

EFFETTI SULLE API DI NEONICOTINOIDI E FIPRONIL SOMMINISTRATI A DIVERSA CONCENTRAZIONE

B. MACCAGNANI¹, L. BORTOLOTTI², A. MATTAROZZI², S. DEGANI²,
F. CENERELLI², C. PORRINI³

¹ Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli”, Via Argini Nord 3351, Crevalcore (BO)

² CRA-API, Unità di ricerca di Apicoltura e Bachicoltura, Via di Corticella, 80, Bologna

³ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna,
Viale G. Fanin, 42, Bologna
bmaccagnani@caa.it

RIASSUNTO

Sono state condotte sperimentazioni per verificare la mortalità di *Apis mellifera* L. indotta da dosi di agrofarmaci usati nella concia delle sementi. Sono stati saggiati imidacloprid (0,2 ng/ape, pari a 1/25 della DL50 a 48h) clothianidin, thiamethoxam e fipronil (rispettivamente 0,92-0,2-1,2 ng/ape, pari a 1/5 della DL50 a 48h). La somministrazione è avvenuta secondo i protocolli EPPO diluendo la dose di principio attivo per 10 api in 200 microlitri di soluzione zuccherina). Per imidacloprid e clothianidin è stata condotta una ulteriore sperimentazione somministrando la stessa dose di p.a. in concentrazione maggiore, ovvero diluendo la dose per ape rispettivamente in 3 e 5 microlitri di soluzione zuccherina, somministrati singolarmente. I controlli sono stati effettuati a 1, 3, 24, 48 ore. Le prove sono state ripetute con tre alveari e hanno mostrato percentuali di mortalità nella prima prova superiori a quelli trovati in letteratura, ed una maggiore mortalità in caso di somministrazione della stessa dose di p.a. per ape a concentrazione maggiore.

Parole chiave: *Apis mellifera*, neonicotinoidi, fipronil, dosi sub-letali, mortalità, concentrazione

SUMMARY

EFFECTS ON *APIS MELLIFERA* OF NEONICOTINOIDS AND FIPRONIL INGESTED AT DIFFERENT CONCENTRATIONS

Trials were run to assess the mortality induced to *Apis mellifera* L. by the intake of the neonicotinoids imidacloprid (dose 0.2 ng/individual, equal to 1/25 of the LD₅₀ after 48 h), clothianidin, thiamethoxam, and of fipronil (respectively 0.92-0.2-1.2 ng/ape, equal to 1/5 LD₅₀ a 48h), administrated to honey bees according to the EPPO guidelines: the dose calculated for 10 individuals was diluted into 200 microlitres of sugar solution (20 microlitres per honey bee) and offered to a group of 10 honey bees together. For imidacloprid and clothianidin a further trial was run offering the same dose diluted in, respectively, 3 and 5 microlitres of sugar solution and directly offered to isolated honey bees, that were afterwards put together. In both trials the mortality was registered after 1, 3, 24 and 48 hours. The results showed a high level of mortality, higher than expected and to literature data. Moreover, for imidacloprid and clothianidin a much higher mortality was registered for the individuals that ingested the active ingredient at the highest concentration.

Keywords: *Apis mellifera*, neonicotinoids, fipronil, sub-lethal doses, mortality, concentration

INTRODUZIONE

La classificazione degli insetticidi utilizzati in agricoltura, attraverso i test classici basati sul calcolo della DL50, si ritiene non sia sufficiente ad assicurare l'immissione nell'ambiente di prodotti assolutamente sicuri per le api (*Apis mellifera* L.) e gli altri insetti utili (Pham-

Delègue *et al.*, 2002). È necessario quindi lo studio di metodologie in grado di valutare aspetti meno evidenti ma egualmente importanti, tra i quali le alterazioni nel comportamento, che possono influire negativamente sullo sviluppo delle famiglie (Decourtye *et al.*, 2004) e possono essere usati per stimare meglio il reale impatto dei prodotti fitosanitari verso le api. Attualmente le conoscenze acquisite sul PER (*Proboscis Extension Reflex*) consentono di mettere a punto saggi di laboratorio per verificare l'impatto degli agrofarmaci su alcuni processi cognitivi, come l'apprendimento e la memorizzazione di diversi tipi di stimoli ambientali (Gerber *et al.*, 1998). L'alterazione delle capacità di apprendimento associativo degli odori indotto da neonicotinoidi (Lambin *et al.*, 2001) può essere assunto come indice di perturbazione delle capacità cognitive, in grado di alterare pesantemente la capacità delle api di svolgere le loro funzioni di bottinatrici e produrre un pericoloso disorientamento. Esperienze condotte dagli autori nel corso del 2007 hanno dimostrato che acetamiprid, classificato come leggermente tossico, se somministrato ad api ad 1/50 della dose di campo, altera il PER, dimostrando perturbazioni della capacità di memorizzazione/riconoscimento degli odori (Maccagnani *et al.*, 2008) in accordo con i risultati trovati da El Hassani *et al.* (2008). Questo lavoro descrive i risultati di prove di laboratorio tese a verificare l'impatto sulla sopravvivenza fino a 48 ore di dosi considerate subletali di imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin e di fipronil. Tali dosi corrispondono a quelle utilizzate per studiare gli effetti sub letali sulle capacità di apprendimento e memoria, condotte secondo un rigoroso protocollo PER *Proboscis Extension Reflex*, sviluppato dal Centro Agricoltura Ambiente "G. Nicoli" di Crevalcore (BO) (Maccagnani *et al.*, in prep.).

MATERIALI E METODI

Le sperimentazioni sono state condotte per determinare la mortalità su *A. mellifera* indotta dalla somministrazione di dosi di imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam e fipronil (vedi tabella 1), corrispondenti a 1/25 della DL₅₀ a 48 ore per imidacloprid, e a 1/5 della DL₅₀ a 48 ore per gli altri principi attivi.

Tabella 1. Principi attivi, dosi saggate e DL₅₀ a 48 ore

Principio attivo	Dose saggiata	DL ₅₀ 48 ore
Clothianidin	0,92 ng/ape	4,7 ng/ape
Imidacloprid	0,2 ng/ape	5,0 ng/ape
Thiamethoxam	0,2 ng/ape	1,0 ng/ape
Fipronil	1,2 ng/ape	6,0 ng/ape

I principi attivi sono stati somministrati a gruppi di 10 api contemporaneamente, fornendo il p.a. in 20 microlitri per ape, secondo il protocollo indicato dalle linee guida EPPO (2001). La percentuale di mortalità è stata valutata a 1, 3, 24 e 48 ore.

Per imidacloprid e clothianidin, è stata anche valutata la mortalità in seguito alla somministrazione della stessa dose di principio attivo per individuo (indicata in tabella 1) a concentrazione maggiore, ottenuta diluendo la dose di agrofarmaco in una minore quantità di soluzione zuccherina (rispettivamente, in 3 microlitri per imidacloprid, 5 per clothianidin). Il metodo prevedeva la cattura di singole api, la somministrazione del p.a. e la collocazione

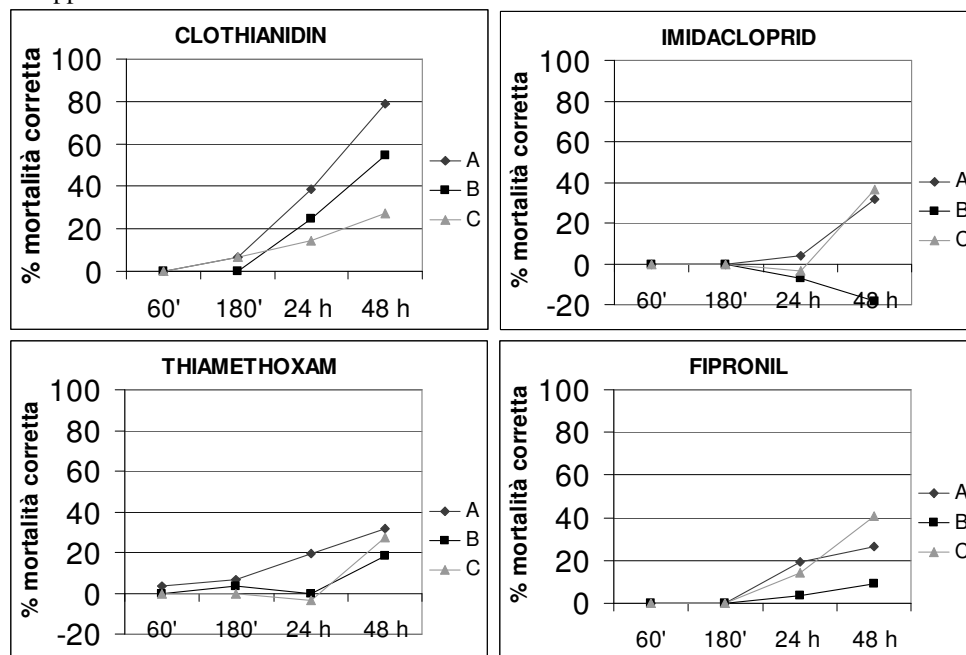
successiva in gabbiette, in gruppi di 10 api. Per tutte le sperimentazioni sono stati utilizzati 3 alveari, e le prove sono state ripetute 3 volte.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi dei dati delle prove condotte secondo il protocollo EPPO (2001) ha evidenziato un livello tossicità superiore rispetto a quello indicato dai dati bibliografici, poiché ad una dose pari ad 1/5 della DL_{50} a 48h, clothianidin ha provocato la morte all'incirca del 50% degli individui, thiamethoxam e fipronil di circa il 30%, mentre imidacloprid, somministrato ad 1/25 della DL_{50} a 48h ha determinato una mortalità di quasi il 40% per due alveari su 3 (figura 1).

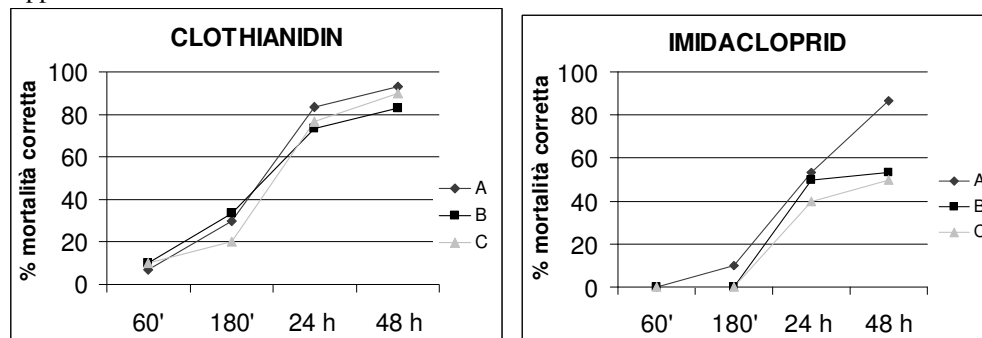
Per quanto riguarda imidacloprid e clothianidin, la somministrazione della stessa dose di principio attivo a concentrazione maggiore (rispettivamente 0,2 ng/ape in 3 microlitri per imidacloprid e 0,92 ng/ape diluiti in 5 microlitri per clothianidin) ha determinato una mortalità significativamente superiore a quella indotta dalla stessa dose assunta dalle api a maggiore diluizione (in 20 microlitri) (figura 2). Infatti, per clothianidin già a 24 ore le api di tutti e tre gli alveari hanno fatto registrare una mortalità superiore al 80%, mentre per imidacloprid, nonostante l'andamento dei tre alveari sia apparso meno omogeneo, a 24 h la mortalità si aggirava intorno al 60%, e per un alveare ha raggiunto l'80% a 48 ore.

Figura 1. Mortalità indotta dalla somministrazione di diversi principi attivi in 20 microlitri/ape a 10 api contemporaneamente (200 microlitri di soluzione zuccherina). I dati sono stati corretti in rapporto alla mortalità del testimone con la formula di Schneider-Orelli



Per quanto riguarda il confronto fra le due concentrazioni saggiate di clothianidin e imidacloprid, dobbiamo sottolineare che si tratta di prove non conclusive poiché la modalità di somministrazione non è identica nelle due prove. Infatti la concentrazione minore è stata offerta alle api singolarmente, mentre quella maggiore ad api in gruppo e, pur essendo un assunto delle linee guida EPPO il fatto che per trofallassi il principio attivo venga distribuito

Figura 2. Mortalità indotta dalla somministrazione di diversi principi attivi in 3 (imidacloprid) o 5 (clothianidin) microlitri/ape, forniti ad ogni ape singolarmente. I dati sono stati corretti in rapporto alla mortalità del testimone con la formula di Schneider-Orelli



tra tutti gli individui del gruppo, sarebbe opportuno operare un confronto somministrandolo singolarmente. Tuttavia le indicazioni emerse sembrano poter offrire una interpretazione alla variabilità delle situazioni di campo, dove è possibile che le api vengano esposte agli agrofarmaci saggiati in condizioni ambientali e nutrizionali diverse, in grado di determinare la loro assunzione nel nettare, nell'acqua o nella rugiada in varie concentrazioni con differenti conseguenze.

LAVORI CITATI

- Decourtye A., Armengaud C., Renou M., Devillers J., Cluzeau S., Gauthier M., Pham-Delègue M.H., 2004. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pest. Biochem. Physiol.*, 78, 83-92.
- El Hassani A.K., Dacher M., Gary V., Lambin M., Gauthier M., Armengaud C., 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, DOI 10.1007/s00244-007-9071-8.
- EPPO/OEPP, 2001. European and Mediterranean plant protection organization - Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products. Side-Effects on honeybees. PP 1/170 (3). *EPPO Bulletin*, 31, 323-330.
- Gerber B., Wustenberg D., Schutz A., Menzel R., 1998. Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: nonmonotonous effects of the training trial interval. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 69, 71-78.
- Lambin M., Armengaud C., Raymond S., Gauthier M., 2001. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 4, 129-134.
- Maccagnani B., Ferrari R., Zucchi L., Bariselli M., 2008. Difendersi dalle cavellette, ma tutelare le api. *Informatore Agrario*, 25, 2-5.
- Pham-Delègue M.H., Decourtye A., Kaiser L., Devillers J., 2002. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, 33, 425-432.