

METODOLOGIA IMPIEGATA NEI PROGRAMMI DI MONITORAGGIO DEI PESTICIDI CON API

Claudio Porrini

Istituto di Entomologia "Guido Grandi", Università degli Studi di Bologna,
Via Filippo Re, 6 40127 Bologna (e-mail: cporrini@entom.agrsci.unibo.it)

Riassunto

Le caratteristiche etologiche dell'ape e il suo stretto rapporto con l'ambiente, fanno di questo insetto un interessante indicatore biologico dei pesticidi. Le stazioni di monitoraggio sono formate da due alveari muniti di gabbia di raccolta per le api morte. I controlli settimanali e le analisi di laboratorio, consentono di ottenere dei dati continuamente aggiornati sulla presenza dei pesticidi nell'ambiente.

Abstract

The ethological characteristics of the honeybee and its close relationship with the environment make it an interesting bioindicator of pesticides. The monitoring stations consist of two hives, each of them provided with a collection cage for dead bees. Weekly controls and laboratory analysis allow us to achieve and update constantly the data concerning the presence of pesticides in the environment.

Parole chiave: bioindicatori, pesticidi, *Apis mellifera*

Key words: bioindicators, pesticides, *Apis mellifera*

1. Introduzione

Le prerogative che fanno dell'ape un ottimo biorivelatore sono diverse: innanzitutto è un insetto quasi ubiquitario e di facile allevamento; ogni alveare, disponendo di migliaia di bottinatrici, che si rinnovano ciclicamente e in continuo, mette a disposizione un alto numero di indicatori (Celli, 1983; Accorti *et al.*, 1991a; Pinzauti *et al.*, 1991). L'attività di bottinamento del territorio circostante l'alveare è di circa 7 Km² (Crane, 1984) e i prelievi che effettua in questa area sono diversi: oltre al nettare e al polline, importanti dal punto di vista energetico e proteico, l'ape raccoglie anche la melata degli afidi su varie essenze botaniche, sugge l'acqua di fossi e pozze, si posa sul terreno e sulle foglie e, avendo un corpo peloso, intercetta e veicola le particelle in sospensione atmosferica durante il volo. Un'altra grande prerogativa dell'ape è quella di far ritorno all'alveare, mettendoci così in condizione di individuare eventuali sostanze inquinanti attraverso strategie miste di controllo numerico della popolazione e di analisi chimiche (Celli *et al.*, 1984; Celli & Porrini, 1987; Celli *et al.*, 1988a; Celli *et al.*, 1988b; Celli *et al.*, 1991). La metodologia adottata si basa su un importante presupposto: l'ape risulta essere un buon indicatore diretto degli insetticidi rispondendo alla loro immissione

nell'ambiente con un rilevante numero di api morte, mentre nel caso di principi attivi non particolarmente pericolosi l'insetto funziona come indicatore indiretto e ci fornirà informazioni sotto forma di residui (Celli & Porrini, 1991).

2. Installazione delle stazioni di monitoraggio

La zona in cui viene svolta l'indagine, deve essere studiata dal punto di vista dell'uso reale del territorio, dell'orografia, della composizione vegetale, della presenza o meno di aree naturali, dell'impatto antropico, ecc. per scegliere, in maniera appropriata, i punti dove collocare gli alveari per la rete di monitoraggio. Le mappe colturali, che devono essere preliminarmente predisposte, sono un ottimo strumento per raggiungere questo scopo. Particolare attenzione deve essere posta alla dislocazione delle coltivazioni, alle essenze vegetali mellifere e, in generale, al grado di attrattività che le specie botaniche presenti sul territorio esercitano verso le api (*Apis mellifera* L.). Considerando che ogni stazione di monitoraggio "controlla" circa 7 km², è necessario creare reti di rilevamento a maglie molto strette, cosa che permetterà di ovviare a quella parte di casualità delle indagini dovuta al comportamento specifico delle singole famiglie.

Ogni stazione di monitoraggio è formata da due alveari muniti di una gabbia di raccolta delle api morte, denominata "underbasket" (Accorti *et al.*, 1991b), posizionata sotto l'entrata (Figura 1).

Tale gabbia è formata da un telaio di legno diviso in due parti unite da una cerniera: quella inferiore è munita di una rete di metallo a maglie strette e quella superiore con una a maglie larghe.



Figura 1. Stazione di monitoraggio costituita da due alveari muniti di gabbia di raccolta delle api morte (tipo "underbasket")

Gli alveari impiegati devono essere omogenei dal punto di vista della loro, cosiddetta, *forza*. Tale *forza* si valuta mediante accurate visite agli alveari. In questi controlli si registrano su apposite schede alcuni importanti dati, come l'attività delle bottinatrici di fronte all'alveare, l'età della regina, il numero di telaini coperti dalle api, il numero di quelli occupati dalla covata, nuova e vecchia, la sua compattezza e discontinuità, la presenza di celle di fuchi e celle reali, il numero di telaini con miele vecchio e nuovo, polline, ecc.

Una volta alla settimana (sempre lo stesso giorno), oltre a controllare lo stato generale di salute dell'alveare, viene accertato e registrato su apposite schede il numero delle api morte nelle gabbie. Al superamento della soglia critica (350 api morte per settimana per stazione) (Porrini, 1998), si procede al prelievo e s'invia il campione al laboratorio per l'analisi chimica e palinologica. Mentre con il primo tipo di indagine si individuano le eventuali molecole insetticide responsabili della moria, con l'analisi palinologica si tenta di stabilire, attraverso il riconoscimento dei pollini presenti sul corpo delle api, i luoghi di bottinamento delle stesse e quindi delle probabili colture irrorate con i pesticidi che hanno provocato l'apicidio (Porrini *et al.*, 1998b).

Per il prelievo delle api nelle gabbie si deve utilizzare una pinzetta o guanti in lattice e un contenitore in vetro, preventivamente lavato con acetone e posto ad asciugare in stufa alla temperatura di 50°C e chiuso con tappi a vite con sottotappi in teflon.

Sul contenitore vengono riportate tutte le indicazioni utili per la necessaria elaborazione dei dati, come la stazione di prelievo, la data, ecc.

I campioni vanno trasportati in contenitori refrigerati e stoccati in congelatore a -20°C.

3. Analisi di laboratorio

3.1. Pesticidi

3.1.1. Reagenti e materiali

- Standard puri di fitofarmaci
- Acetone per pesticidi
- Acetonitrile per HPLC
- Acqua per HPLC
- Colonne di estrazione Extrelut vuote
- Fase di estrazione Extrelut (polvere di diatomee)
- Colonnine di purificazione
- Filtri monouso 0,45 μ
- Evaporatore rotante
- Frullatore
- Micropipette
- Vetreria di laboratorio lavata con acetone ed asciugata in stufa alla temperatura di 50°C.

3.1.2. Strumentazione analitica

- Gascromatografo con colonne capillare ad alta risoluzione con rivelatore ECD (cattura di elettroni), per le sostanze clorate.

- Gascromatografo con colonne capillari ad alta risoluzione con rivelatore NPD (azoto e fosforo), per le sostanze azotate e fosforate.
- Cromatografo liquido ad alta prestazione con rivelatore UV (spettrofotometrico) per i carbammati ed alcuni diserbanti.
- Spettrofotometro UV-visibile per la determinazione dei ditiocarbammati
- Gascromatografo con colonne ad alta risoluzione accoppiata con spettrometro di massa quadrupolare, per la conferma dei campioni positivi mediante tecnica S.I.M. (Select Ion Monitoring).

3.1.3. Descrizione del metodo

- Preparazione del campione:

al momento dell'analisi il campione prelevato dal congelatore viene mantenuto a temperatura ambiente per alcuni minuti omogeneizzato.

- Estrazione:

un'aliquota dell'omogenato viene mescolata con Extrelut (polvere di diatomee) in un beker con una bacchetta di vetro, fino al completo inglobamento del campione con la fase che deve mantenere un aspetto polverulento.

Il campione supportato sulla fase viene trasferito nella colonna di estrazione, coperto con un filtro di lana di vetro e, dopo circa 10 minuti, eluito con cloruro di metilene.

L'eluato così ottenuto viene evaporato su evaporatore rotante in corrente di azoto.

Si procede poi all'analisi utilizzando la strumentazione descritta.

Per la ricerca dei residui di ditiocarbammati il metodo si basa sull'idrolisi in ambiente acido del campione: il solfuro di carbonio che si sviluppa, una volta fissato con il reattivo di Cullen, viene determinato quantitativamente mediante misura spettrofotometrica.

3.2. Pollini

3.2.1. Un'aliquota del campione di api morte viene inoltrato al laboratorio di palinologia.

3.2.2. Per rimuovere il polline dal corpo peloso delle api morte, viene eseguito un accurato lavaggio con acetone. L'ape è tenuta con una pinzetta sopra una provetta di plastica da 10 ml; a questo punto si spruzza l'acetone facendo in modo che venga asportato l'eventuale polline presente su di essa. Successivamente le provette vengono poste in centrifuga a 3000 giri per 15 minuti. Una volta estratte le provette dalla centrifuga si elimina il sovrantante, mentre il sedimento (polline, spore ecc.) viene prelevato con una pipetta e distribuito sul vetrino portaoggetto; poi viene sistemato il vetrino coprioggetto, previa distribuzione di gelatina glicerinata sulla superficie di quest'ultimo.

3.2.3. Si esegue lo studio palinologico per rendere possibile l'identificazione del polline.

3.2.4. I principali elementi utilizzati per la determinazione dei pollini sono: la dimensione, le caratteristiche dell'esina, la forma e il numero delle tipiche aperture. Per il riconoscimento dei granuli pollinici spesso si consultano gli atlanti e le palinoteche; inoltre, per confermare ulteriormente la validità delle analisi fatte, si possono allestire

preparati microscopici con polline fresco, prelevato direttamente dalle antere dei fiori di specie botaniche presenti nell'area interessata all'indagine.

4. Elaborazione dei dati

4.1. L'analisi dei dati raccolti con questa strategia di monitoraggio, ci consente di trarre numerose informazioni sul territorio indagato. Oltre a stilare l'elenco dei principi attivi impiegati nelle varie aree e nei diversi periodi, è possibile delineare particolareggiate mappe mensili sulla compromissione chimica di un territorio. Queste carte vengono definite da un indice a due vie che stabilisce in maniera più appropriata il grado di inquinamento da pesticidi del territorio (Porrini *et al.*, 1996; Porrini *et al.*, 1998a).

4.2. L'Indice di Pericolosità Ambientale (IPA), è ottenuto intersecando la classe di mortalità (media mensile) di una stazione con l'Indice di Tossicità dei Pesticidi (IPT) riscontrati, tramite l'analisi chimica, nelle api morte prelevate in quella stazione (Tabella 1).

IPT	CLASSI DI MORTALITA' (api morte/mese)			
	0 - 200 D ₄ *	200 - 400 D ₂ *	400 - 800 C ₃ *	> 800 C ₁ *
Campioni senza residui o mortalità inferiore alla soglia critica*				
0 - 0.125	D ₃	D ₁	C ₂	B ₃
0.125 - 0.25	D ₂	C ₃	C ₁	B ₂
0.25 - 0.375	D ₁	C ₂	B ₃	B ₁
0.375 - 0.5	C ₃	C ₁	B ₂	A ₄
0.5 - 0.625	C ₂	B ₃	B ₁	A ₃
0.625 - 0.75	C ₁	B ₂	A ₄	A ₂
0.75 - 0.875	B ₃	B ₁	A ₃	A ₁
> 0.875	B ₂	A ₄	A ₂	A ₁

Tabella 1. Valori dell'Indice di Pericolosità Ambientale (IPA). (A₁: persistente, A₂: preoccupante, A₃: consistente, A₄:notevole, B₁: elevato, B₂: importante, B₃: diffuso, C₁: medio, C₂: medio-basso, C₃: moderato, D₁: basso, D₂: limitato, D₃: minimo, D₄: assente)

L'Indice di Tossicità del Pesticida (IPT) si calcola con la seguente formula:

$$(IPT) = f_{corr} \sum_{c=1}^N \frac{(ct)_c (fp)_c}{N}$$

in cui:

(IPT): Indice di Tossicità del Pesticida;

(ct)_c: classe di tossicità del principio attivo, nei confronti delle api, normalizzato al valore più elevato;

- (fp)_c: fattore di persistenza del principio attivo, normalizzato al valore più elevato;
f_{corr}: fattore di correzione. Si utilizza solo quando, nello stesso mese, insieme ai campioni di api risultati positivi all'analisi chimica, ve ne sono anche di negativi. Il valore è dato dal rapporto fra la media del numero di api morte corrispondente ai campioni negativi e la media complessiva del periodo considerato. Si considerano solo i valori uguali o superiori a 1;
N: numero di campioni di api risultati positivi all'analisi;
N.B.: Quando in un solo campione di api morte vi sono più residui di pesticidi, il fattore a numeratore, relativo a quel campione, è il risultato di una opportuna media.

Bibliografia

1. Accorti M., Guarcini R., Persano Oddo L. (1991a). L'ape: indicatore biologico e insetto test. Redia, Vol. LXXIV, n.1 (appendice):1-15.
2. Accorti M., Luti F., Tarducci F. (1991b). Methods for collecting data on natural mortality in bee. Ethol. Ecol. Evol., Special Issue 1: 123-126.
3. Celli G. (1983). L'ape come insetto test della salute di un territorio. Atti XIII Congr. Naz. Ital. Ent., Sestriere, Torino: 637-644.
4. Celli G., Porrini C. (1987). Apicidi e residui di pesticidi nelle api e nell'alveare in Italia (1983 - 1986). Boll. Ist. Ent. "Guido Grandi" Univ. Bologna, vol. XLII, 1987: 75-86.
5. Celli G., Porrini C. (1991). L'ape, un efficace bioindicatore dei pesticidi. Le Scienze 274: 42-54.
6. Celli G., Porrini C., Baldi M., Ghigli E. (1991). Pesticides in Ferrara province: two years monitoring with honey bees (1987 - 1988). Atti III Conv. A.I.S.A.S.P. Ferrara, 13-15 aprile 1989. In Ethol. Ecol. Evol., Special Issue 1: 111-115.
7. Celli G., Porrini C., Raboni F. (1988a). Monitoraggio con api della presenza dei Ditiocarbammati nell'ambiente (1983 - 1986). Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna, vol. XLIII: 195-205.
8. Celli G., Porrini C., Tiraferri S. (1984). Rapporti tra apicoltura e ambiente. L'ape come indicatore biologico dei pesticidi (con particolare riferimento alla provincia di Forlì) (Nota preventiva). Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna, vol. XXXIX: 231-241.
9. Celli G., Porrini C., Tiraferri S. (1988b). Il problema degli apicidi in rapporto ai principi attivi responsabili (1983 - 1986). Atti Giorn. Fitopat. Lecce, vol. 2: 257-268.
10. Crane E. (1984). Bees, honey and pollen as indicators of metals in the environment. Bee Wld 55: 47-49.
11. Pinzauti M., Frediani D., Biondi C., Belli R., Panizzi L., Cosimi C., Zummo V. (1991). Impiego delle api nel rilevamento dell'inquinamento ambientale. Analysis, 8: 354-407.
12. Porrini C. (1998). L'ape come indicatore biologico dei pesticidi: convalide sperimentali. Tesi di laurea in Scienze Agrarie, Facoltà di Agraria, A.A. 1996-1997. Università di Bologna, 165 pp..

13. Porrini C., Celli G., Radeghieri P. (1998a). Monitoring of pesticides through the use of honeybees as bioindicators of the Emilia-Romagna coastline (1995-1996). *Ann. Chim.*, 88 (3-4): 243-252.
14. Porrini C., Celli G., Stefano M.A., Sabatini A.G. (1998b). Impiego del polline marcatore nel monitoraggio dell'inquinamento da pesticidi tramite api. *Atti XVII Congr. Naz. It. Ent.*, Maratea, 21-26 Giugno.
15. Porrini C., Colombo V., Celli G. (1996). The honey bee (*Apis mellifera* L.) as pesticide bioindicator. Evaluation of the degree of pollution by means of environmental hazard indexes. *Proceedings XX Int. Congr. of Entom.*, Firenze, Italy, August 25-31: 444.

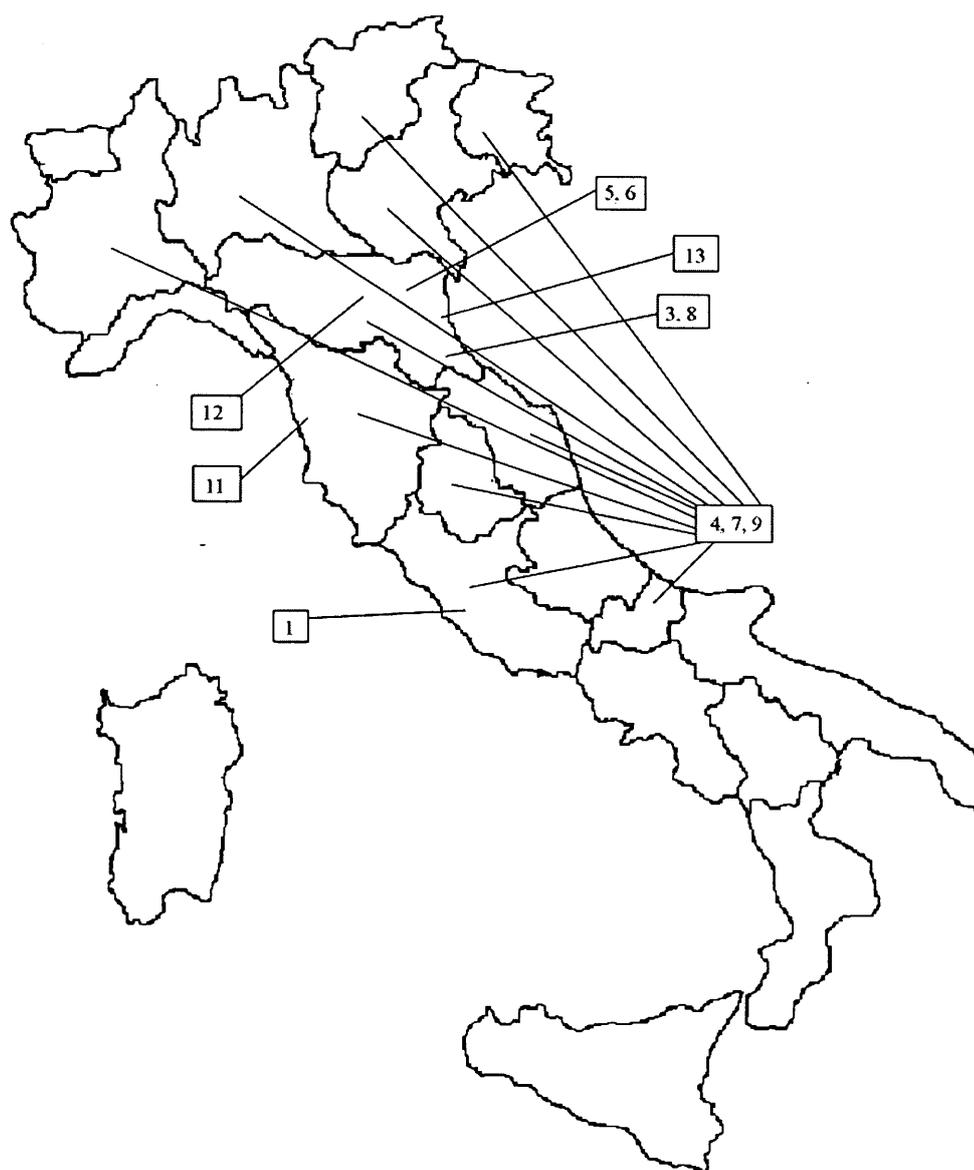


Figura 2. Distribuzione geografica dei lavori riguardanti studi condotti sul territorio italiano, rappresentati dai numeri con i quali sono riportati in bibliografia