrice era di 39.5°C.



Figura 3.1.1 Seminatrice Monosem modificata (dual pipe); l'aria di scarico viene divisa in due e convogliata attraverso due tubi flessibili che la direzionano verso il suolo

Per ogni esperimento di semina si sono svolti 2 o 3 campionamenti rispettivamente all'inizio, a metà e alla fine di ogni simulazione di semina. Per la determinazione della quantità di principio attivo emesso, i filtri sono stati trattati come descritto nel Paragrafo 2.2.3, ed analizzati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (Paragrafo 2.2.6).

Dopo il campionamento già ad occhio nudo era evidente la presenza di una consistente quantità di frammenti di concia di colore rosso depositati sui filtri. In

Tabella 3.1.1 sono riportate le concentrazioni di Clothianidin e Thiamethoxam nell'aria emessa dall'impianto pneumatico dalla seminatrice per i vari tipi di semente analizzati.

Tabella 3.1.1 Emissione di Clothianidin e Thiamethoxam dalla seminatrice Monosem "modificata".

Tipo di concia	Concentrazione di p.a. (mg/m ³)				
	Prima prova	Seconda prova	Terza prova	Media	Dev. St.
Clothianidin (Poncho 2009;1.25 mg/seme)	3.10	3.85	2.30	3.1	0.8
Clothianidin (Poncho 2010;1.25 mg/seme)	13.43	11.75	/	12.6	0.8 ¹
Thiamethoxam (Cruiser 2010; 0.6 mg/seme)	7.3	6.8	4.8	6.3	1.3

¹ incertezza determinata come semi dispersione massima

Si può osservare che la concentrazione di insetticida all'uscita dalla seminatrice non è risultata costante nel tempo. In tutti i casi per le ultime misure la concentrazione si è dimostrata decisamente inferiore rispetto alle precedenti. Ciò è probabilmente imputabile al fatto che i semi, essendo recuperati e reimmessi nei serbatoi di semina di continuo, avevano già subito un fenomeno erosivo in precedenza e quindi avevano già perso gli strati più fragili di conciante.

Conoscendo la usuale velocità di avanzamento del trattore (6 Km/h), inferiore a quella impostata nell'esperimento di semina simulata, 16 Km/h, la portata del sistema di aspirazione dei semi di 230 m³/h e la concentrazione di principio attivo nei semi, è stato possibile stimare i fattori emissivi e la percentuale di principio attivo rilasciata nell'ambiente. I risultati così ottenuti sono riportati in Tabella 3.1.2

Tabella 3.1.2 Fattori emissivi da semi Poncho concia 2009 e 2010 (p.a. Clothianidin) e Cruiser concia 2010 (p.a. Thiamethoxam) della seminatrice Monosem "modificata"

Tipo di concia	emissione (g/h)	emissione (g/ha)	% p.a. disperso
Clothianidin (Poncho 2009;1.25 mg/seme)	0.71	0.40	0.48
Clothianidin (Poncho 2010;1.25 mg/seme)	2.90	1.61	1.93
Thiamethoxam (Cruiser 2010; 0.6 mg/seme)	1.45	0.80	2.01

I risultati delle analisi dimostrano che durante la semina con mais conciato si disperdono grandi quantità di polveri contenenti Clothianidin e Thiamethoxam. È importante osservare come la concentrazione di principio attivo allo scarico tra due

annate diverse di Poncho (p.a. Clothianidin) sia estremamente differente. Contrariamente alle aspettative, infatti, le emissioni misurate per i semi trattati con concia 2010, proposta dalla Bayer al fine di diminuire il quantitativo di polveri emesse, risultano invece nettamente superiori rispetto a quelle misurate per la concia 2009.

Confrontando invece le conce della stessa annata si vede come la percentuale di p.a. disperso sia decisamente maggiore nel caso del Clothianidin rispetto al Thiamethoxam. Tale differenza è spiegabile sia per la diversa concentrazione di p.a. per seme (più che doppia nel caso del Clothianidin) sia per un probabile diverso tipo di adesivante utilizzato nella confettatura; queste due tipologie di semi sono infatti prodotte da due diversi produttori, rispettivamente Bayer Cropscience AG. e Syngenta, e non stupisce quindi che possano utilizzare diverse materie prime.

Andando ad osservare i risultati ottenuti nel corso degli anni negli studi effettuati dal nostro gruppo di lavoro su queste problematiche, si può ottenere una visione d'insieme per quanto concerne i fattori emissivi, determinati su diversi tipi di semente e diverse annate di concia, nelle effettive condizioni di semina (6 Km/h). I risultati, ottenuti mediando i dati raccolti in tutti gli esperimenti di semina fin'ora condotti, sono riportati in Tabella 3.1.3 [41].

Tabella 3.1.3 Concentrazione degli insetticidi neonicotinoidi misurata in uscita dallo scarico della seminatrice Monosem durante le semine con mais conciato e i fattori emissivi stimati utilizzando i normali parametri di semina.

Tipo di concia	Concentrazione allo scarico (mg/m ³)	Fattori Emissivi		% p.a. disperso
		g/h	g/ha	
Poncho® 2008, Clothianidin 1.25 mg/seme	3.6 *	0.83	0.46	0.55
Poncho® 2009, Clothianidin 1.25 mg/seme	3.39 ± 0.47	0.78	0.43	0.52
Poncho® 2010, Clothianidin 1.25 mg/seme	12.0 ± 1.2	2.76	1.53	1.84
Cruiser® 2010, Thiamethoxam 0.6 mg/seme	5.8 ± 1.5	1.33	0.74	1.85
Regent® 2010, Fipronil 0.5 mg/seme	3.57 ± 0.46	0.82	0.46	1.37

* Valore ottenuto da un singolo campione durante i primi test del 2009.

Come si osserva, dal confronto fra le diverse annate di concia per le sementi Poncho, vi è allo scarico una concentrazione di principio attivo decisamente superiore per le nuove tipologie di concia, probabilmente imputabile al fatto che i frammenti che si staccano dal seme risultano di dimensioni più grosse (alcuni mm, tali particelle ricadono al suolo risultando meno tossiche per le api). È ipotizzabile, seppur manchino i dati a riguardo, che ciò sia valido anche per altri principi attivi oltre che per il Clothianidin (sementi Poncho). La dimensione delle particelle prodotte risulta pertanto decisiva sia nel definire i fattori emissivi sia nel determinare la composizione della nuvola emissiva e, di conseguenza, i suoi effetti tossici per le api.

3.1.2 Valutazione della concentrazione di principio attivo nelle polveri aerodisperse a 5 e 10 metri di distanza dalla seminatrice

In base alla dimensione delle particelle che sono state emesse dallo scarico dell'aspiratore centrifugo della seminatrice è possibile che queste vengano trasportate dal vento a distanze più o meno grandi rispetto alla zona di semina. Questo fenomeno dipende dalla velocità iniziale delle particelle, dalla velocità del vento e sarà tanto più significativo quanto più piccole saranno le dimensioni dei frammenti dispersi.

Per la quantificazione della concentrazione di p.a. nelle polveri aerodisperse generate durante il processo di semina, utilizzando sementi conciate con Poncho e Cruiser con confettatura 2010 e Poncho con confettatura 2009, sono stati posti una serie di campionatori fissi a cinque e a dieci metri dallo scarico del sistema pneumatico della seminatrice Monosem modificata e allineati con la direzione del flusso dell'aria come descritto nel Paragrafo 2.2.4. L'analisi di laboratorio ha evidenziato i valori di PTS e PM₁₀ riportati nelle Tabelle 3.1.4, 3.1.5 e 3.1.6.

Tabella 3.1.4 Concentrazione di Thiamethoxam nelle PTS e nel PM10 a 5 e a 10 metri dalla seminatrice Monosem “modificata” per semi confettati Cruiser conca 2010

Thiamethoxam 0.6mg/semi, conca 2010	PTS a 5 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PTS a 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM ₁₀ a 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
1 ^a prova	4.90	1.94	1.6
2 ^a prova	9.53	3.76	/
media	7.2	2.8	/
Semi dispersione massima	2.3	1.3	/

Tabella 3.1.5 Concentrazione di Clothianidin nelle PTS e nel PM₁₀ a 5 e a 10 metri dalla seminatrice Monosem “modificata” per semi confettati Poncho conca 2009

Clothianidin 1.25 mg/semi, conca 2009	PTS a 5 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PTS a 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM ₁₀ a 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
1 ^a prova	0.40	0.26	0.2
2 ^a prova	4.64	1.17	/
media	2.5	0.7	/
Semi dispersione massima	2.1	0.5	/

Tabella 3.1.6 Concentrazione di Clothianidin nelle PTS e nel PM10 a 5 e a 10 metri dalla seminatrice Monosem “modificata” per semi confettati Poncho conca 2010

Clothianidin 1.25 mg/semi, conca 2010	PTS a 5 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PTS a 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM ₁₀ a 10 metri ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
1 ^a prova	6.29	1.74	1.2
2 ^a prova	5.93	1.36	/
media	6.1	1.5	/
Semi dispersione massima	0.2	0.2	/

Dai dati ottenuti si può notare come, tranne nel caso della simulazione di semina con mais confettato Poncho 2010, i risultati ottenuti dalle prove consecutive sul medesimo tipo di semente abbiano portato a risultati abbastanza diversi. In particolare si

osserva che i valori di concentrazione ottenuti nella prima mezz'ora di campionamento risultano normalmente più bassi rispetto a quelli misurati nella seconda metà della prova. Tale fatto è imputabile a due tipi di fattori: il primo, e probabilmente il più importante, è la variabilità del vento che durante la giornata di test mutava spesso di direzione ed intensità. Questo fattore è osservabile in particolare in risultati come quelli della seconda prova con le sementi Cruiser, o la prima con quelle Poncho concia 2009, in cui il vento era particolarmente favorevole e i risultati tra le concentrazioni ottenute a 5 e 10 metri sono risultati molto più simili rispetto alle altre prove.

Il secondo fattore risiede nel fatto che la seminatrice richiede un certo tempo prima che le polveri si accumulino nei condotti di scarico e vengano emesse in modo riproducibile. Da questo punto di vista, la seconda misurazione risulterebbe più affidabile della prima. Infatti, in un secondo esperimento, condotto seguendo le medesime modalità (in questo caso però non è stato campionato il PM₁₀ a 10 metri dalla seminatrice) ma utilizzando la seminatrice Gaspardo modello "Monica", si sono ottenuti dei risultati per le PTS in linea con quelli ottenuti in precedenza solamente nella seconda misurazione.

I risultati ottenuti per tale esperimento effettuato utilizzando semi conciatati con Poncho confettato 2010 sono riportati in Tabella 3.1.7.

Tabella 3.1.7 Concentrazione di Clothianidin (Poncho 2010) nelle PTS a 5 e a 10 metri dalla seminatrice

Clothianidin 1.25 mg/seme, concia 2010	PTS a 5 metri (µg/m ³)	PTS a 10 metri (µg/m ³)
1 ^a prova	1.2	0.3
2 ^a prova	4.5	0.8
media	2.8	0.6
deviazione standard	2.3	0.4

I dati sono risultati essere anche in questo caso piuttosto variabili.

Confrontando ora i risultati ottenuti per le sementi Poncho 2010 con le due diverse seminatrici analizzate, sembrerebbe delinearci una minore emissione utilizzando la seminatrice Gaspardo modello "Monica" rispetto alla Monosem modificata. Tale considerazione però non tiene conto di diversi fattori come:

- a) il numero esiguo di prove (una) effettuate con la seminatrice Gaspardo;
- b) le condizioni climatiche e soprattutto la ventosità durante i test;
- c) il differente posizionamento del secondo trattore e dei sistemi di campionamento rispetto alla direzione del flusso in uscita dalle seminatrici.

Nella prova effettuata con la seminatrice Gaspardo, infatti, per poter far muovere a trattore fermo il sistema di semina si è dovuto posizionare un secondo trattore nel lato verso cui era rivolto il flusso di scarico del sistema aspirante e ciò può aver portato ad una sottostima delle emissioni.

Questi risultati, opportunamente uniti a quelli ottenuti in passato anche sulla seminatrice Monosem non modificata, hanno permesso di avere una visione d'insieme per quanto riguarda le emissioni a 5 e 10 metri per diverse tipologie di sementi e di seminatrici. Tali informazioni sono state raccolte in Tabella 3.1.8. [41]

Tabella 3.1.8 Concentrazione di insetticidi neonicotinoidi nel particolato campionato vicino alla seminatrice durante la semina con semi di mais concitati

Tipo di conca	Tipo di seminatrice	Distanza dallo scarico		
		5 m	10 m	
		PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM ₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Poncho® 2009, Clothianidin 1.25 mg/ seme	Monosem	28.4	13.1	n.d.
Poncho® 2009, Clothianidin 1.25 mg/ seme	Monosem modificata	4.7	1.2	0.2
Poncho® 2010, Clothianidin 1.25 mg/ seme	Monosem	15.0	5.3	n.d.
Poncho® 2010, Clothianidin 1.25 mg/ seme	Monosem modificata	6.1	1.5	1.2
Poncho® 2010, Clothianidin 1.25 mg/ seme	Gaspardo, mod. Monica	4.5	0.8	0.2
Cruiser® 2010, Thiamethoxam 0.6 mg/ seme	Monosem	4.2	1.0	0.6
Cruiser® 2010, Thiamethoxam 0.6 mg/ seme	Monosem modificata	7.2	2.8	1.6
Regent® 2010, Fipronil 0.5 mg/ seme	Monosem	12	1.9	0.5

Il valore è stato calcolato da una media di tre valori, l'incertezza è di circa il 5% (calcolata con la deviazione standar)

n.d.: non determinato

A differenza di quanto osservato in precedenza [19] per la seminatrice Monosem, in queste nuove prove sembrerebbe che la concia 2010 per il Poncho emetta più particolato e principio attivo di quella del 2009.

Tale variazione potrebbe dipendere dal fatto che, con la modifica applicata allo scarico, il cammino delle particelle diventa più tortuoso e il conseguente aumento delle collisioni tra il particolato e le pareti interne dei tubi di scarico potrebbe andare ad polverizzare e a erodere anche il particolato grossolano staccatosi dalle sementi. Si possono quindi considerare come valide le considerazioni effettuate nei lavori precedenti che delineavano una maggior dispersione in aria di principio attivo insetticida per la concia 2009 rispetto a quella del 2010; la nuova confettatura, infatti, emette un maggior quantitativo di particolato ma di dimensioni maggiori rispetto a quello prodotto dalla confettatura 2009 e tende quindi a ricadere più velocemente al suolo rispetto alle polveri di quest'ultima.

Dal confronto tra i risultati osservati per le emissioni a 5 e 10 metri per i diversi tipi di seminatrice si osserva come, le modifiche apportate alle seminatrici per risolvere il problema della dispersione dei principi attivi, non siano riuscite a migliorare sensibilmente la situazione. Se per il Clothianidin pare esservi un deciso decremento ciò non è stato verificato nel caso del Thiamethoxam e ciò fa presupporre che, una volta tolto il contributo dovuto alle fonti ambientali di incertezza nelle misure (il vento in primo luogo), non vi sia un sostanziale beneficio dall'utilizzo di questi dispositivi per l'abbattimento delle emissioni di insetticidi.

Si può inoltre osservare in tutte le misure come il particolato generato sia sufficientemente sottile da poter percorrere grandi distanze ed essere in grado di disperdersi contaminando anche ampie superfici territoriali limitrofe alle zone di semina. Questa elevata dispersione di principi attivi porta ad ipotizzare un'elevata contaminazione non solo per le api ma anche per altri insetti non-target.

3.1.3 Distribuzione dimensionale del particolato atmosferico generato dalle seminatrici

Nell'ipotesi che vi sia un effetto tossico acuto per le api associato all'esposizione al particolato di semina è estremamente importante, sia sotto il profilo ambientale che tossicologico, acquisire informazioni sulla distribuzione dimensionale delle particelle potenzialmente tossiche emesse in atmosfera. Tale valutazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di un contatore ottico di particelle (OPC) posto a 5 metri dal trattore; con tale strumento è stato così possibile misurare la concentrazione di particolato disperso durante le operazioni di semina con mais conciato con neonicotinoidi in tempo reale con un periodo di campionamento di 1 minuto.

Al fine di valutare il contributo dovuto alla disgregazione della concia, sono state preventivamente valutate le concentrazioni di particolato prima dell'inizio delle operazioni di semina (bianco campagna) e durante il funzionamento del trattore senza semente (bianco trattore). Inoltre, la possibilità di far funzionare la seminatrice a trattore fermo ha permesso di minimizzare il risollevarsi di polvere dal suolo, campionando prioritariamente il particolato dovuto alla disgregazione della confettatura che ricopre i semi. In Figura 3.1.2 sono riportati i risultati del campionamento per questo tipo di esperimento.

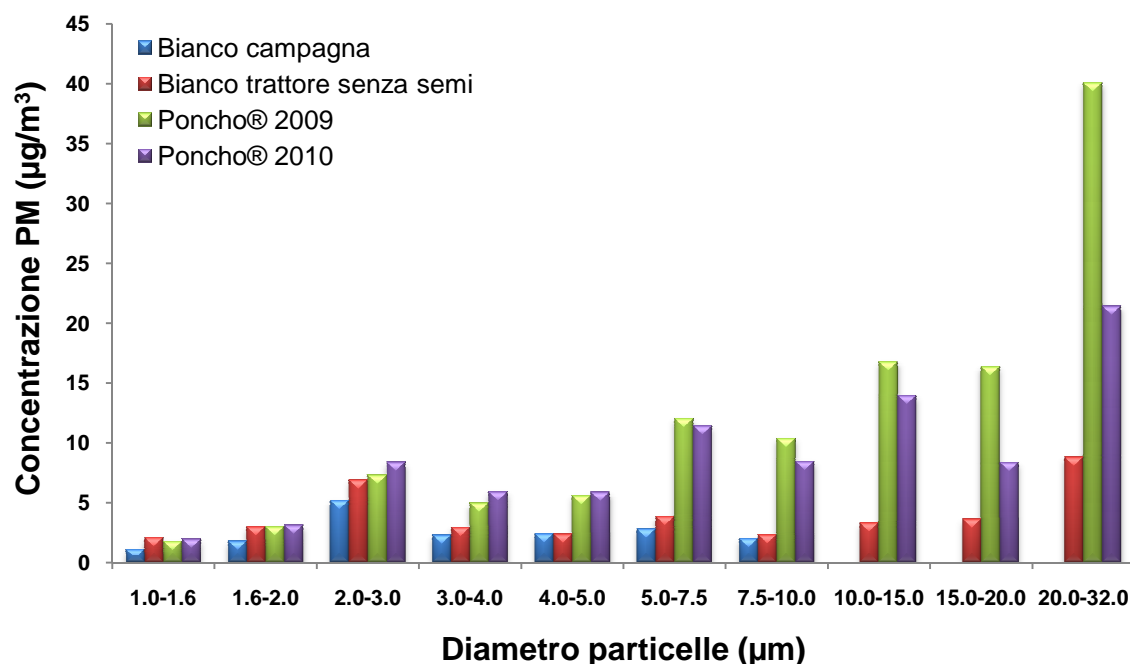


Figura 3.1.2 Concentrazioni di particolato di semina a 5 metri dalla seminatrice

Il risultato sperimentale conferma quindi l'ipotesi che la maggior parte del particolato formato durante le semine sia di tipo grossolano. Significativi aumenti nella concentrazione di particolato durante le operazioni di semina si registrano solo per le classi di particolato a dimensione più grossolana (a partire da 2-3 μm di diametro). Inoltre la concentrazione di PM è molto maggiore per la semina con mais conciato con confettatura 2009 a conferma dei risultati analitici ottenuti dal campionamento su filtri. Le particelle che vengono emesse dai semi confettatura 2010 pur essendo in quantità maggiore, sono di dimensioni più grosse (alcuni μm) e ricadono principalmente a distanze minori dalla seminatrice, con conseguente minore dispersione in aria.

I risultati sperimentali ottenuti in questi esperimenti confermano quindi l'ipotesi di una consistente produzione e diffusione di particolato contenente l'insetticida durante le operazioni di semina con mais conciato. [19]

3.2 Analisi dei residui di principio attivo in campioni di api esposte al particolato di semina

Durante le prove di semina di mais conciato effettuate in campo è sempre stato osservata la presenza di numerose api manifestanti sintomi da intossicazione acuta presso le arnie posizionate a circa un centinaio di metri dai campi seminati. Nelle ore e nei giorni seguenti alle semine, infatti, sono state rinvenute un numero elevato di api morte, fenomeno che ben riproduceva le morie osservate in tutt'Italia in seguito alle semine primaverili di mais conciato con neonicotinoidi prima della sospensione dell'utilizzo di tali sementi.

Dopo tali osservazioni, durante le diverse simulazioni di semina in campo, sono stati effettuati una lunga serie di test atti ad indagare le modalità e le quantità con cui i neonicotinoidi e le api entrano in contatto. Va tuttavia osservato che una valutazione della contaminazione delle api con il particolato emesso dalla seminatrice richiederebbe un approccio più rigoroso di quello sperimentale adottabile in campo e cioè conducendo tali esperimenti in una camera di esposizione dedicata quale una galleria del vento o un laboratorio isolato per prove di emissione come quello istituito da Pochi e i suoi collaboratori.[40] Tuttavia i test condotti in campo possono risultare ben più vicini alle

reali condizioni in cui vengono a trovarsi le api durante l'atto di semina. Infatti, l'analisi su singole api campionate in campo ha portato a rilevanti informazioni sia sugli effetti dell'esposizione delle api che sul meccanismo di diffusione dell'insetticida.

3.2.1 Verifica del contenuto di insetticidi in api che hanno sorvolato il campo di semina

Le prove di simulazione di semina impieganti mais conciato con Clothianidin (Poncho 2010, 1.25 mg/semi) descritte in precedenza sono anche servite da test di esposizione delle api in volo. Per essere certi del passaggio di un cospicuo numero di api nei pressi della seminatrice, esse sono state in precedenza abituate a trovare una soluzione zuccherina in appositi dispenser posti al termine del campo sperimentale.

Per minimizzare il contributo dovuto al risollevarsi di polvere dal suolo e avere un flusso costante di polveri contenenti i principi attivi nella zona di passaggio delle api, la semina è stata simulata a trattore fermo.

Da precedenti test effettuati con la seminatrice "Monosem Plus" si sono osservate concentrazioni di neonicotinoidi variare in un intervallo compreso tra i 450 e i 3500 ng/ape in api catturate dopo circa mezz'ora dall'inizio della semina, indipendentemente dalla tipologia di insetticida impiegato. In questo elaborato di tesi, partendo da tali risultati, sono state invece impiegate altre due seminatrici per poter così osservare se eventuali modifiche apportate (Monosem Plus "modificata") o dovute a nuova progettazione (Gaspardo modello Monica) possano in qualche modo diminuire la concentrazione di insetticida a cui le api vengono esposte.

In un test condotto utilizzando la seminatrice Monosem Plus con modifica allo scarico (dual pipe), sono state campionate e analizzate delle api che, dopo aver sorvolato l'area di semina, sono state catturate vive nei pressi del dispenser dopo circa un'ora dall'inizio della semina. Le concentrazioni di principio attivo in cinque di queste api vengono esposte in Tabella 3.2.1.

Tabella 3.2.1. Concentrazioni di Clothianidin rinvenute nei campioni di api prelevate vive dal dispenser dopo circa un'ora di semina del mais con seminatrice Monosem modificata

Campioni dal dispenser	Clothianidin (ng/ape)*
1	78 ± 2
2	120 ± 4
3	560 ± 3
4	1241 ± 3
5	845 ± 3

* Incertezze calcolate come semi dispersione massima.

Dall'osservazione di tali dati si evidenzia quindi che le api libere di volare risultino pesantemente contaminate dalle polveri emesse dalla seminatrice anche con l'utilizzo della modifica apportata all'originale modello Monosem Plus. La significativa eterogeneità dei dati è invece dovuta sia al diverso numero di voli sul campo che ogni ape ha compiuto e sia a differenti percorsi intrapresi.

Altri risultati sono stati raccolti impiegando la seminatrice "Gaspardo modello Monica" progettata con lo scarico a livello del rilascio dei semi (a circa venti centimetri dal suolo) allo scopo di far fluire la nube di particolato verso il terreno così da ottenere un minor impolveramento delle api. I campionamenti sono stati effettuati prelevando dieci api trovate già morte nei contenitori posti di fronte alle arnie, tenendo presente che in quel pomeriggio la seminatrice è rimasta in funzione per circa un'ora e mezza e che le api hanno continuato a volare tra l'arnia e il dispenser passando attraverso il campo. I risultati sono riportati in Tabella 3.2.2.

Tabella 3.2.2 Concentrazioni di Clothianidin rinvenute nei campioni di api raccolte morte davanti l'arnia dopo una semina con seminatrice Gaspardo

Campione	Clothianidin (ng/ape)
1	7459 ± 8
2	5837 ± 24
3	2543 ± 2
4	1459 ± 1
5	11316 ± 4
6	657 ± 2
7	2191 ± 2
8	3288 ± 2
9	532 ± 1
10	1054 ± 2

Anche in queste api si nota immediatamente che la contaminazione è estremamente elevata e che le concentrazioni risultano nettamente superiori rispetto a quelle trovate utilizzando la seminatrice modello Monosem Plus. C'è da tenere in considerazione comunque che la durata della semina è risultata più lunga (mezz'ora in più) e che le api sono state catturate morte anziché vive.

In tutti gli esperimenti condotti è stato comunque notata una elevata variabilità dei dati, dovuta, come citato in precedenza, al diverso numero di voli sul campo che ogni ape compie e al possibile effetto di processi di pulizia che ogni ape può effettuare, sia in volo che all'interno dell'alveare. Proprio per questi motivi inoltre non si è mai potuto osservare una sostanziale e progressiva variazione della concentrazione di insetticida nelle api dipendente dal tempo di campionamento rispetto all'inizio della semina. Si può comunque concludere che con qualsiasi modello di seminatrice impiegato le api vengono esposte ad una concentrazione di insetticida tale da risultare altamente tossica rendendo praticamente vana qualsiasi modifica strutturale finora attuata sulle diverse seminatrici.

3.2.2 Esposizione diretta delle api (in gabbia) allo scarico della seminatrice

Durante delle simulazioni di semina sono stati condotti degli esperimenti impiegando api poste in gabbiette con l'obiettivo di verificare come e in che quantità il particolato vada a contaminare le api poste a diverse distanze e diverse altezze rispetto allo scarico della ventola delle differenti seminatrici.

A tal proposito sono stati impiegati semi concitati con Imidacloprid 2010 e Clothianidin 2010, utilizzando inizialmente la seminatrice "Monosem" e in un secondo momento la stessa seminatrice equipaggiata con il deflettore "dual pipe" proposto per l'abbattimento delle emissioni. Allo scopo sessanta api sono state catturate prima dell'inizio della semina, poste in gabbiette di tulle e successivamente, a gruppi di dieci, sono state ancorate su di un'asta mobile trasportabile. L'asta è stata poi esposta al particolato di semina posizionandola, per ciascuna seminatrice, su entrambi i lati in maniera che la fila di gabbiette risultasse perpendicolare alla seminatrice. I tempi di

esposizione sono stati di circa 30 secondi, per approssimare il passaggio dell'ape nei pressi della seminatrice.

Di tutte le api esposte è stato poi deciso di analizzarne (con il procedimento descritto nel Paragrafo 2.2.6) cinque per ciascun lato di ogni seminatrice. Nelle Tabelle 3.2.3 e 3.2.4 vengono esposti i risultati ottenuti dopo l'esposizione allo scarico della seminatrice Monosem non modificata e con l'applicazione dello scarico dual pipe.

In Tabella 3.2.5 sono invece riportati i valori di concentrazione ottenuti dopo l'esposizione delle api allo scarico della seminatrice Monosem non modificata, impiegando sementi conciate con Clothianidin 2010.

Tabella 3.2.3 Confronto tra le concentrazioni di Imidacloprid 2010 riscontrate nelle api posizionate a destra delle due differenti seminatrici

Distanza dalla seminatrice	Concentrazione di p.a. nelle api a destra della seminatrice non modificata (ng/ape)	Concentrazione di p.a. nelle api a destra della seminatrice modificata (dual pipe) (ng/ape)
1 m	4786.3 ± 0.6	2372 ± 1
2.25 m	457.3 ± 0.6	424 ± 2
4.5 m	142.3 ± 0.6	134 ± 1
6.75 m	523 ± 3	1778 ± 1
9 m	198.7 ± 0.6	500 ± 1

Tabella 3.2.4 Concentrazioni di Imidacloprid 2010 ottenute a sinistra delle due differenti seminatrice

distanza dalla seminatrice	Concentrazione di p.a. nelle api a destra della seminatrice non modificata (ng/ape)	Concentrazione di p.a. nelle api a destra della seminatrice modificata (dual pipe) (ng/ape)
1 m	< LOD	< LOD
2.25 m	410 ± 2	< LOD
4.5 m	110 ± 1	< LOD
6.75 m	98 ± 2	25
9 m	33 ± 1	< LOD

Tabella 3.2.5 Concentrazioni di Clothianidin 2010 rinvenute nelle api esposte alla seminatrice “Monosem Plus”

Distanza dalla seminatrice	Concentrazione di Clothianidin a destra della seminatrice (ng/ape)	Concentrazione di Clothianidin a sinistra della seminatrice (ng/ape)
1 m	1393.6 ± 0.6	115.3 ± 0.6
2.25 m	808 ± 2	80.7 ± 0.6
4.5 m	64 ± 4	110 ± 1
6.75 m	164	598.7 ± 0.6
9 m	100.5 ± 0.7	25 ± 1

Dai dati ottenuti si può notare come, essendo lo scarico della seminatrice “Monosem Plus” rivolto verso destra, in tale posizione le concentrazioni di Imidacloprid, riscontrate nelle api, sono state di gran lunga superiori rispetto a quelle trovate nelle api esposte sul lato sinistro. Inoltre, si osserva, non sempre chiaramente, come la concentrazione di insetticida nelle api esposte diminuisca utilizzando la seminatrice modificata. L’efficacia di far confluire verso il terreno gli scarichi emessi appare però modesta in quanto le concentrazioni riscontrate rimangono comunque elevate e potenzialmente molto tossiche per le api.

L’andamento non linearmente decrescente che è stato visto all’aumentare della distanza dalla seminatrice non ha reso semplice la determinazione di una corrispondenza tra distanza e quantità di insetticida trovato nelle api. Questo andamento altalenante di risultati può essere però spiegato considerando che la velocità con cui l’aria viene espulsa dallo scarico crea un moto turbolento che conseguentemente disperde il particolato in concentrazioni molto variabili e non lineari da zona a zona. Concentrazioni non trascurabili sono infatti misurate anche a sinistra della seminatrice non modificata.

A 10 metri dalla seminatrice le quantità di insetticida misurate sulle api esposte appaiono ancora significative, a conferma delle dimensioni della nuvola di particolato che si produce allo scarico.

Al fine di valutare l’effetto dello scarico lungo il profilo verticale, altre api sono state poste, rinchiusse nelle gabbiette di tulle, a bordo del campo a circa tre metri dalla seminatrice, a due differenti altezze: al suolo e a 1.8 metri di altezza. Anche in questo esperimento è stata impiegata la seminatrice “Monosem Plus” in assenza della modifica

e sementi confettate con Poncho 2010. I dati ottenuti hanno mostrato come le api poste al suolo siano state solo lievemente contaminate: solo in due degli otto campioni, infatti, sono state riscontrate concentrazioni di Clothianidin pari a 45 e 118 ng/ape. All'altezza di 1.8 metri un maggior numero di api è invece stato contaminato dal particolato in uscita dalla seminatrice presentando inoltre maggiori concentrazioni di principio attivo: sette campioni su otto hanno dimostrato di essere stati contaminati con un intervallo di concentrazione che spaziava tra 1004 e 147 ng/ape. Ciò ha permesso di avvalorare l'ipotesi che, nel corso delle misure ambientali, il posizionamento corretto per le teste di campionamento per i PTS e PM₁₀ fosse a circa un metro e mezzo di altezza.

Per meglio individuare una possibile relazione tra l'altezza o il posizionamento e la quantità di insetticida con cui le api vengono contaminate è stato condotto un altro esperimento. Partendo dal presupposto che normalmente le api volano ad un'altezza compresa tra gli 0.5 e i 4 metri dal suolo, sono state prese in esame tre diverse altezze e due differenti posizioni rispetto alla seminatrice "Monosem Plus" in assenza di modifica, nella quale sono stati impiegati semi Gaucho 2010 (p.a. Imidacloprid). Settanta api sono state esposte come mostrato nello schema di Tabella 3.2.6.

Tabella 3.2.6 Schema riassuntivo dell'esposizione delle api alla seminatrice Monosem durante una simulazione di semina con mais conciato Gaucho 2010

Quantità e posizione
10 api Bianco
10 api esposte dietro alla seminatrice ad una altezza di 0.5 metri e distanti 4 metri
10 api esposte dietro alla seminatrice ad una altezza di 1.8 metri e distanti 4 metri
10 api esposte dietro alla seminatrice ad una altezza di 3 metri e distanti 4 metri
10 api esposte parallelamente alla seminatrice a 0.5 metri di altezza
10 api esposte parallelamente alla seminatrice a 1.8 metri di altezza
10 api esposte parallelamente alla seminatrice a 3 metri di altezza

I gruppi di api posti dietro alla seminatrice sono stati tutti collocati alla stessa distanza di circa quattro metri dalla seminatrice mentre le api esposte parallelamente sono state posizionate sul lato destro in corrispondenza del verso in cui è rivolto lo scarico e in modo che le gabbiette risultassero in progressiva distanza dalla seminatrice

come per gli esperimenti precedenti. Anche in questo caso, infatti, per posizionare le gabbiette è stata utilizzata l'asta mobile in metallo.

Dai dati ottenuti è emerso chiaramente come il gruppo di api esposte parallelamente alla seminatrice non modificata abbia mostrato globalmente di essere stato maggiormente contaminato rispetto a qualsiasi altro campione d'ape posto nel retro della seminatrice. Appurato ciò, è stato notato inoltre come l'altezza in cui il particolato meglio si concentrava era a 1.8 m e 3 m nella posizione parallela e 3 m nella posizione posteriore. Tali dati confermano quindi che le zone in cui maggiormente viene a concentrarsi il particolato emesso dalla seminatrice corrispondono all'altezza in cui solitamente volano le api e nelle quali sono stati effettuati i campionamenti di particolato.



Figura 3.2.1 Nube di talco dimostrativa emessa dalla seminatrice “Monosem Plus” sul lato destro

Questa seminatrice è stata in grado, come dimostrato, di far fuoriuscire un'elevata concentrazione di particolato contenente i principi attivi neonicotinoidi. Per questa ragione sono stati progettati degli accorgimenti atti a diminuire le emissioni verso l'alto del particolato applicando, nel nostro caso, un deflettore, denominato “dual pipe”, in grado di dividere in due il flusso emissivo e portarlo a pochi centimetri dal suolo per far collidere le particelle con il suolo.

Anche le case costruttrici, a loro volta, hanno tentato di costruire dei nuovi modelli quali la “Gaspardo modello Monica” e la “Gaspardo modello Magica” posizionando lo

scarico a livello della caduta dei semi. A detta del costruttore questi modelli sarebbero stati in grado di ridimensionare la diffusione di particolato nell'ambiente. Tale dichiarazione, per quanto concerne la "Gaspardo modello Monica", è stata però prontamente smentita con esperimenti condotti campionando il particolato a 5 e 10 metri e misurando la quantità di insetticidi nelle api posizionate nei pressi della macchina. Infatti, anche se in quantità lievemente inferiori rispetto a quanto emesso dalla "Monosem Plus", le quantità di principio attivo emesse da questo modello di seminatrice risultavano comunque letali per le api.

Presso il CRA di Roma (Centro per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura) è anche stata sperimentata una macchina seminatrice in cui l'aria allo scarico veniva filtrata attraverso un filtro aria per automobili (Figura 3.2.2). Si tratta di una seminatrice Gaspardo modello "Magica" operante con sementi conciate con principio attivo Clothianidin 2011, un nuovissimo tipo di confettatura atta a migliorare la resistenza alle abrasioni di tipo meccanico. La prova di esposizione è stata condotta utilizzando ottanta api suddivise in 8 gruppi. Ciascun gruppo di dieci api è stato collocato all'interno di gabbiette di tulle ancorate ad un'asta di metallo. L'esposizione dei gruppi ha avuto una durata di circa un minuto (pari a quattro/cinque passaggi dell'ape sopra il campo). Nelle condizioni operative la seminatrice compiva un tragitto di 100 metri a circa 6-7 Km/h.



Figura 3.2.2 Immagine del filtro usato come modifica alla Gaspardo Magica

Di tutte le api impiegate nell'esperimento solo le api morte entro 24 ore sono state raccolte ed analizzate presso il nostro Dipartimento secondo la procedura esplicitata nel

Paragrafo 2.2.6. La suddivisione e le posizioni in cui sono state ubicate le gabbiette contenenti le api sono elencate qui di seguito in tabella 3.2.7

Tabella 3.2.7 Posizione e numero delle api esposte nell'esperimento utilizzando la seminatrice Gasparo "Magica" con nuove sementi contenenti p.a. Clothianidin 2011

Descrizione	N° api
Api Controllo 1 (api esposte alla seminatrice pulita senza seme)	10
Api Controllo 2 (api esposte alla seminatrice pulita senza seme)	10
Api esposte 2.5 m sopra la seminatrice -Prima prova-	10
Api esposte 2.5 m sopra la seminatrice -Seconda prova-	10
Api esposte 0.5 m dietro la seminatrice	10
Api esposte sottovento a 0.5 m dietro la seminatrice ad un'altezza di 1.8 m	10
Api esposte dietro la seminatrice non modificata -Prima prova-	10
Api esposte dietro la seminatrice non modificata -Seconda prova-	10

I dati ottenuti hanno rivelato immediatamente come la seminatrice modificata diminuisca in modo molto efficace la concentrazione di insetticida nella nube dei gas di scarico (riscontrato in soli otto campioni con una concentrazione inferiore ai 50 ng/ape), mentre nelle due prove effettuate senza modifica si è visto che le api contaminate e decedute sono state il 98% con una concentrazione di Clothianidin decisamente più elevata e letale rispetto alle altre (da 30 a 300 ng/ape). Paragonando inoltre le concentrazioni rinvenute nelle api in tutte le seminatrici utilizzate, è stato possibile dedurre che la seminatrice "Gaspardo Magica" è stata in grado di contaminare le api con concentrazioni nettamente inferiori rispetto a quelle ottenute nei precedenti esperimenti. E' però doveroso prendere atto che l'impiego di mais conciato con nuova confettatura, nello specifico Clothianidin 2011, possa aver influito in maniera non marginale a tale risultato. Le ultime annate di confettatura sono state studiate infatti per resistere maggiormente alle abrasioni o comunque a disgregarsi in particelle piuttosto grossolane per limitare il più possibile la dispersione delle polveri.

Per quanto concerne l'utilizzo del filtro per auto quale modifica allo scarico della "Gaspardo Magica", esso è stato notato svolgere un effettivo abbattimento delle polveri. Le api decedute in quegli esperimenti, infatti, quasi certamente erano state investite da sbuffi della nube dello scarico che fuoriuscivano da altre parti della seminatrice, non perfettamente a tenuta. L'unico inconveniente nell'utilizzo di tale filtro è che non può essere utilizzato come modifica permanente in quanto si ostruisce rapidamente e

dovrebbe essere ripulito ad intervalli di tempo estremamente brevi rispetto alla durata di semina.

Dopo tali esperimenti si può quindi affermare con certezza che la contaminazione che avviene in campo è dovuta, come già detto, al particolato contenente gli insetticidi che esce dallo scarico della seminatrice. Dai test condotti a varie distanze dalla seminatrice si può inoltre dedurre che con qualsiasi tipo di seminatrice, modificata o meno, le api vengono investite con una concentrazione altamente letale, anche con un singolo passaggio nei pressi delle zone di semina.

3.2.3 L'umidità come fattore determinante la tossicità dei neonicotinoidi

Da alcuni esperimenti condotti in precedenza ponendo le api, dopo l'esposizione al particolato di semina, in diverse condizioni di umidità si è visto come tale parametro influisca in maniera determinante sulla mortalità. Infatti in condizioni di alta umidità si è notato che la mortalità delle api esposte viene notevolmente aumentata e velocizzata. Si è pertanto condotto un esperimento atto a verificare e a quantificare tale osservazione.

I campionamenti sono stati eseguiti prelevando dall'alveare trentasei api, ponendole in gabbiette di tulle ancorate ad un'asta metallica, ed esponendole alle polveri dello scarico della seminatrice Monosem Plus modificata a due diversi intervalli di distanza dallo scarico. La procedura di esposizione è stata eseguita simulando il volo delle api attraverso il campo, effettuando un passaggio di andata e ritorno dell'asta metallica nei pressi della seminatrice per un tempo approssimativo di circa 30 secondi. Successivamente le api sono state suddivise, per ciascun intervallo di distanza, in due gruppi posti uno in ambiente umido (UR = 98%) e uno nelle normali condizioni di umidità dell'arnia (UR ~ 70%), come viene descritto di seguito:

- 10 api tenute a 4-8 m dalla seminatrice e mantenute in normali condizioni di umidità
- 10 api tenute a 4-8 m dalla seminatrice e mantenute ad alta umidità
- 10 api tenute a 0-4 m dalla seminatrice e mantenute in normali condizioni di umidità
- 10 api tenute a 0-4 m dalla seminatrice e mantenute ad alta umidità

Le api così campionate sono state mantenute nelle condizioni sopra elencate durante l'arco della giornata e una volta morte poste in congelatore. Di queste api ne sono state scelte cinque per ogni gruppo da sottoporre all'analisi. I risultati vengono esposti in Tabella 3.2.8 e 3.2.9

Tabella 3.2.8 Concentrazioni di Clothianidin espresse in ng/ape rinvenute nei campioni di api poste nei due intervalli di distanza dalla seminatrice tenute in normali condizioni di umidità

Campione in condizioni ambientali	Clothianidin (ng/ape)			
	0-4 metri dalla seminatrice*	Media (ng/ape)	4-8 metri dalla seminatrice*	Media (ng/ape)
1	434		68	
2	386		119	
3	174	268 ± 149	126	125 ± 52
4	275		209	
5	71		104	

*Incertezza calcolata come semidispersione massima, i valori non riportati in tabella sono compresi tra 0.5 e 1 ng/ape.

Tabella 3.2.9 Concentrazioni di Clothianidin espresse in ng/ape rinvenute nei campioni di api poste nei due intervalli di distanza dalla seminatrice tenute in condizioni di alta umidità

Campione in alta umidità	Clothianidin (ng/ape)*			
	0-4 metri dalla seminatrice*	Media (ng/ape)	4-8 metri dalla seminatrice*	Media (ng/ape)
1	314		135	
2	118		75	
3	1554 ^a	250 ± 134	220	189 ± 156
4	161		446	
5	405		70	

^aLa media è stata eseguita escludendo il valore anomalo.

* Incertezza calcolata come semidispersione massima, i valori non riportati in tabella sono compresi tra 0.5 e 1 ng/ape.

Dai dati ottenuti si nota subito che la quantità di Clothianidin è inferiore nei campioni di api tenute nell'intervallo di distanza 4-8 metri rispetto a quelle tenute nell'intervallo 0-4 metri anche se, l'andamento risulta abbastanza irregolare a causa dei moti turbolenti dell'aria nei pressi della seminatrice.

Tali risultati vanno quindi a confermare l'andamento già visto con le api poste in gabbia nel precedente paragrafo e dalle misure di PTS e del PM₁₀.

Le api mantenute ad alta umidità presentano una concentrazione lievemente superiore di quelle tenute a secco ma non estremamente diverso a differenza di ciò che è stato osservato in altri casi. In esperimenti condotti precedentemente, infatti, è stato visto come la concentrazione dei neonicotinoidi è risultata nettamente inferiore nei campioni mantenuti ad umidità inferiore al 70% rispetto a quelli mantenuti al di sopra del 90% di umidità. Si potrebbe quindi ipotizzare che le api mantenute nelle normali condizioni di umidità all'interno di gabbiette di tulle non siano state in grado di procedere ai normali atti di pulizia che solitamente svolgono.

Alla discrepanza riscontrata nelle due differenti condizioni di umidità è stata trovata comunque risposta notando che l'alta umidità è in grado di far aderire le particelle di principio attivo che si trovano a contatto con l'ape. Infatti, grazie alla buona solubilità dei principi attivi in acqua (minore per il Fipronil), la presenza di una forte umidità favorisce l'ammorbidirsi della particella di concia che aderisce al tegumento dell'ape rendendo praticamente impossibile l'auto-pulizia che quest'ultima normalmente cerca di mettere in atto. Tale effetto è stato confermato anche in microscopia elettronica con l'osservazione dell'immagine al SEM qui sotto riportata.

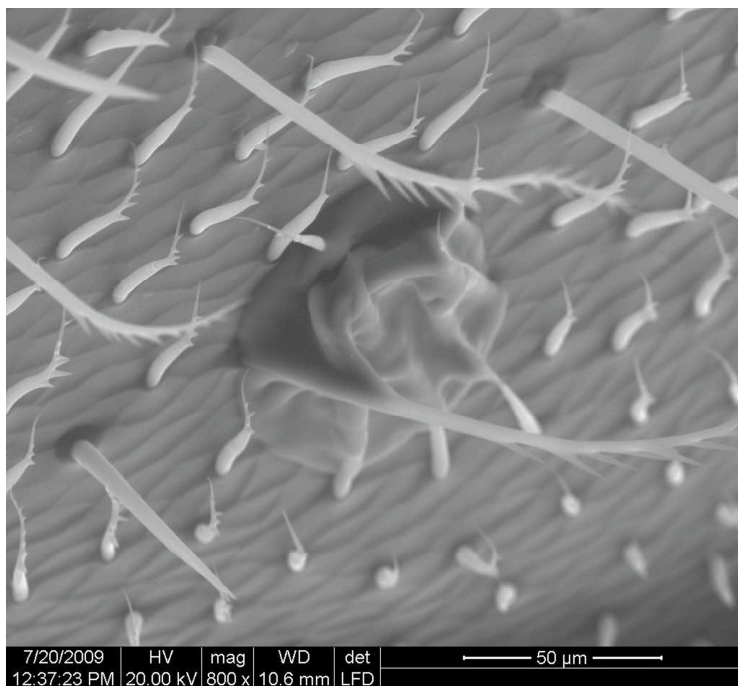


Figura 3.2.3 Frammento di confettatura individuato sull'addome di un'ape

Inoltre, la buona adesività delle particelle favorisce maggiormente l'assorbimento degli insetticidi, i quali sono in grado di portare le api a morire molto più rapidamente rispetto alle api mantenute in condizioni di bassa umidità.

3.3 Degradazione dei principi attivi e formazione di metaboliti

3.3.1 Test di degradazione dei principi attivi nelle api

In collaborazione con il dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni vegetali dell'Università di Padova sono stati condotti diversi esperimenti in laboratorio atti ad indagare come i diversi fattori biologici ed ambientali possano portare ad una degradazione degli insetticidi nelle api esposte alla contaminazione. Tali studi sono stati effettuati per cercare una spiegazione alla totale assenza di neonicotinoidi riscontrata in passato in diversi campioni di api morte prelevate nei pressi dell'arnia dopo le normali procedure di semina con mais conciato. Questa problematica è stata da noi recentemente confermata in seguito ad un esperimento svolto nel luglio 2010, nel quale api morte dopo una normale procedura di semina e lasciate per diverso tempo (fino a 5 giorni) a contatto con il suolo, sono risultate prive di principio attivo.

Si è quindi iniziato ad effettuare diversi test sulle api drogandole artificialmente così da poter analizzare singolarmente i possibili effetti dei diversi fattori ambientali. Un primo approccio ha avuto luogo in un precedente lavoro di tesi [19], nel quale quaranta api già morte (suddivise in gruppi da cinque per i diversi tempi di esposizione) sono state drogate con circa 500 ng di Thiamethoxam. La somministrazione era stata effettuata mediante una iniezione sottocutanea addominale di 5 µL di una soluzione acquosa contenente il principio attivo mediante un "ago-micropipetta" costruito ad hoc. Il quadro risultante indicava chiaramente che per tutta la durata dell'esperimento (48 ore), mantenendo costanti le condizioni di temperatura (24°C) ed umidità (50%), non vi erano evidenti indicazioni di processi degradativi. Pertanto, è stato ragionevolmente ipotizzato che il non reperimento di principio attivo in api morte raccolte davanti agli alveari nelle prove antecedenti a questa fosse da ascrivere ad alcuni fattori di tipo

ambientale ma soprattutto a meccanismi di tipo biologico che vengono a verificarsi quando l'ape è ancora in vita.

In seguito a questi risultati è stato condotto un primo test di verifica della degradazione campionando cinquanta api vive suddivise in gruppi da cinque. Quarantacinque di queste sono state drogate con 500 ng di Thiamethoxam come descritto nel Paragrafo 2.2.5. I vari gruppi sono stati lasciati per 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore a temperatura (23 °C) e umidità (70 %) costanti. In questo esperimento la morte è sopraggiunta in un intervallo compreso tra i 15 e i 30 minuti circa dall'inizio del drogaggio. L'analisi è stata effettuata con il metodo descritto nel paragrafo 2.2.6 e i dati così ottenuti sono riportati in Tabella 3.3.1 e in Figura 3.3.1

Tabella 3.3.1 Valutazione della degradazione di Thiamethoxam somministrato ad api vive mantenute in condizioni di umidità (70%) e temperatura (24°C) costanti

Concentrazione di Thiamethoxam recuperata nelle api (ng/ape)			
Tempo (h)	Drogaggio teorico	Media totale dei cinque campioni	Dev.St
	(ng/ape)	d'api di ciascun (ng/ape)	
0	Bianco	0	0
0	500	408	128
1	500	431	114
2	500	617	185
4	500	414	96
8	500	472	129
16	500	374	102
24	500	305	75
48	500	307*	80
72	500	180	57

* media calcolate su soli quattro valori, escludendo il valore anomalo

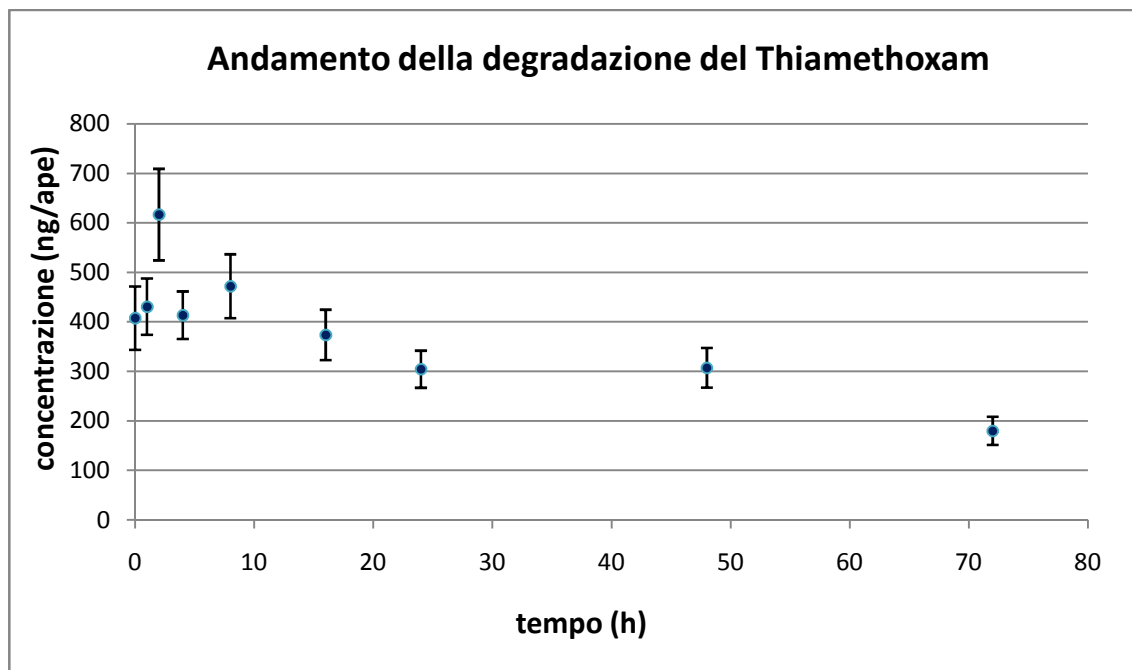


Figura 3.3.1 Andamento delle concentrazioni di Thiamethoxam presenti nelle api drogate con 500 ng/ape a diversi intervalli di tempo mantenute al 70% di umidità .

Dai dati ottenuti si può constatare una certa irriproducibilità nel trattamento di somministrazione che ha fornito almeno un dato sicuramente anomalo per il gruppo di api congelate dopo 2 h. Si evidenzia comunque un andamento decrescente dei valori di concentrazione in funzione del tempo dalla somministrazione della soluzione. La scarsa precisione è imputabile essenzialmente alla procedura di drogaggio delle api vive che viene descritta nel Paragrafo 2.2.5.

Il quadro risultante conferma le aspettative, ovvero che il non reperimento del principio attivo in api morte raccolte davanti all'alveare può essere dovuto a processi di degradazione biologica e/o batterica che vengono a svilupparsi nell'ape ancora viva una volta che questa entra in contatto con l'insetticida.

Appurato che la degradazione avviene all'interno dell'ape inizialmente ancora nel pieno della sua attività, si è passati ad indagare come differenti situazioni meteorologiche, quali ad esempio differenti gradi di umidità, possano influire nella degradazione *post mortem* dell'insetticida. In realtà questa variabile era già stata presa in considerazione in quanto, da alcuni esperimenti di esposizione delle api in campo poi opportunamente poste in condizioni di alta o bassa umidità, erano state evidenziate differenze significative nei valori di concentrazione dell'insetticida in esse contenuto.

Per studiare meglio questo tipo di problematica, quarantacinque api, di cui quarantadue drogate ciascuna con 500 ng di Thiamethoxam e tre tenute per il bianco, sono state lasciate per tempi diversi, rispettivamente 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 48 ore, in due box a temperatura costante (24 °C) ma con differente grado di umidità: 96% nel primo caso e 60% nell'altro. La morte per tutti i campioni è sopraggiunta dopo circa 15-30 minuti dal drogaggio. Le api sono state quindi analizzate con il metodo descritto nel Paragrafo 2.2.6 ottenendo i risultati esposti in Tabella 3.3.2 e Figura 3.3.2.

Tabella 3.3.2. Andamento della concentrazione del Thiamethoxam nel tempo in api mantenute in condizioni di bassa (60 %) ed alta (96%) umidità, dopo somministrazione di circa 500 ng/ape di insetticida.

Tempo (h)	Concentrazione di Thiamethoxam (ng/ape)			
	60% Umidità		96% Umidità	
	Media	Dev.St.	Media	Dev.St
Bianco	0		0	
0	561	31	514	44
2	410	63	408	30
4	443	52	390	30
8	448	43	384	11
16	384	60	250	109
24	389	13	255	90
48	331	7	246	73

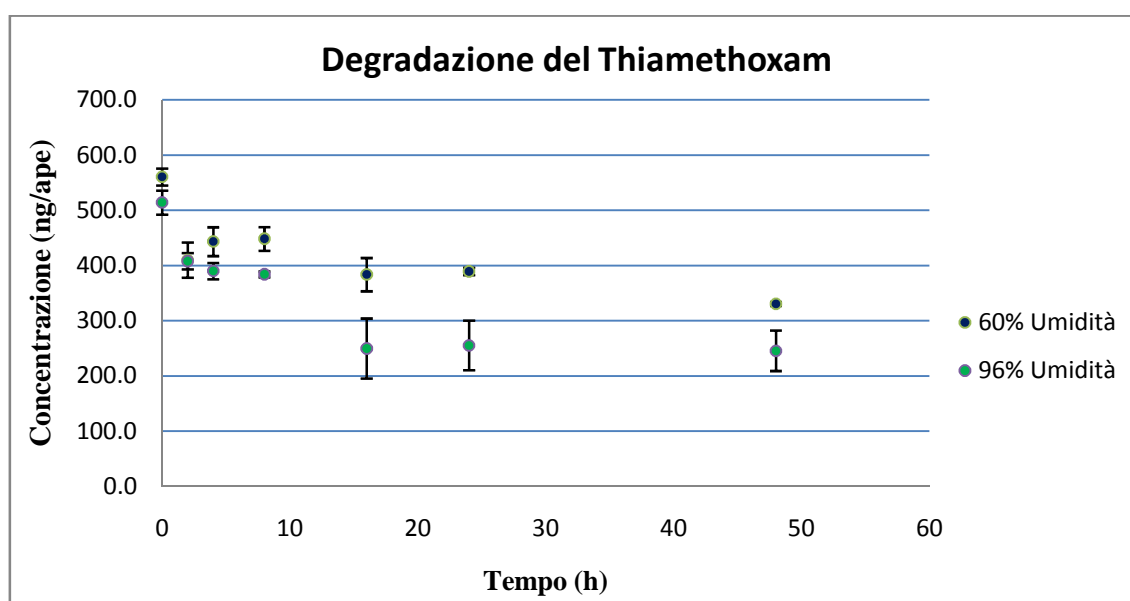


Figura 3.3.2 Andamento delle concentrazioni di Thiamethoxam a confronto nelle condizioni di alta (96%) e bassa (60%) umidità, dopo somministrazione di circa 500 ng/ape di insetticida.

Da questi dati è emerso chiaramente che la degradazione del Thiamethoxam avviene in entrambe le condizioni ma è più pronunciata nei campioni d'ape mantenuti ad una più elevata umidità.

Si può pertanto ipotizzare che le condizioni di maggiore umidità, oltre a favorire la maggiore penetrazione dell'insetticida, contribuiscano ad accelerare il processo di degradazione *post mortem*, rendendo ancor più difficile il rinvenimento degli insetticidi nelle api morte dopo l'esposizione al particolato prodotto durante le semine.

In seguito a tali risultati è stata posta in discussione la quantità di neonicotinoide somministrato all'ape. La concentrazione inizialmente utilizzata, pari a 500 ng/ape, era stata decisa osservando le quantità di principio attivo rinvenute nelle api effettuando i test di esposizione al particolato di semina. I test di degradazione non hanno però mostrato una cinetica tale da degradare completamente l'insetticida nell'arco di pochi giorni con questi quantitativi di principio attivo. L'esperimento è stato quindi ripetuto impiegando una dose più bassa di insetticida (125ng/ape, comunque superiore all'LD₅₀) e misurando la degradazione su un intervallo temporale più lungo.

Per questa prova sono state impiegate novanta api: ottantacinque drogate e cinque non drogate ed utilizzate come bianco di riferimento. Le api sono state quindi suddivise in gruppi e poste in differenti condizioni come viene descritto nella Tabella 3.3.3. Il tempo impiegato dalle api per morire con tale quantità di principio attivo somministrato è stato di circa un'ora.

Tabella 3.3.3 Suddivisione delle novanta api utilizzate per l'esperimento di drogaggio a 125ng/ape di Thiamethoxam

Umidità	Tempo									
	Bianco	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
30%			5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api
90%	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api	5 api

Dalle analisi effettuate si è riscontrata la presenza del principio attivo solo in quattro campioni drogati e congelati subito dopo la morte (Tempo 0); le concentrazioni rinvenute ricadevano in un intervallo compreso tra i 50 e i 124 ng/ape.

Tali risultati fanno presumere che il metabolismo dell'ape ancora in vita riesca a degradare molto velocemente la quasi totalità dell'insetticida (se in concentrazioni

relativamente basse) e che il processo batterico che subentra *post mortem* ne degradi il quantitativo rimanente.

A questo punto il passo successivo è stato quello di andare ad approntare un nuovo esperimento con simili condizioni rispetto al precedente ma raddoppiando la concentrazione di insetticida iniziale e diminuendo il tempo di osservazione per riuscire così ad osservare l'andamento e la velocità di degradazione, cosa che nel precedente esperimento non si è potuta osservare. Di seguito viene esplicitata la suddivisione e le condizioni dell'esperimento condotto su un totale di trentaquattro api, somministrando a ciascuna ape circa 250 ng di Thiamethoxam con procedimento descritto nel Paragrafo 2.2.5.

Tabella 3.3.4 Suddivisione delle novanta api utilizzate per l'esperimento di drogaggio a 250 ng/ape di Thiamethoxam

Condizioni	Tempo						
	Bianco	0h	3h	6h	12h	24h	48h
90% umidità	5 api	5 api	4 api	5 api	5 api	5 api	5 api

Le api dopo essere state drogate hanno mostrato un intervallo di sopravvivenza di circa venticinque/trenta minuti. I risultati di tale esperimento sono riportati in Tabella 3.3.5 e in Figura 3.3.3

Tabella 3.3.5 Concentrazioni di Thiamethoxam rinvenuto nei campioni di api mantenute al 90% di umidità.

Periodo di mantenimento al 90% di umidità	Thiamethoxam nelle api (ng/ape)	Dev. St
3 ore	184	53
6 ore	143	31
12 ore	137	15
24 ore	112	27
48 ore	111	25

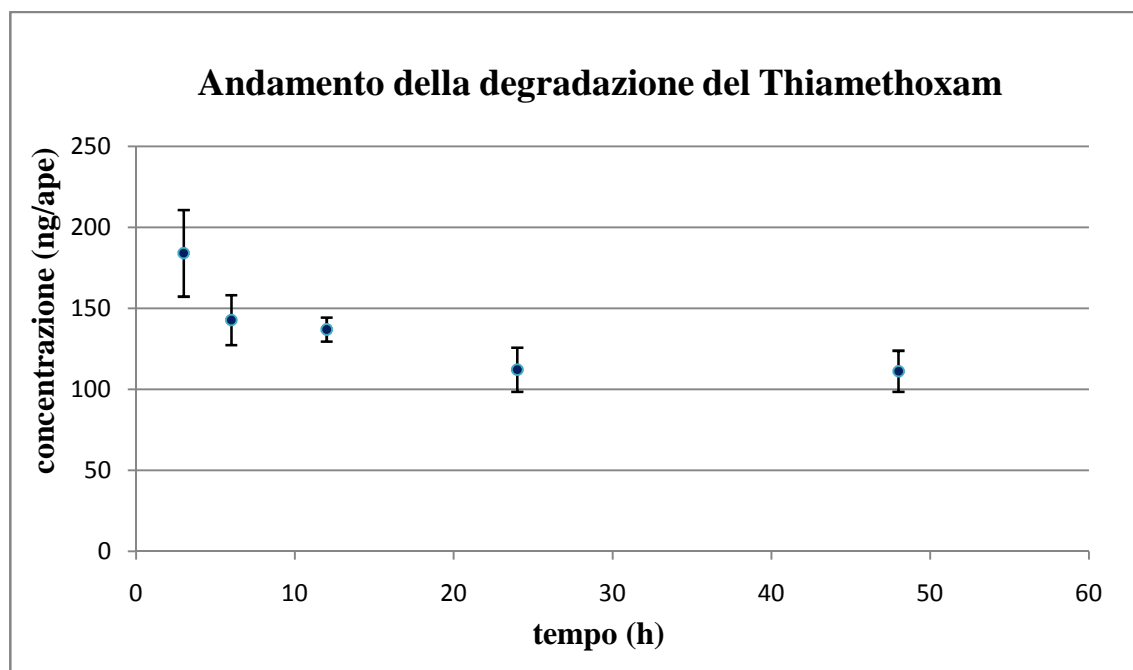


Figura 3.3.3 Andamento delle concentrazioni di Thiamethoxam presenti nelle api drogate con 250 ng/ape a diversi intervalli di tempo mantenute al 90% di umidità.

A conclusione di questi esperimenti, è stato possibile dunque ipotizzare che i principi attivi somministrati in concentrazioni di 500 e 250 ng/ape decretino una rapida morte e siano degradati principalmente mediante un processo che si manifesta *post mortem*. Ciò non è stato visto accadere invece nelle api drogate con 125 ng/ape di Thiamethoxam nelle quali il rilevante tempo di sopravvivenza dopo il drogaggio ha permesso all'organismo dell'ape ancora in vita l'attivazione di meccanismi degradativi molto più veloci ed efficaci.

Una volta osservato e compreso come la velocità di degradazione sia influenzata dalle diverse condizioni di umidità e dalle differenti quantità di principio attivo con cui l'ape entra in contatto, si è presa in considerazione un'ulteriore variabile ambientale. Durante i periodi di semina, infatti, un processo naturale che ha spesso luogo durante la notte è la formazione della rugiada. Tale fenomeno causa un alto livello di umidità che risulta un ostacolo alla determinazione di insetticidi in campioni di api morte ricadute sul terreno dopo l'esposizione al particolato; essa non contribuisce al processo degradativo ma le piccole gocce di rugiada presenti sul manto erboso possono disciogliere delle particelle di insetticida ancora adese al corpo dell'ape creando così problemi di sottostima della contaminazione nelle successive analisi.

Per indagare questo tipo di fenomeno è stato condotto un primo esperimento nel quale venticinque api sono state suddivise in sei gruppi a diversa numerosità. Tutte le api sono state drogate con 125 ng di Thiamethoxam e poste, una volta morte, all'interno di provette Eppendorf in cui si inseriva a mano una piccola quantità d'acqua tale da ottenere un velo d'umidità sull'ape. La temperatura adottata è stata sempre di 24°C. In Tabella 3.3.6 vengono schematicamente illustrati i tempi e i raggruppamenti delle api campionate.

Tabella 3.3.6 Suddivisione delle venticinque api utilizzate per l'esperimento di simulazione di rugiada impiegando un drogaggio pari a 125ng/ape di Thiamethoxam

Tempo	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
N° campioni	3 api	4 api	5 api	5 api	4 api	4 api

I dati ottenuti non hanno portato a rinvenire alcuna traccia di Thiamethoxam nell'ape, come d'altronde ci si aspettava dopo l'osservazione della non rintracciabilità di principio attivo dimostrata con il precedente esperimento. L'analisi dell'acqua ancora presente all'interno delle provette comunque ha però mostrato la presenza di una certa quantità significativa di insetticida. La quantità di principio attivo riscontrata nell'acqua aveva un andamento pressoché costante in funzione del tempo con delle dosi comprese tra i 30 e i 50 ng.

Con questo primo approccio si è potuto dimostrare che un piccolo velo d'acqua è in grado di solubilizzare le particelle di insetticida ancora presenti sulla superficie dell'ape. Per cercare conferme a tale ipotesi ed osservare se tale condizione atmosferica possa influire sulla velocità della degradazione, un'altra indagine è stata svolta con simili condizioni del test precedente, drogando in questo caso le api con una concentrazione di Thiamethoxam pari a 250 ng/ape. In Tabella 3.3.7 vengono schematizzate le condizioni e i raggruppamenti di campioni assunti.

Tabella 3.3.7 Suddivisione delle venticinque api utilizzate per l'esperimento impiegando un drogaggio pari a 250 ng/ape di Thiamethoxam

Condizioni	Tempo					
	Bianco	3h	6h	12h	24h	48h
90% umidità	5 api	4 api	5 api	5 api	5 api	5 api

I valori ottenuti analizzando i campioni hanno mostrato un andamento di degradazione simile a quelli osservati nell'esperimento condotto con uguale drogaggio e in assenza di simulazione di rugiada. I vari campioni d'acqua, come nell'esperimento effettuato drogando le api con 125 ng/ ape, mostrano una quantità pressoché costante nel tempo, spaziando in un intervallo di valori tra 10 e 70 ng. Per osservare se la presenza della piccola quantità d'acqua possa in qualche modo aver influito sulla cinetica di degradazione, sono stati messi a confronto i dati ottenuti, nelle medesime condizioni di umidità, di tempo di esposizione e quantità di drogaggio, per le api mantenute e non in simulazione di rugiada. Il confronto tra i dati viene di seguito esposto in Figura 3.3.4.

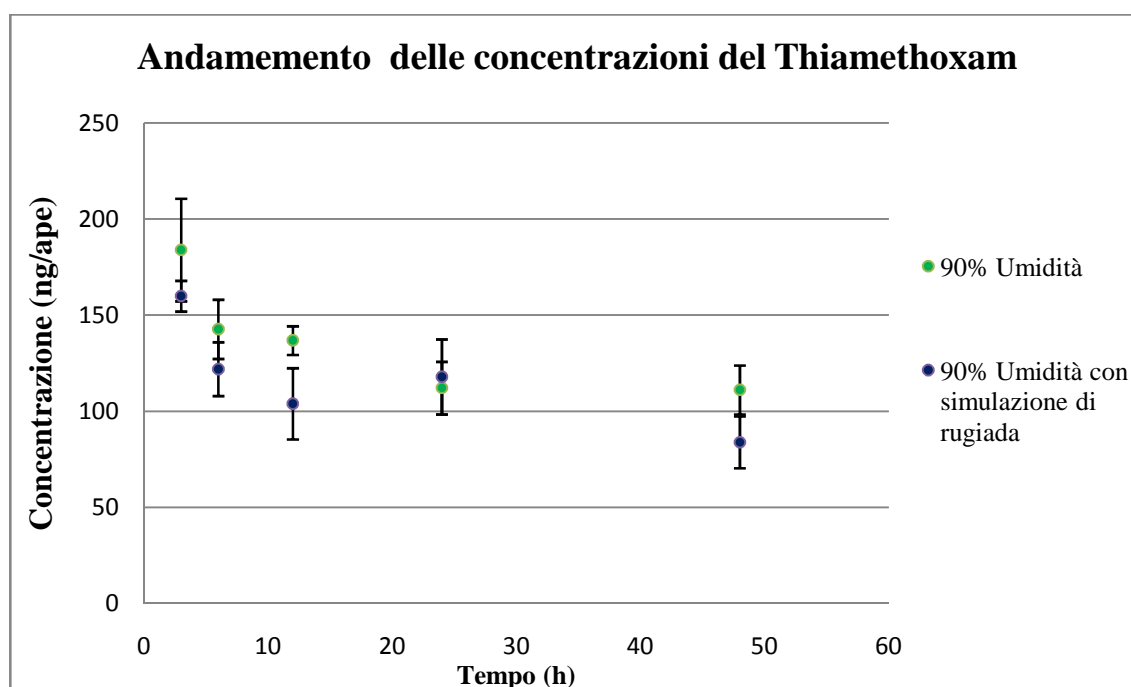


Figura 3.3.4 Andamento della degradazione di Thiamethoxam in condizioni di elevata umidità con e senza simulazione di rugiada.

Da qui si osserva che l'incertezza sulle misure è tale per cui i risultati analitici appaiono statisticamente indistinguibili.

L'esperimento va dunque ad avvalorare i risultati ottenuti precedentemente dimostrando come la rugiada sia in grado di disciogliere una quantità significativa di pesticida ancora presente sull'ape ma non influisce invece sulla degradazione. Tale fenomeno può quindi aver contribuito alla difficoltà di rintracciare la presenza di

insetticida nei campioni di api prelevati nei pressi dell'arnia dopo alcuni giorni dalla loro morte.

Si può dunque concludere che l'andamento della degradazione osservato nelle varie prove va a confermare che la velocità con la quale l'insetticida, nello specifico il Thiamethoxam, viene degradato sia influenzata direttamente dalla quantità di principio attivo con la quale l'ape viene contaminata. L'unico fattore al momento osservato che può accelerare la degradazione è la presenza di elevata umidità; tale fattore sembra favorire quella parte di metabolismo che entra in azione *post mortem*.

3.3.2 Analisi della formazione di metaboliti dai principi attivi neonicotinoidi

Dopo aver osservato la degradazione del Thiamethoxam, si è cercato di indagare se alla sua scomparsa potesse corrispondere una conseguente formazione del suo principale metabolita, il Clothianidin. Questo studio, ancora in fase di indagine, è stato affrontato per scoprire se sia possibile ricercare i metaboliti nei campioni d'ape morti a seguito di una semina ma in cui nessuna traccia di principio attivo sia stata rintracciata.

Una prima indagine semiquantitativa si è condotta per verificare l'effettiva capacità di quantificare il metabolita in un singolo campione d'ape. Sono state quindi campionate cinquanta api vive suddivise in gruppi da cinque. Quarantacinque sono state drogate come descritto nel Paragrafo 2.2.5 somministrando una quantità elevata di Thiamethoxam variabile in un intervallo compreso tra 600 e 1000 ng, le rimanenti cinque api sono servite a costituire il gruppo "bianco api". I vari gruppi sono stati lasciati per 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore, in un box a temperatura (23 °C) e umidità (70 %) controllate e costanti.

Per stimare qualitativamente l'entità del processo, si è assunto che: (i) la degradazione del Thiamethoxam nelle condizioni sperimentali adottate abbia prodotto esclusivamente Clothianidin, (ii) che la conversione a Clothianidin abbia stechiometria 1 a 1 e (iii) che per ogni ape la quantità di principio somministrato sia uguale alla somma delle concentrazioni molari dei due principi attivi (bilancio di massa).

In tal modo, è stato possibile determinare le percentuali di degradazione del Thiamethoxam per singola ape e, conseguentemente, quelle di formazione del Clothianidin. I dati vengono presentati in Tabella 3.3.8 e Figura 3.3.5

Tabella 3.3.8 Recupero percentuali di Thiamethoxam e Clothianidin in api mantenute in condizioni di bassa (30 %) ed alta (90%) umidità, dopo la somministrazione di dosi elevate di Thiamethoxam

Tempo (h)	Recupero medio Thiamethoxam (%)		Conversione media a Clothianidin (%)	
	Bassa umidità (30 %)	Alta umidità (90%)	Bassa umidità (30 %)	Alta umidità (90%)
	0	98.3	99.4	1.7
1	96.1	97.8	3.9	2.2
2	95.3	98.4	4.7	1.6
4	93.3	90.2	6.7	6.6
8	96.5	94.5	3.5	5.5
16	93.6	94.0	6.4	6.0
24	93.8	89.9	6.2	10.1
48	87.6	80.7	12.4	19.3
72	87.9	79.4	15.2	20.6

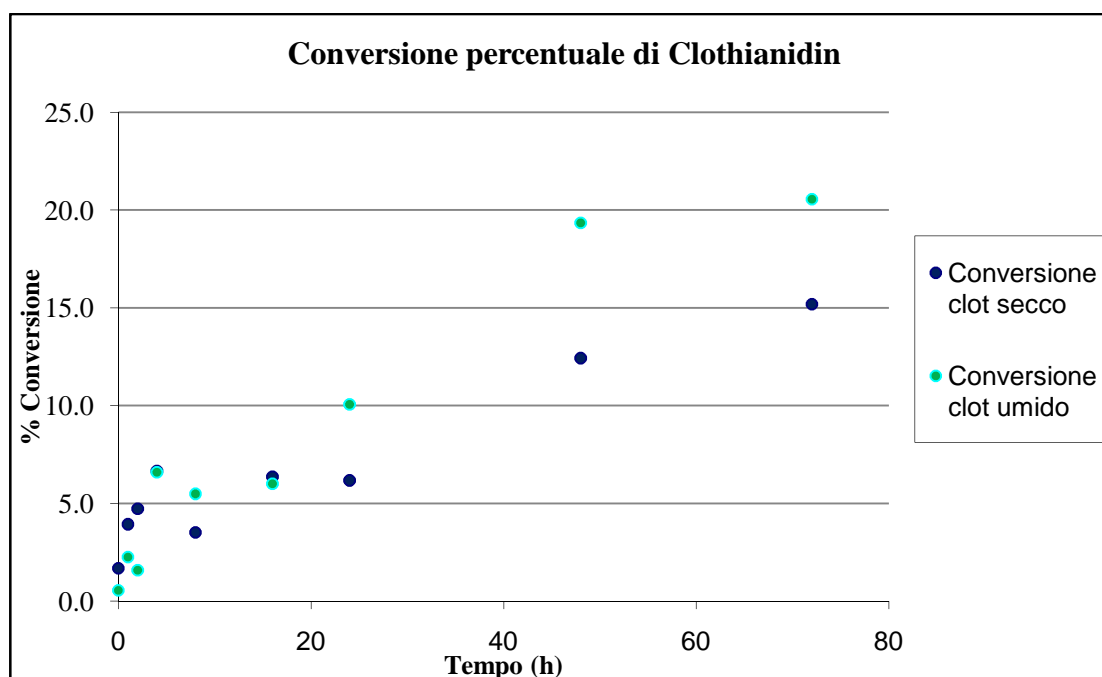


Figura 3.3.5 Recupero di Clothianidin in funzione del tempo in api morte mantenute a 30 e 90 % di umidità dopo la somministrazione di concentrazioni elevate di Thiamethoxam

Dai recuperi percentuali è quindi possibile osservare, anche su singola ape, una significativa formazione di Clothianidin. Si può anche notare come all'aumentare della degradazione di Thiamethoxam vi sia un conseguente aumento della percentuale di Clothianidin che si va a formare nel tempo. Inoltre, se tale frazione di formazione viene confrontata nelle due condizioni di umidità, si può notare un aumento dei valori ad alta umidità di circa il 5% dopo 24 ore rispetto a quelli mantenuti a bassa umidità. Questo sembrerebbe in accordo con l'andamento della degradazione di Thiamethoxam che risulta maggiormente degradato nei campioni mantenuti ad elevate umidità.

Appurata la possibilità di quantificare il metabolita, si è quindi passati a condurre un esperimento di tipo quantitativo. In tale test sono state analizzate quarantadue api suddivise in gruppi da tre. Tali api sono state drogate ciascuna con 500 ng di Thiamethoxam come descritto nel Paragrafo 2.2.5 mentre un gruppo di tre api ha costituito il gruppo di riferimento.

I vari gruppi sono stati ulteriormente suddivisi in due e lasciati per 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 48 ore, in due box a temperatura di 24 °C a due differenti gradi di umidità: 96% nel primo e 60% nell'altro. I risultati ottenuti sono esposti in Tabella 3.3.9, Figura 3.3.6 e Figura 3.3.7

Tabella 3.3.9 Variazione di concentrazione di Thiamethoxam e Clothianidin nel tempo in api mantenute in condizioni di bassa (60 %) ed alta (96%) umidità

Tempo (h)	Concentrazione di Thiamethoxam (ng/ape)				Concentrazione di Clothianidin (ng/ape)			
	60% Umidità		96% Umidità		60% Umidità		96% Umidità	
	Media	Dev.St.	Media	Dev.St.	Media	Dev.St.	Media	Dev.St.
Bianco	0		0		0		0	
0	561	31	514	44	10	9	0	0
2	410	63	408	30	13	5	10	10
4	443	52	390	30	11	2	14	2
8	448	43	384	11	21	6	22	7
16	384	60	250	109	32	9	19	6
24	389	13	256	90	37	11	29	5
48	331	7	246	73	30	6	23	2

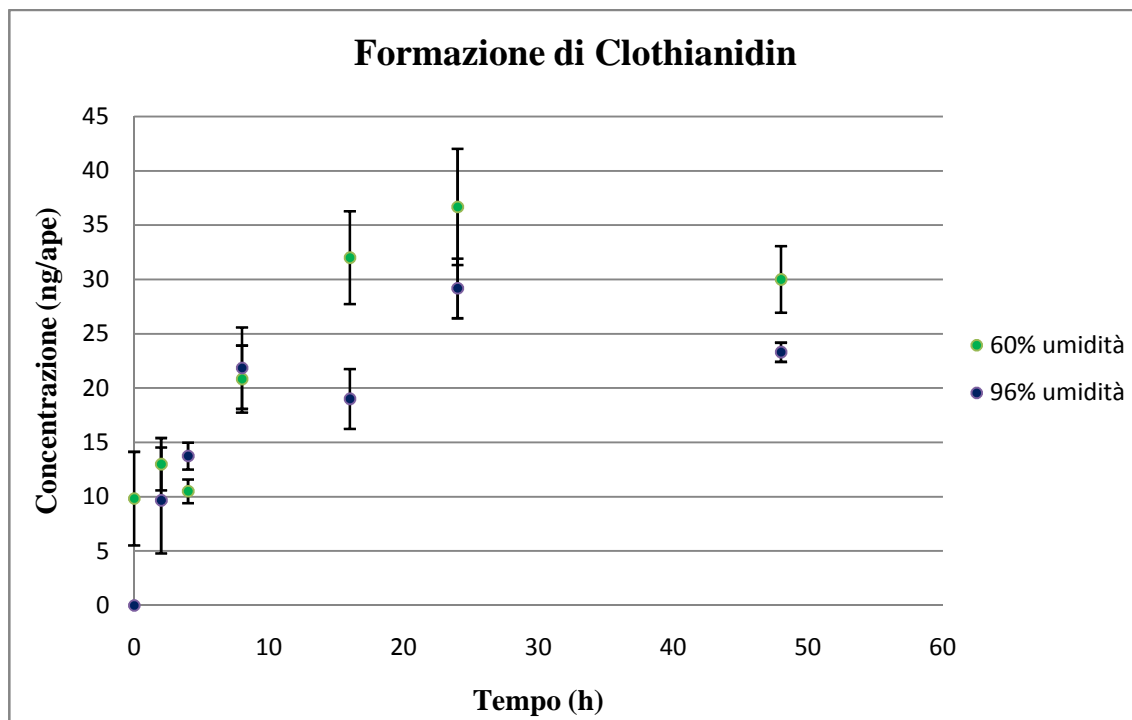


Figura 3.3.6 Conversione di Clothianidin in funzione del tempo in api morte mantenute a 60% e 96 % di umidità

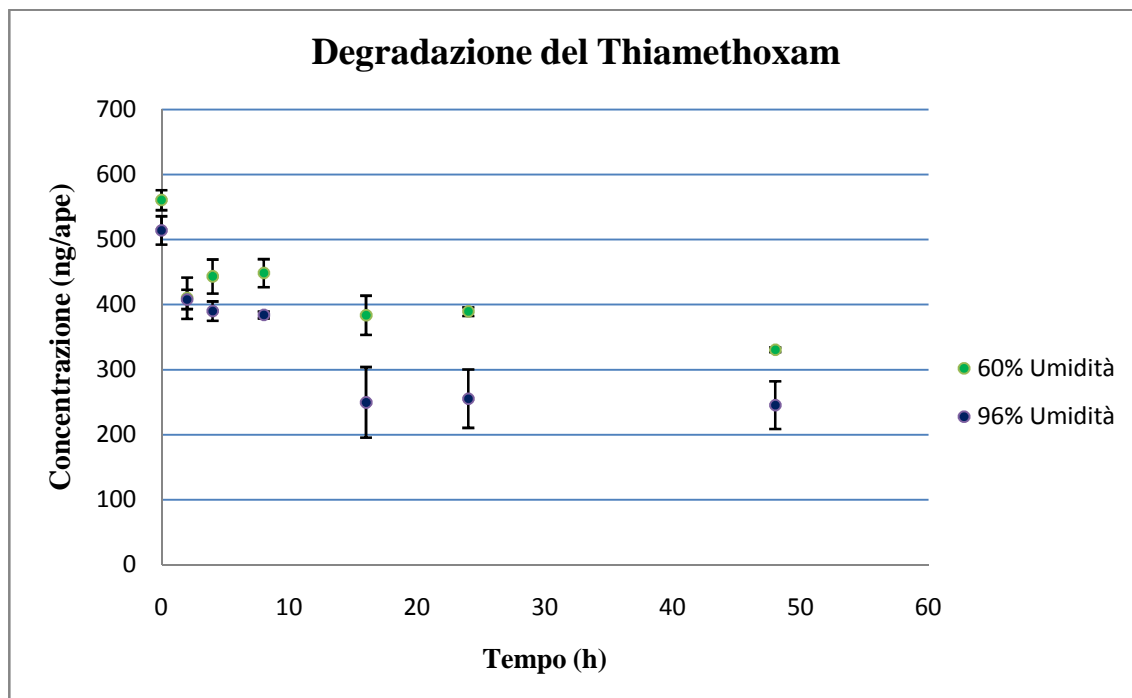


Figura 3.3.7 Degradazione del Thiamethoxam in funzione del tempo in api morte mantenute a 60% e 96 % di umidità

Dall'analisi dei dati è risultato che le concentrazioni di Clothianidin formatosi nelle condizioni di alta umidità nei diversi tempi (tranne in due casi) sono risultate inferiori a quelle riscontrate nelle condizioni di bassa umidità. Questo risultato è in netto contrasto con quanto osservato nel precedente esperimento e ciò, al momento, rende vana qualsiasi possibile ipotesi. L'unica soluzione sarà quindi quella di condurre altri esperimenti nelle due diverse condizioni di umidità.

Si nota inoltre come in questo esperimento, in entrambe le condizioni di umidità, dopo 24 ore la quantità di Clothianidin tenda leggermente a diminuire. Tale fenomeno potrebbe far ipotizzare che anche il metabolita degradi ulteriormente in altri composti non potendolo così indagare in campioni di api morte da diversi giorni. Anche in questo caso, per meglio verificare tale andamento saranno in futuro necessari ulteriori studi.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi si è voluto indagare dal punto di vista quantitativo una delle vie di rilascio ambientale degli insetticidi neonicotinoidi, ovvero l'emissione di particolato dalle seminatrici durante la semina di mais conciato con tali insetticidi. Questo fenomeno di fatto è uno dei principali responsabili del fenomeno dello spopolamento degli alveari, evento conosciuto come Colony Collapse Disorder.

Le api infatti volando sopra il campo di semina e avvicinandosi alla nube emessa dalla seminatrice intercettano le particelle sospese in atmosfera contaminandosi direttamente con una dose elevata di insetticida nettamente superiore alla DL_{50} . Il conseguente effetto letale evidenziato in tutti gli esperimenti condotti sul campo di semina, può quindi essere ben commisurato con i fenomeni di perdita della colonia ampiamente segnalati in primavera e spesso associati alla semina di mais. Anche se non in tutti i campioni di api raccolti dopo diversi giorni dalla semina venivano riscontrate tracce di neonicotinoidi, una spiegazione si è vista essere imputabile a meccanismi fisiologici degradativi post mortem enfatizzati nelle condizioni di alta umidità e in presenza di rugiada. I risultati analitici relativi ai fattori emissivi, alla concentrazione di insetticida in aria nei pressi della seminatrice a 5 e 10 metri e la conseguente contaminazione delle api, rivelano che tutti i tipi di confettatura dei semi testati (anche quelli più recentemente proposti) non impediscono la dispersione di grandi quantità di polveri contenenti l'insetticida e l'esposizione letale per le api in volo. Tuttavia quelli delle annate più recenti sono in grado di produrre una maggiore quantità di particelle di grandi dimensioni che più velocemente si depositano al suolo. Inoltre, le modifiche alla ventola di scarico delle seminatrici finora adottate sembrano avere un effetto limitato sia sui fattori emissivi che sulla contaminazione delle api esposte.

A questo proposito, per riuscire ad ottenere immediati esiti nella riduzione dell'emissione in atmosfera di particolato contenente insetticidi neonicotinoidi si dovrebbero approntare degli studi indirizzati alla realizzazione di dispositivi adatti ad una riduzione efficiente delle particelle incriminate all'interno del meccanismo di distribuzione del seme. Tali studi dovrebbero comunque essere supportati da dati quantitativi relativi sia alle emissioni di particolato sia agli effetti biologici sulle api.

5 BIBLIOGRAFIA

- [1] Lucci S, Sannino R, Visicchio F, Campanelli F, Crosti R . *Introduzione*. In Atti del Workshop “Sindrome dello spopolamento degli alveari”. Ed. V. Bellucci, 7. Roma 2008.
- [2] VanEngelsdorp D, Hayes J, Jr., Underwood RM, Pettis J. *A Survey of Honey Bee Colony Losses in the US, Fall 2007 to Spring 2008*. Plos One 2008; 3: e4071
- [3] Benvenuti M, Frascchetti L, Gubiani M, Masci A. *Schema di riferimento per le iniziative nel settore apistico*. Rete Rurale Nazionale 2009; 1-78
- [4] Johnson R. *Honey Bee Colony collapse disorder*. Congressional Research Service. January 2010
- [5] Kaplan K. *Colon collapse disorder - A complex buzz (Reprinted from Agricultural Research, May/June, 2008)*. American Bee Journal 2008; 148: 617-618
- [6] Schmuck R, Schöning R, Stork A, Schramel O. *Risk posed to honeybees (Apis mellifera L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers* Pest Management Science 2001; 57: 225-238
- [7] Belletti P.A. *Priorità d'intervento nello studio e nel controllo della sindrome dello spopolamento degli alveari*. Università degli studi di Udine - Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante. Notiziario ERSA 2/2008
- [8] Bignami L. *Scacco alla Regina*. National Geographic. Giugno 2008
- [9] Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. *Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, Apis mellifera*. Crop Protection 2004; 23: 371-378

- [10] Andreotti L, *Api e neonicotinoidi, destini incrociati* intervista a Marco Lodesani, coordinatore APENET. L'informatore agrario 2010; 40
- [11] www.mieliditalia.it, Panella F. *Hanno fatto un deserto e lo hanno chiamato...agricoltura!*. Dossier U.N.A.API 2007; 1-15
- [12] European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Directorate E1 - Plant Health. *Review report for the active substance acetamiprid*. SANCO/1932/2001, 2004, 1-33
- [13] www.dayoochem.com, Dayoo Chemical Industrial
- [14] Tomizawa M, Casida J.E. *Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors*. Annual Review of Entomology 2003; 48: 339-364
- [15] Decourtye A, Devillers J, *Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees, insect nicotinic acetylcholine receptors* 2010; chapter 8
- [16] Desneux N, Decourtye A, Delpuech J. *The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods*. Annual Review of Entomology 2007; 52: 81-106
- [17] Aliouane Y, Hassani A.K, Gary V, Armengaud C, Lambin M, *Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticide: effects on behavior*. Environ. Toxicol. Chem. 2009; 28: 113-122
- [18] <http://www.cra-api.it/online/index.php>. Relazione sull'attività svolta e sui primi risultati ottenuti nell'ambito del progetto Apenet per la tematica "Effetti del mais conciato sulle api" 2009.

- [19] Zanella A. *Contaminazione ambientale di api da insetticidi neonicotinoidi. Approntamento di una metodologia analitica per la sua valutazione su singolo insetto.* Tesi di Laurea Specialistica; Padova (Italia) 2010
- [20] <http://www.reterurale.it/api>, Scheda APENET: *Monitoraggio e ricerca in apicoltura.* APENET. Servizio della Rete Rurale Nazionale 2009
- [21] Curtis LC. *THE EXUDATION OF GLUTAMINE FROM LAWN GRASS.* Plant Physiology 1944; 19 (1): 1-5
- [22] Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, *Traslocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees.* Entomological Society of America 2009; 1808-1815
- [23] Tapparo A, Giorio C, Marzaro M, Marton D, Girolami V, *Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds.* Journal of environmental monitoring 2011; 13,1564-1568
- [24] <http://www.apat.gov.it/>, Greatti M. *Gli insetticidi impiegati nella concia del seme di mais: effetti sulle api e dispersione nell'ambiente*
- [25] <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>, The PPDB Pesticide Properties Database
- [26] <http://www.buglife.org.uk/>, Kindemba V. *The impact of neonicotinoid insecticide on bumblebees, Honey bees and other non-target invertebrates.* 2009; 1-52
- [27] Greatti M, Barbattini R, De Colle M, Sabatini AG, Rancan M, Rossi S. *EFFETTI DI ALCUNI INSETTICIDI UTILIZZATI NELLA CONCIA DEL SEME DI MAIS NEI CONFRONTI DI METCALFA PRUINOSA.* ATTI Giornate Fitopatologiche 2008; 1: 233-239

[28] Yen PY. *Environmental fate of imidacloprid*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 1997; 213: 95-AGRO

[29] Catella G, Ghiringhelli R, Pandolfi F, Fabbro I. *Determinazione di IMIDACLOPRID e suoi metaboliti in acque superficiali e profonde mediante HPLC/MS/MS*. APAT - Workshop "Piano di controllo degli effetti ambientali dei prodotti fitosanitari" Roma 2006

[30] Fossen M, PH.D.; *Environmental Fate of Imidacloprid; Environmental Monitoring, California*. 2006

[31] <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>, The PPDB Pesticide Properties Database

[32] Kadar A, Faucon J.P, *Determination of Trace of Fipronil and Its Metabolites in Pollen by liquid Chromatography with Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Agric.Food Chem. 2006; 54: 9741-9746

[33] Hainzl D, Cole M.L, Casida J.E, *Mechanisms for Selective toxicity of Fipronil Insecticide ad its Sulfone metabolite and Desulfanyl Photoproduct*. Chem. Res. Toxicol. 1998; 11: 1529-1535

[34] Ford K.A, Casida J.E, *Unique nd Common Metabolites of Thiamethoxam, Clothianidin, and Dinotefuran in Mice*. Chem. Res. Toxicol. 2006;19: 1549-1556

[35] Naune R., Ebbinghaus-Kintscher U., Saldago V.L, Kausmann M., *Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants*. Pesticide Biochemistry and Physiology.2003;76: 55-69

[36] Suchail S, Guez D, Belzunces L.P, INRA, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UMR INRA-UAPV Ecologie des Invertébrés, Site Agroparc

Avignon, France. *Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in apis mellifera*. Environmental Toxicology and Chemistry. USA 2001; 20: 11, 2482-2486.

[37] Suchail S, Debrauwer L, Belzunces L.P, *Metabolism of Imidacloprid in Apis mellifera*. Pest Management Science. 2003; 60: 291-296

[38] Schnier HF, Weing G, Laubert F, Simon V, Schmuck R. *Honey bee safety of imidacloprid corn seed treatment*. Bulletin of Insectology 2003; 56 (1): 73-75

[39] Greatti M, Barbattini R, Stravisi A, Sabatini AG, Rossi S. *Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho dressed seeds*. Bulletin of Insectology 2006; 59: 99-103

[40] Biocca, M.; Conte, E.; Pulcini, P.; Marinelli, E.; Pochi, D. *Sowing simulation tests of a pneumatic drill equipped with systems aimed at reducing the emission of abrasion dust from maize dressed seed*. J. Environ. Sci. Health (Part B) 2011, 46, 438-448.

[41] Tapparo A; Marton D; GiorioC; Zanella A; Soldà L; MarzaroM; Vivan L; Girolami V. *Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds* Environmental Science & Technology: Submitted for publication

6 RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento va al Prof. Tapparo per avermi seguita e aiutata nei lunghi mesi trascorsi in un progetto così interessante e per aver condiviso il famoso Amarone, un grande grazie anche al Prof. Marton che con i suoi consigli e la sua simpatia mi hanno aiutata e rallegrata. Inoltre un grazie doveroso va anche al Prof. Trevisan per la sua curiosità e disponibilità dimostratami nelle chiacchierate professionali.

Grazie a Lidia per avermi aiutata nei momenti di maggior bisogno nel lavoro e per aver organizzato dei gran buoni pranzi nel fantastico sesto piano.

Grazie al prof. Vincenzo Girolami, a Matteo, a Linda per la disponibilità e la collaborazione con cui sono stati eseguiti gli esperimenti.

Grazie a Chiara ed Alessandro che mi hanno supportata nei primi mesi dove più avevo bisogno di conoscere GinoArtù (l'UFLC).

Grazie ai miei genitori per avermi aiutata moralmente ed economicamente nella costruzione del mio futuro e per aver sopportato le mie innumerevoli agitazioni e ansie.

Grazie a mia sorella per darmi sempre e comunque un grande ed incondizionato affetto e anche perché si sarebbe lamentata se non l'avessi citata.

Grazie a mia cugina Cristina, ormai sorella acquisita, per l'aiuto e per le lunghe chiacchierate nelle nostre magnifiche colazioni e cene che mi hanno sempre distolta dai miei doveri di brava studentessa.

Grazie a mia nonna Adelia che in prima fila ha sempre e comunque fatto il tifo per me.

Grazie agli amici di sempre, ormai la mia seconda famiglia, per aver passato con loro tanti gran bei momenti e già adesso li perdono per tutto ciò che mi faranno passare una volta laureata.

Grazie ai nuovi amici, conosciuti più o meno di recente, per avermi fatto scoprire quanto sia bello stare in loro compagnia.

Grazie ai miei amici e colleghi chimici per aver condiviso parte del mio percorso all'interno dell'interchimico ma soprattutto ad Elena, Gloria e Chiara con le quali ho condiviso anche delle magnifiche vacanze che mai potrò dimenticare.

Grazie al mio biscotto pan di zenzero per essere semplicemente entrato nella mia vita e per avermi accompagnata nell'odissea della stesura della tesi, fortunatamente senza farmi ingrassare troppo.

Grazie al solito caffè del mattino al “baretto dei chimici” e all'angolo caffè del sesto piano (da me istituito) perché senza caffeina non si può campare.

Grazie infine anche a me stessa per essere riuscita a conquistare, con i miei tempi e modi, uno dei traguardi più importanti della vita.