

Claudio Porrini, Piotr Medrzycki

11.1 Introduzione

Il declino degli impollinatori selvatici e, in particolare, la mortalità delle api domestiche registrata negli ultimi anni hanno messo in evidenza il fondamentale ruolo delle api e degli altri insetti pronubi nell'impollinazione delle piante. L'accertamento delle cause di questi fenomeni non è di facile realizzazione, perché i fattori implicati possono variare e combinarsi fra loro. L'esposizione ai pesticidi, insieme alle patologie, ai parassiti, alle pratiche apistiche e alle condizioni nutrizionali, agroambientali e climatiche contribuiscono, secondo la teoria del vaso traboccante (Fig. 11.1), a causare, in proporzioni differenti, l'indebolimento e il successivo collasso degli alveari. I pesticidi, in particolare gli insetticidi, oltre alle mortalità provocate da grossolani errori durante il loro impiego (interventi fitoiatrici eseguiti in fioritura, durante i flussi di melata, in presenza di vento, contaminazione della flora spontanea, ecc.), sono anche sospettati di abbassare, in dosi sub-letali, le difese immunitarie e di indurre alterazioni sul comportamento, sull'orientamento e sull'attività sociale delle api [1, 2].

I danni verso le api, provocati dall'impiego dai pesticidi, furono osservati fin dalla fine dell'Ottocento quando, nel 1881, fu segnalato negli Stati Uniti d'America il primo apicidio ufficiale imputabile all'arseniato di rame irrorato su pero [3]. In Italia non ci sono dati ufficiali riguardanti i primi danni nei confronti delle api, ma nel 1907 un olivicoltore di nome James Auget intuì l'in-

C. Porrini (✉)
Dipartimento di Scienze Agrarie (DipSA)
Alma Mater Studiorum - Università di Bologna
e-mail: claudio.porrini@unibo.it

P. Medrzycki
CRA-API, Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura
Unità di ricerca di apicoltura e bachicoltura, Bologna
e-mail: piotr.medrzycki@entecra.it

fluenza negativa che i pesticidi possono avere sulle api: “Ponete in vicinanza degli oliveti che trattate delle semplici arnie d’api: studiate gli effetti della vostra miscela sulle medesime e se la riconoscete innocua allora sta bene, ma se fosse micidiale fermatevi” [4].

11.2 Come le api captano i pesticidi

L’ape è intimamente legata all’ambiente circostante l’alveare, dove vi preleva numerose sostanze: dal nettare al polline e dall’acqua alla melata e propoli. La popolazione di un singolo alveare è mediamente composta da 40.000 individui, con forti variazioni durante l’anno. Di questi, circa un quarto, per l’esattezza le api bottinatrici, sono deputate a reperire all’esterno tutto ciò di cui la famiglia ha bisogno per potersi sostenere e sviluppare. A tale scopo, ciascuna di esse compie una decina di viaggi ogni giorno, visitando in media un migliaio di fiori. Si può quindi dedurre che le api di un alveare effettuano giornalmente non meno di 10 milioni di microprelievi [5] nella loro area di volo valutata in circa 7 km² [6], cioè 700 ettari. Le vie attraverso le quali le api possono venire in contatto con i pesticidi sono molteplici, come diverse sono le classificazioni delle modalità di esposizione che prendono in considerazione le caratteristiche agronomiche dei prodotti (sistemici o di contatto), le vie di esposizione (per ingestione, contatto diretto o contatto indiretto) o, ancora, la formulazione dei prodotti utilizzati (polverulenta, granulare, liquida, ecc.).

Le api possono venire in contatto con gli agrofarmaci irrorati nell’ambiente, raccogliendo nettare e polline sui fiori di piante coltivate e non, la rugiada e la melata su foglie e rami, l’acqua da pozzanghere e fossi o intercettando, con i peli che ricoprono il loro corpo, le particelle in sospensione atmosferica (in particolare sorvolando le zone trattate) o, ancora, investite direttamente dal trattamento antiparassitario (Fig. 11.2). Queste circostanze si verificano quando i trattamenti vengono effettuati in fioritura, si impiegano dosaggi elevati, oppure l’intervento fitosanitario è eseguito in periodi o in ore non appropriate contaminando, tramite l’effetto deriva (trasferimento causato dal vento di particelle di pesticida in sospensione atmosferica dall’area trattata verso altri siti non bersaglio), le coltivazioni e/o le piante spontanee in fiore circostanti (Fig. 11.3).

Il modello di diffusione delle sostanze inquinanti dall’atmosfera agli altri comparti ambientali, riportato in Figura 11.4, rappresenta in modo chiaro e sintetico come e dove le api vengono in contatto con le molecole chimiche diffuse nell’ambiente. Il trattamento, tra l’altro, di solito non investe in pieno tutte le bottinatrici che in quel momento si trovano in campo; alcune colpite, per così dire, di striscio sono destinate a morire in un secondo tempo nell’alveare, condividendo la sorte con altre api che solo successivamente hanno bottinato i fiori coinvolti dal trattamento fitosanitario. Se la dose assunta è al di sotto di quella considerata mortale (dose sub-letale), le api potrebbero incorrere in problemi comportamentali e di orientamento e non riuscire a tornare all’alveare. I pesticidi entrano in contatto con le api principalmente per ingestione, come è scatu-

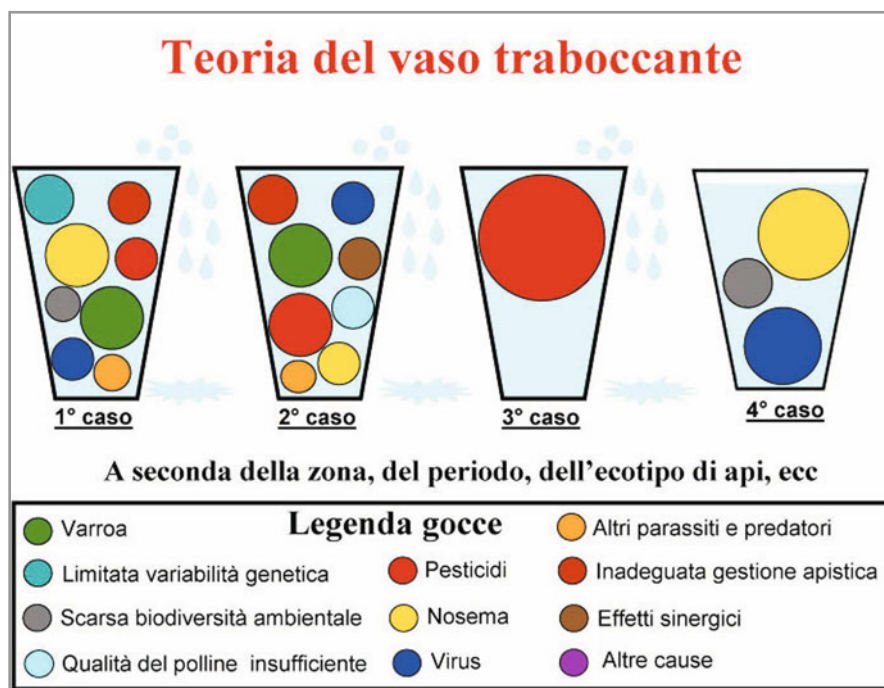


Fig. 11.1 Teoria del vaso traboccante. Nel primo e nel secondo caso diverse cause, più o meno gravi (dimensione della goccia), sia ambientali sia apistiche, agiscono simultaneamente sulla famiglia di api facendola collassare. Nel terzo caso basta una sola grave causa per far traboccare il vaso, mentre nel quarto, pur in presenza di severi problemi di virus e di *Nosema*, l'alveare non tracolla per, ad esempio, la presenza di un polline con un alto valore proteico o la mancanza di residui di pesticidi

rito dai risultati di una sperimentazione svolta diversi anni fa [7] (Fig. 11.5). Le api, prelevate da alveari che avevano subito un avvelenamento, sono state prima lavate con acetone e poi disgregate. L'acqua di lavaggio, così come la parte disgregata, è stata analizzata per la ricerca di pesticidi. I residui riscontrati sulla pelliccia possono essere stati intercettati dalle api durante il volo oppure raccolti insieme al polline o durante le operazioni di avvicinamento ai nettari nei fiori visitati, sfregando il loro corpo contro i petali. Invece quelli rinvenuti all'interno del corpo delle api possono essere stati ingeriti dalle api con il nettare, oppure penetrati nel loro corpo con l'aria, tramite gli stigmi, durante la respirazione.

11.3 Analisi di laboratorio e rilievi di campo

La quantità di pesticida riscontrata nelle api morte tramite le analisi chimiche non corrisponde quasi mai a quella che ha determinato la morte dell'ape in



Fig. 11.2 Trattamento fitoiatrico in un frutteto



Fig. 11.3 Fiori di tarassaco (*Taraxacum officinale*), molto attrattivi per le api, in mezzo a un frutteto

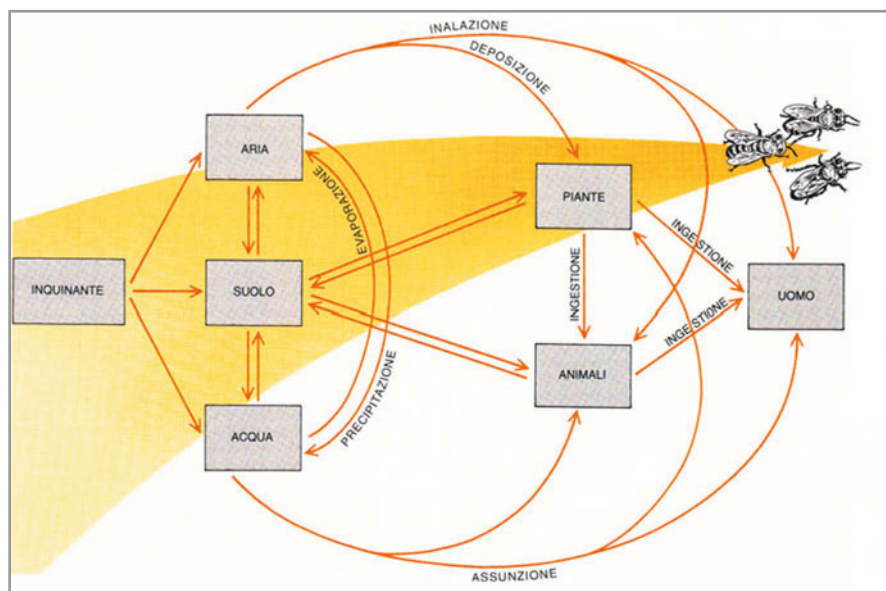


Fig. 11.4 Modello di diffusione nell'ambiente di un inquinante. L'ape può captare gli inquinanti da vari comparti ambientali (da "Le Scienze" n. 274, 1991)

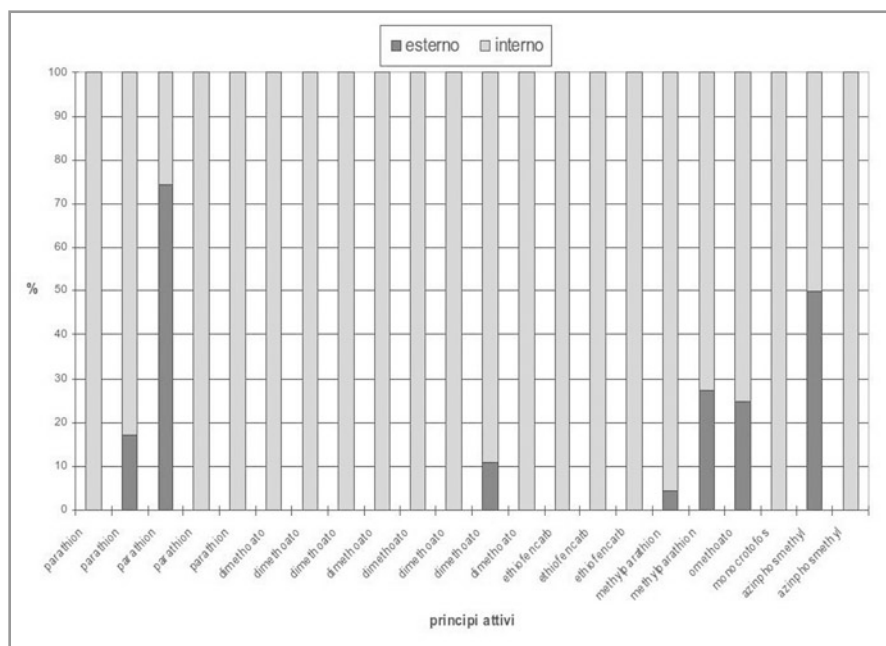


Fig. 11.5 Principi attivi riscontrati all'interno e all'esterno del corpo delle api morte

campo. Infatti, i cadaveri delle api possono rimanere davanti all'alveare, esposte a eventi meteorologici, anche qualche giorno, fin quando cioè l'apicoltore non andrà in apiario accorgendosi dell'accaduto. A questo punto, il caso dovrà essere segnalato ai servizi veterinari dell'ASL competente per il sopralluogo e l'esecuzione del prelievo dei campioni da portare al laboratorio di analisi. Durante questo periodo il pesticida, presente sul corpo delle api o al loro interno, inizierà il processo di degradazione, la cui velocità sarà determinata dalle caratteristiche del prodotto impiegato (formulazione, persistenza, ecc.), dal dosaggio e dalle modalità di applicazione, dal substrato (corpo delle api), e dalle condizioni climatiche durante e dopo il trattamento fitosanitario.

In relazione a queste variabili, le analisi di laboratorio rilevano una quantità di residui più o meno alta. Se il livello riscontrato è estremamente elevato, è possibile presumere un'origine dolosa dell'avvelenamento oppure una contaminazione da prodotti microincapsulati. Infatti, nel primo caso il prodotto è immesso dai malintenzionati direttamente all'interno dell'alveare, mentre nella seconda ipotesi le microcapsule, contenenti il principio attivo, sono raccolte dalle api insieme al polline sulla vegetazione trattata (vedi paragrafo 11.5). Normalmente, però, l'esame chimico evidenzia una quantità contenuta di residui, ma comunque superiore o inferiore alla DL_{50} , oppure al di sotto del limite di rilevabilità strumentale (LOD). Nel primo caso è possibile addebitare, con sufficiente certezza, la causa dell'intossicazione al pesticida rilevato; nel secondo si può solo presumere che il principio attivo riscontrato sia stato il motivo dell'apicidione, mentre nella terza circostanza la sostanza attiva potrebbe essersi degradata durante il periodo intercorso fra il contatto in campo delle api con il pesticida e l'analisi del campione in laboratorio, oppure non essere nell'elenco di quelle ricercate dal laboratorio.

Nel secondo e terzo caso, le analisi chimiche di per sé non sono sufficientemente esaustive. Per giungere a una diagnosi, è indispensabile integrarle con i dati rilevati in campo. Le osservazioni devono essere condotte sia sugli alveari colpiti (attività di volo, stato sanitario e forza della famiglia, comportamento delle api, mortalità, ecc.) sia nell'ambiente circostante l'apiario (tipo di zona, colture presenti, trattamenti fitosanitari eseguiti, condizioni meteorologiche, ecc.).

In Tabella 11.1 sono riportati, come esempio, i dati rilevati in campo e i risultati delle analisi di laboratorio effettuate sui campioni prelevati nella primavera del 2008 in seguito alle segnalazioni di gravi mortalità delle api (Fig. 11.6) e/o di spopolamento degli alveari (Fig. 11.7) nelle aree maidicole della regione Lombardia, durante o subito dopo la semina del mais [8, 9]. Le polveri emesse dalle seminatrici (Fig. 11.8), contenenti neonicotinoidi (utilizzati per conciare il seme di mais), rimanevano in sospensione atmosferica per un lasso di tempo dipendente dalle condizioni atmosferiche della giornata, dopodiché si depositavano al suolo e sulla vegetazione circostante, in un'area più o meno vasta, dove venivano intercettate o prelevate dalle api.

I residui di neonicotinoidi, riscontrati tramite le analisi chimiche nel 46,1% dei campioni di api e nel 75% di quelli di polline analizzati, seppur già signifi-

Tabella 11.1 Sintesi dei rilievi effettuati in campo e dei risultati ottenuti in laboratorio per la ricerca dei pesticidi in campioni apistici provenienti dalla regione Lombardia nella primavera del 2008

Questionari	
N. di questionari	65
N. di alveari colpiti in ogni apiario	da un minimo di 3 a un massimo di 170
N. totale di alveari coinvolti	1.513
Tipo di apiario	93% stanziale; 7% nomade
N. di api morte in ogni apiario	da poche centinaia a molte migliaia (fino a 15.000–20.000)
Tipo di zona	69% pianura; 20% collina; 11% aree miste
Principali colture presenti nel circondario	96% mais; 55% frumento; 33% prato
Periodo dell'apicidio e/o spopolamento	96,2% dei casi, durante o dopo la semina di mais
Covata e scorte negli alveari	Presenza, nella maggior parte dei casi, di un'estesa covata e di abbondanti scorte di miele e polline
Attività di bottinamento	Intensa al momento della semina (presenza di api bottinatrici con pallottole di polline nel 95,8% dei casi)
Comportamento delle api	Anomalo nel 91% dei casi: girano su se stesse 71,4%; disorientate 57,4%; aggressive 23,8%; incapaci di rientrare nell'alveare 52,3%
Analisi di laboratorio	
Totale campioni analizzati	69
Campioni api	65
Campioni polline	4
Campioni positivi (api)	30 (46,1%) imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin
Campioni positivi (polline)	3 (75,0%) imidacloprid e clothianidin

cattivi della causa del danno provocato alle api, identificata con l'esposizione delle api ai prodotti utilizzati per la concia del mais, sono stati integrati con numerose osservazioni di campo. Il numero di api morte riscontrate in ogni alveare variava da diverse centinaia a qualche migliaio; tutte le segnalazioni sono giunte da aree agricole dislocate per il 69% in pianura, il 20% in collina e per il resto in zone miste; nel 96% dei casi la coltura prevalente circostante gli apiari era il mais, seguita da grano e prati; i danni alle api si sono evidenziati nel 96,2% delle segnalazioni in concomitanza, o subito dopo, delle semine di mais; gli alveari colpiti da forte mortalità erano per il 93% stanziali e il 7% nomadi; il comportamento delle api è risultato anomalo nel 91% dei casi: api che giravano su se stesse (71,4%), disorientate (57,4%), aggressive (23,8%) o che non riuscivano a entrare nell'alveare (52,3%); nei favi era presente covata



Fig. 11.6 Intensa mortalità di api di fronte agli alveari



Fig. 11.7 Alveare spopolato



Fig. 11.8 Polveri durante la semina del mais

giovane e opercolata, buone scorte di polline e miele sia fresco che opercolato; nel periodo in cui si è registrato il danno era in corso un'intensa attività di bottinamento da parte delle api comprovata dall'osservazione, nel 95,8% dei casi, di numerose bottinatrici con il carico di polline.

Quindi i dati rilevati in campo, relativi sia ai casi i cui campioni hanno avuto un esito positivo sia a quelli con un risultato negativo all'analisi chimica, confermano che la causa dei danni subiti dagli alveari è da imputare alle operazioni di semina del mais anche in quegli episodi in cui non si è avuto il conforto positivo dalle analisi chimiche [8, 9].

11.4 Tossicità e classificazione dei pesticidi impiegati in agricoltura

In generale, la molecola chimica, per esercitare la sua tossicità nei confronti dell'insetto, deve penetrare nel lacunoma e, se la sua azione è per contatto, superare la cuticola oppure, se ingerito, oltrepassare la parete intestinale, o gli spiracoli del sistema respiratorio se agisce per asfissia. Dopodiché, deve diffondersi nell'emolinfa e, per raggiungere il sistema nervoso, penetrare la guaina mielinica che avvolge i nervi e combinarsi in modo stabile. L'insetticida, inoltre, deve cercare di resistere agli enzimi detossificanti o, per lo meno, non venire degradato troppo velocemente.

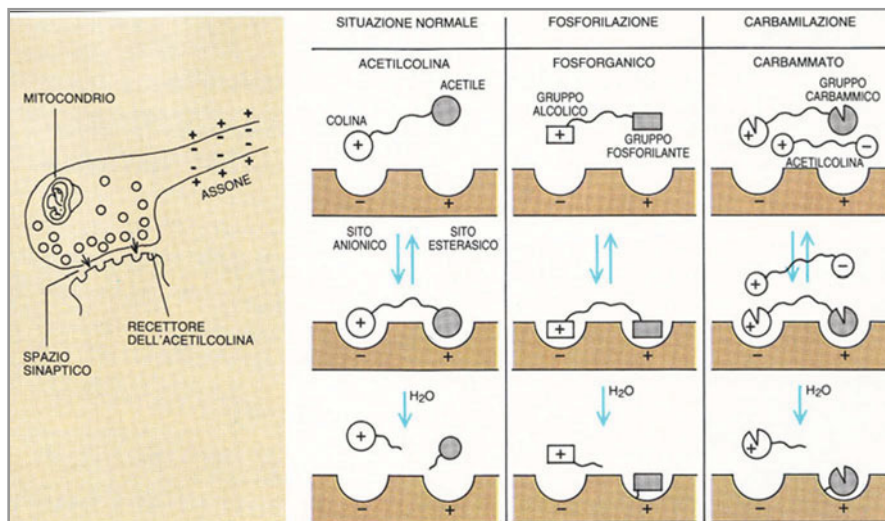


Fig. 11.9 Meccanismo d'azione dei fosfororganici e dei carbammati (vedi testo) (da "Le Scienze" n. 274, 1991)

Negli ultimi anni sono state tolte dal mercato europeo numerose molecole chimiche ritenute non idonee per i loro effetti tossici sull'uomo, sugli animali e sull'ambiente. I prodotti insetticidi rimasti appartengono praticamente a quattro categorie: fosfororganici, carbammati, piretroidi e neonicotinoidi.

L'azione degli esteri fosforici e dei carbammati è indirizzata sulla trasmissione degli impulsi nervosi ed è diretta a inibire l'enzima acetilcolinesterasi. Nella situazione normale, l'acetilcolina si avvicina all'enzima e forma un complesso enzima-substrato reversibile. Nel processo di fosforilazione l'inibitore si lega ai siti attivi dell'acetilcolinesterasi e, contrariamente a quanto accade per il complesso enzima-acetilcolina, la liberazione dell'enzima procede molto lentamente; perciò, durante questo periodo, l'animale rimane bloccato con riflessi negativi sull'intero processo di conduzione nervosa e con conseguenti manifestazioni di tipo tetanico che portano alla morte. Gli insetticidi fosfororganici, quindi, reagiscono con l'enzima acetilcolinesterasi in modo identico a quello dei normali recettori; l'unica differenza è dovuta al tempo richiesto per la defosforilazione. Gli insetticidi carbammati competono con l'acetilcolina in quanto possiedono una configurazione molecolare simile e riescono a inattivare l'acetilcolinesterasi, essendo fortemente attratti verso i siti anionico ed esteratico dell'enzima e più stabili rispetto all'acetilcolina nei confronti dell'idrolisi. Il gruppo carbammico viene liberato dopo una lenta reazione con l'acqua [10] (Fig. 11.9). Qualunque sia il meccanismo d'azione sul sistema nervoso, il risultato è il blocco della motilità di varie parti del corpo come le zampe, le ali e il canale alimentare portando, in poco tempo, l'animale alla morte per inedia.

I piretroidi hanno un'alta affinità per i canali del sodio dei nervi a livello dei quali causano drastiche modificazioni nella cinetica di apertura con ostacolo

alla ripolarizzazione della membrana e conseguente blocco della conduzione dell'impulso. Un altro sito d'azione dei piretroidi è rappresentato dai recettori per l'acido gamma-aminobutirrico (GABA), sui quali esercitano effetto inibitorio, causando una sintomatologia di tipo convulsivo.

L'azione dei neonicotinoidi negli insetti si esplica legandosi in maniera persistente ai recettori nicotinici post-sinaptici che vengono bloccati. La reazione dell'insetto è bifasica: inizialmente si ha un aumento della frequenza di scariche spontanee, a cui segue il blocco completo della propagazione dell'impulso nervoso. I recettori per l'acetilcolina degli insetti sono più sensibili ai neonicotinoidi rispetto a quelli dei vertebrati a causa di una diversa affinità di legame.

La tossicità è una proprietà comune a tutti i pesticidi. Quindi, la valutazione di un prodotto può essere fatta soltanto dopo aver condotto prove in laboratorio e in campo, che permettono di classificarlo a rischio alto, medio, basso o trascurabile per l'ape. Ogni fase della procedura, che considera parecchi fattori come la dose impiegata, il metodo di applicazione, la coltura trattata, ecc., conduce a una valutazione del rischio oppure a un'ulteriore prova. Le tre variabili che entrano in gioco nel determinare la tossicità (in laboratorio) e la pericolosità (in campo) di un pesticida sono rappresentate dalle caratteristiche della molecola, dall'ambiente in cui il prodotto viene impiegato e dall'organismo su cui se ne valuta l'effetto. In laboratorio, contrariamente al campo, la molecola è protetta dai fattori di degradazione, mentre l'ape è stressata dalla forzata clausura. Quindi, se le prove in laboratorio non forniscono elementi di tossicità, il prodotto, nella maggioranza dei casi, si può definire innocuo, almeno per quanto riguarda gli effetti tossici acuti. È evidente, però, che il metodo più affidabile per la stima del rischio è quello che più si avvicina alle condizioni della normale pratica agricola. Tuttavia, questo implica procedure molto costose e laboriose da mettere in opera e, a volte, i dati ottenuti possono essere di difficile interpretazione poiché la tossicità delle diverse sostanze dipende anche da parametri biotici (competizione delle fioriture, flusso nettario, attività delle api) e abiotici (temperatura, vento, umidità relativa) difficilmente controllabili. Un'utile alternativa è la combinazione dei saggi effettuati in laboratorio e in campo. Questi ultimi, però, quando i dati non coincidono, sono considerati più attendibili.

In passato i criteri di valutazione erano quasi esclusivamente basati sulla DL_{50} (dose letale di principio attivo che induce una mortalità del 50% negli individui saggiati) e sul tempo di decadimento delle sostanze attive necessario per ridurre la mortalità delle api sotto una certa percentuale (di solito al 25%). Questo approccio, tuttavia, non teneva in considerazione i molteplici elementi (biotici e abiotici) che incidono sulla reale pericolosità e su effetti diversi dalla mortalità stessa. Infatti, molte altre conseguenze negative sono state riscontrate con dosi sub-letali. La presenza sul mercato di pesticidi la cui azione verso le api non provoca necessariamente fenomeni di mortalità ma può influenzare il comportamento degli adulti e lo sviluppo della covata, ha indotto i ricercatori a studiare nuovi metodi di valutazione che tengano conto di tali meccanismi. Le dosi sub-letali, infatti, non comportano effetti evidenti e facilmente misurabili, ma alterazioni fisiologiche e comportamentali dei singoli individui o fun-

zionali delle famiglie come, ad esempio, malformazioni e riduzione della vita media degli adulti, alterazione delle capacità di apprendimento e della memoria, diminuzione dell'attività di bottinamento, ecc. [11, 12].

Nelle Tabelle 11.2 e 11.3 sono riportati i risultati delle prove di tossicità e pericolosità nei confronti delle api, relativi a 64 prodotti commerciali (51 sostanze attive singole o in miscela) [13]. Ogni formulato è stato saggiato alla dose di campo e nel caso questa fosse diversa per varie colture, è stata presa in considerazione quella relativa al pero. Mentre in laboratorio (Tabella 11.2) i saggi sono stati svolti per ingestione e per contatto indiretto, in campo e in semi-campo (Tabella 11.3), per conseguire un dato il più possibile realistico, pratico e di immediata fruibilità, la distribuzione dei prodotti è stata eseguita seguendo le indicazioni riportate in etichetta (es. aficida in prefioritura, fungicida in fioritura, ecc.). Le valutazioni effettuate in campo e semi-campo hanno preso in esame non solo il tasso di mortalità delle api prima e dopo l'intervento fitoiatrico ma, in considerazione dell'alto livello di socialità di questi insetti, anche numerosi altri parametri quali, ad esempio, la "forza" della famiglia, l'attività di volo e di bottinamento, la raccolta del polline e l'eventuale presenza di residui della sostanza attiva in studio nelle matrici apistiche. In questo caso, la classificazione degli effetti si è basata sul tempo necessario affinché i diversi parametri considerati ritornassero a valori "normali", cioè a quelli osservati prima dell'intervento fitoiatrico.

I prodotti fitosanitari, come già anticipato, possono indurre anche degli effetti sul comportamento dell'ape, in particolare sull'orientamento e sulla memoria. Pertanto, nelle note della Tabella 11.2 sono riportati, per alcuni prodotti, i risultati di saggi eseguiti anche a dosi sub-letali. Questi studi (di laboratorio) prevedono vari tipi di test come l'osservazione nel tempo di eventuali comportamenti anomali o la risposta al *Proboscis Extension Reflex* (PER). Nel primo caso sono effettuate prove del tutto analoghe a quelle di ingestione dove, oltre alla mortalità, vengono annotati i comportamenti delle api (tipo di movimento, tremori, contatti con le compagne, convulsioni, ecc.). Il secondo, invece, è un saggio specifico che si basa sulla valutazione del comportamento riflesso di estensione della ligula attuato dalle api quando percepiscono stimoli ambientali associati alla presenza di fonti zuccherine e prevede, dopo l'addestramento, la somministrazione alla singola ape del prodotto [14]. Gli insetticidi neurotossici che si legano ai recettori del neurotrasmettitore acetilcolina, come i neonicotinoidi, possono influire negativamente sulle aree del cervello deputate all'apprendimento e alla formazione della memoria.

11.5 Avvelenamento delle api da parte dei pesticidi: segni, modalità e fattori che ne influenzano la tossicità

Il segno più importante, immediato e evidente dell'avvelenamento da pesticidi delle api, è la presenza di grandi quantità di api morte o morenti, spesso con la ligula estroflessa, davanti all'entrata dell'alveare. Il numero di queste api morte

Tabella 11.2 Tossicità verso le api adulte di alcuni pesticidi valutata in laboratorio

Nome commerciale (% di sostanza attiva, dose di campo)	Laboratorio	
	Ingestione ¹	Contatto indiretto ¹
ACTARA 25 WG ² (Thiamethoxam - 25%, 30 g/hl); AFIDINA 25 (Fenitrothion - 25,5%, 300 ml/hl); BASUDIN (Diazinon - 20%, 200 ml/hl); DURSIBAN 75 WG (Chlorpyrifos-ethyl - 75%, 70 g/hl); FENITROFAST (Fenitrothion - 23,15%, 300 ml/hl); IMIDAN (Phosmet - 23,5%, 250 g/hl); KNOX OUT 240 (Diazinon - 23,1%, 200 ml/hl); LASER (Spinosad - 44,2%, 30 ml/hl); METOSIP L (Methomyl - 18,5%, 250 ml/hl); PERFETHION (Dimethoate - 37,4%, 150 ml/hl); RELDAN 22 (Chlorpyrifos-methyl - 22,1%, 250 ml/hl); RIPHOS (Chlorpyrifos-ethyl - 21,5%, 300 ml/hl); SPADA WDG (Phosmet - 23,5%, 300 ml/hl); SUMIT WG (Fenitrothion - 40%, 200 g/hl); TREBON (Etofenprox - 30%, 120 ml/hl); TURBOFEN 35 CS (Fenitrothion - 35%, 200 ml/hl)	Altamente tossico	Altamente tossico
ETILFAST (Chlorpyrifos-ethyl - 22,23%, 200 ml/hl);	Altamente tossico (36 ^a ora), Leggermente tossico (12 ^a ora) ⁶	Altamente tossico
FENITROCAP (Fenitrothion - 23,15%, 300 ml/hl);	Altamente tossico (36 ^a ora), Moderatamente tossico (12 ^a ora) ⁶	Altamente tossico
CONFIDOR (Imidacloprid - 17,8%, 50 ml/hl); SMART EW (Malaathion - 40%, 360 ml/hl)	Altamente tossico	Notevolmente tossico
TREBON STAR (Etofenprox - 15%, 100 ml/hl); VERTIMEC 1.9 EC (Abamectin - 1,84%, 75 ml/hl); ROGOR ⁴ (Dimethoate - 38%, 50 ml/hl) ⁸	Altamente tossico	Moderatamente tossico
PENNFOS 240 (Chlorpyrifos-ethyl - 22,33%, 220 ml/hl)	Moderatamente tossico	Altamente tossico
PYRINEX ME (Chlorpyrifos-ethyl - 23%, 210 ml/hl)	Notevolmente tossico (36 ^a ora), Leggermente tossico (12 ^a ora) ⁶	Altamente tossico

(cont. →)

Tabella 11.2 (continua)

Nome commerciale (% di sostanza attiva, dose di campo)	Laboratorio	Contatto indiretto 1
	Ingestione 1	
KARATE XPRESS (Lambda-cyhalothrin - 2,5%, 140 ml/hl)	Notevolmente tossico (36 ^a ora), Leggermente tossico (12 ^a ora) 7	Notevolmente tossico
CONTEST (Alpha-cypermethrin - 14,5%, 35 g/hl)	Altamente tossico	Leggermente tossico
SHOW TOP (Rotenone e Piretrine - 2% + 0,5%, 700 ml/hl)	Altamente tossico	Non tossico
DANTOP 50 WG 4 (Clothianidin - 50%, 15g/hl)	Altamente tossico	-
NURELLE (Cypermethrin - 10%, 150 ml/hl)	Notevolmente tossico	Leggermente tossico
DECIS EC (Deltamethrin - 2,81%, 75 ml/hl); STEWARD (Indoxacarb - 30%, 16,5 g/hl)	Moderatamente tossico	Leggermente tossico
RUFAS E FLO (Acrinathrin - 7,01%, 100 ml/hl)	Leggermente tossico	Moderatamente tossico
CALYPSO (Thiacloprid - 40,4%, 25 ml/hl); DECIS JET (Deltamethrin - 1,63%, 120 ml/hl)	Moderatamente tossico	Non tossico
BAYTEROID EW 3 (Cyflutrin - 5%, 100 ml/hl); DITHANE M-45 WP (Mancozeb - 80%, 200 g/hl); MATACAR FL (Hexythiazox - 24%, 20 ml/hl)	Leggermente tossico	Leggermente tossico
APPLAUD 40 SC (Buprofezin - 40,5%, 80 ml/hl); BIOROTEN (Rotenone - 4%, 300 g/hl); EPIK 5 (Acetamiprid - 20%, 25 g/hl); EUPAREN MULTI (Tolylfluanid - 50%, 150 g/hl); GREEN GUARD (Metarhizium anisopliae - 10%, 330 ml/hl); MAGISTER 200 SC (Fenazaquin - 18,32%, 75 ml/hl); MIMIC (Tebufenozide - 23%, 80 ml/hl); NOMOLT (Teflubenzuron - 13,57%, 50 ml/hl); PLENUM (Pymetrozine - 50%, 40 g/hl); POLYRAM DF (Metiram - 71,2%, 200 g/hl); SCORE 25 EC (Difenconazole - 23,23%, 15 ml/hl); TEPPEKI (Fonicamid - 50%, 14 g/hl)	Leggermente tossico	Non tossico

(cont. ↓)

Tabella 11.2 (continua)

Nome commerciale (% di sostanza attiva, dose di campo)	Laboratorio	Contatto indiretto ¹
	Ingestione ¹	
ALSYSTIN SC (Triflumuron - 39,4%, 25 ml/hl); CASCADE 50 DC (Flufenoxuron - 4,7%, 150 ml/hl); CORAGEN 20 SC (Chlorantraniliprole - 18,4%, 20 ml/hl); DIPEL HPWP (Bacillus thuringiensis - 6,4%, 1000 g/ha); ENVIDOR 240 SC (Spirodiclofen - 22,3%, 50 ml/hl); FOLICUR WG (Tebuconazole - 25%, 75 g/hl); GRANSTAR 50 SX (Tribenuron-methyl - 50%, 15 g/hl); JUVINAL 10 EC (Pyriproxyfen - 10,86%, 75 ml/hl); MATCH TOP (Lufenuron - 4,43%, 100 ml/hl); MAVRIK (Tau-fluvalinate - 21,4%, 30 g/hl); POLISENIO (Polisolfuro di calcio - 23% S, 1,5 kg/hl); PRODIGY (Methoxyfenozide - 22,5%, 40 ml/hl); TOPIK 240 EC (Clodinafop-propargyl - 22,3%, 125 ml/hl); TRIGARD 75 WP (Cyromazine - 75%, 40 g/hl)	Non tossico	Non tossico

¹ Nella prova per "Ingestione" il prodotto è stato somministrato alle api in una soluzione zuccherina, mentre in quella per "Contatto indiretto" le api sono state fatte camminare per tre ore su un substrato (foglie) trattato. In base alla percentuale di mortalità rilevata alla 1^a ora dall'inizio della prova, corretta con la formula di Schneider-Orelli, il prodotto è stata classificato come "non tossico" (< 1%), "leggermente tossico" (1-25%), "moderatamente tossico" (26-50%), "nottevolmente tossico" (51-75%), "altamente tossico" (76-100%).

² Nella prova del PER il prodotto determina disorientamento nelle api che perdura fino a 24 ore.

³ Alla dose di campo e a metà dose determina un effetto transitorio sub-letale sul comportamento delle api (api raggruppate e con spasmi).

⁴ Il prodotto è risultato altamente tossico verso le api per ingestione sia alla dose di campo di 15 g/hl che a metà dose dopo 3 ore dalla somministrazione.

⁵ Nelle prove etologiche, il prodotto induce nelle prime 6 ore comportamenti anomali (movimenti sconsiderati) che risultano più evidenti alla dose più elevata (200 g/hl).

⁶ Il prodotto, essendo microincapsulato, espleta la propria azione più lentamente rispetto a una normale formulazione. Sarebbe opportuno considerare la modalità alla 36^a ora.

⁷ Il prodotto, che probabilmente sviluppa un certo effetto repellente, è stato consumato completamente solo dopo i tempi previsti dalla prova, per cui la mortalità dovrebbe essere considerata alla 24^a ora.

⁸ Dose di campo impiegata su ciliegio.

Tabella 11.3 Pericolosità verso le api adulte di alcuni pesticidi valutata in semi-campo e in campo

Nome commerciale (% di sostanza attiva, dose di campo)	Semi-campo	Campo
CONFIDOR ¹ (Imidacloprid - 17,8%, 50 ml/hl); MAGISTER 200 SC (Fenazaquin - 18,32%, 75 ml/hl); MAVRIK (Tau-fluvalinate - 21,4%, 30 g/hl); RUFAS T E FLO (Acrinathrin - 7,01%, 100 ml/hl)	-	Non pericoloso
ENVIDOR 240 SC (Spirodiclofen - 22,3%, 50 ml/hl); JUVINAL 10 EC ² (Pyriproxyfen - 10,86%, 75 ml/hl); POLISENIO (Poli-solfuro di calcio - 23% S, 1,5 kg/hl); TEPPEKI (Flonicamid - 50%, 14 g/hl)	Non pericoloso	-
PERFEKTHION (Dimethoate - 37,4%, 150 ml/hl)	Pericoloso	-

¹ Nonostante l'alta tossicità rilevata in laboratorio, il prodotto in campo, se utilizzato seguendo le norme tecniche di impiego indicate in etichetta (in particolare l'intervento chimico da effettuarsi a non meno di 10 giorni dall'inizio dell'antesi e in assenza di altre fioriture nelle vicinanze), non risulta pericoloso per le api. Ciononostante, spesso gli apicoltori segnalano mortalità e spopolamenti degli alveari in seguito all'uso di questo prodotto a causa, probabilmente, di utilizzi non corretti.

² La tossicità dell'IGR Juvinal è stata valutata anche sulla covata. A tal fine, è stato utilizzato un protocollo sperimentale che prevede l'allevamento *in vitro* di larve e la somministrazione individuale del prodotto a diverse dosi per calcolare la DL₅₀.

è però connesso alla tossicità e alla pericolosità del principio attivo impiegato e, come già accennato, a numerosi altri fattori come la dose (o concentrazione), la modalità (contatto diretto, contatto indiretto, ingestione) e la durata (acuta o cronica) dell'esposizione.

In generale, i fosfororganici e i carbammati hanno un forte potere abbattente e, quindi, la maggior parte delle api colpite muoiono nell'apezzamento o sulla via del ritorno, mentre i cloroderivati hanno un effetto più dilazionato nei confronti degli insetti. Tuttavia, di solito, l'ape colpita da una molecola tossica tende a tornare a casa [15]. Nell'alveare esistono dei meccanismi che possono preservare la contaminazione del miele. Infatti, le api guardiane attaccano ed espellono dall'alveare le compagne che appaiono anormali o che rientrano impregnate di odori chimici sgraditi [16–18]. Le api giovani sembrano essere maggiormente sensibili ad alcuni vecchi insetticidi come DDT, diedrina e carbaryl, mentre le api di maggiore età lo sono di più verso malathion e methylparathion [19]. Ricerche più recenti hanno evidenziato che la suscettibilità delle bottinatrici (api più mature) all'intossicazione da parte di clothianidin e fipronil è maggiore rispetto alle api di casa (più giovani) e neosfarfallate e che questa sembra aumentare notevolmente a temperature alte [20]. Alcuni pesticidi evidenziano nelle api irrequietezza o, al contrario, ne sviluppano l'aggressività. In seguito all'esposizione con organofosforici e piretroidi, le api risultano molto più aggressive e rigurgitano il contenuto della borsa melaria (gli individui morti, infatti, si ritrovano con la ligula estroflessa), mentre il contatto con il carbaryl causa una lenta perdita di vitalità e un comportamento intirizzito, ma può provocare la morte anche dopo tre giorni [21]. Le api possono essere esposte a condizioni ambientali e nutrizionali tali da determinare l'assunzione di pesticidi nel nettare, nell'acqua o nella rugiada in varie concentrazioni con differenti conseguenze. L'imidacloprid e il clothianidin, saggiati rispettivamente a 0,2 ng/ape (1/25 della DL₅₀ a 48 h) e 0,92 ng/ape (1/5 della DL₅₀ a 48 h), hanno indotto una maggiore mortalità in caso di somministrazione della stessa dose di p.a. per ape a concentrazione maggiore (3 e 5 µl di soluzione zuccherina rispetto ai canonici 20 µl/ape dei protocolli standard) [22].

Anche la temperatura ha una notevole influenza sulla tossicità e pericolosità di un principio attivo; i trattamenti effettuati nelle ore più calde sono normalmente più pericolosi di quelli effettuati dopo il tramonto o durante la notte. In alcune ricerche su vecchi prodotti era stato evidenziato come il malathion fosse spesso dannoso alle api nel caldo della California ma non nel fresco dello stato di Washington [19], e come il mevinphos aumentasse la sua tossicità con le basse temperature notturne, per cui era consigliabile impiegarlo in estate e non in primavera [23]. Ma anche il fluvalinate (un aficida ancora in commercio) risulta quattro volte più tossico a 20 °C rispetto a 32 °C [24]. I prodotti microincapsulati, come quelli a base di methylparathion o di fenitrothion, possono indurre devastanti effetti in quanto la microcapsula, contenente il principio attivo, è di dimensioni simili (da 30 a 50 µm) al granulo di polline che le api bottinatrici raccolgono e trasportano nell'alveare [25–27]. Questi prodotti sono stati studiati per rilasciare lentamente il principio attivo sulla coltura in cui

sono stati distribuiti al fine di effettuare meno interventi fitoiatrici; ma se l'idea è buona, non lo è altrettanto la sua applicazione in campo. Infatti, le microcapsule portate nell'alveare prolungano la tossicità e, quindi, la mortalità della covata e delle api di casa per lunghissimo tempo, fino a 19 mesi [28]. I microincapsulati sono stati molto impiegati per i trattamenti viticoli contro lo *Scaphoideus titanus* Ball, il vettore della flavescenza dorata, determinando forti mortalità di api perché effettuati prima della fine della fioritura della vite. Con il polline di vite le api trasportavano all'interno dell'alveare anche le micidiali microcapsule [29].

Gli *Insect Growth Regulators* (IGR) sono prodotti utilizzati in agricoltura ormai da molti anni. Il loro scopo è quello di colpire processi fisiologici e strutture tipiche degli insetti o, più in generale, degli invertebrati. La loro azione si risolve soprattutto in un disturbo dei processi di sviluppo e metamorfosi, ragione per cui sono chiamati "regolatori di crescita". Agiscono più lentamente ma sono più selettivi dei comuni insetticidi. Alcuni di questi prodotti sono però stati incolpati di indurre alterazioni nella metamorfosi degli stadi giovanili dell'ape e di provocare malformazioni su adulti di operaie [30]. Le anomalie rilevate sono state diverse: occhi non pigmentati o con una tipica striatura semilunare, torace corto e depresso più o meno pigmentato, ali avvolte nell'esuvia pupale, piccole, malformate e non adatte al volo, tegumenti poco sclerificati e addome variamente pigmentato [31–33]. Recentemente sono stati riportati anche casi di malformazioni a carico delle api regine con la conseguente perdita del loro valore commerciale e funzionale. Nei campi coltivati sono molto impiegati anche i prodotti sistemici che, se distribuiti in prefioritura, possono successivamente contaminare il nettare e provocare, a seconda della quantità importata, seri danni all'alveare e in particolare alla covata, se non addirittura portare a morte l'intera famiglia [34, 35]. Sebbene la maggior parte dei diserbanti sia considerata non tossica verso le api, in seguito all'irrorazione di queste sostanze si possono evidenziare dei danni nell'alveare, in particolare a carico della covata. Bisogna dire, però, che tali effetti sono temporanei perché, alla sospensione della somministrazione, l'allevamento della covata di solito torna alla normalità [36].

11.6 Effetti sub-letali dei pesticidi nei confronti delle api

Gli effetti di dosi sub-letali di un pesticida possono provocare alterazioni nel sistema di comunicazione, nelle attività sociali, nelle capacità cognitive e nell'orientamento dell'ape. I prodotti fitosanitari che comportano effetti a carico del comportamento sono essenzialmente quelli che esprimono un'azione principale di tipo neurotossico [37]. Il parathion in dosi sub-letali, così come l'imidacloprid, sembrerebbe influire negativamente sulla comunicazione tramite danze delle api. In particolare, le bottinatrici comunicano un angolo diverso da quello indicato dalle api non contaminate ma tenute nelle stesse condizioni [38–40]. L'imidacloprid, somministrato per contatto in dosi comprese tra 0,1 e 20 ng/ape,

modifica il tempo necessario a un'ape adulta per reagire allo stimolo odoroso del cibo [41, 42]. Invece, la sua ingestione in dosi sub-letali o il contatto indiretto con polveri contaminate, diminuisce la capacità delle api di associare uno stimolo odoroso a una ricompensa [43–45]. Oltre all'imidacloprid, questi effetti si sono osservati anche per il clothianidin [46] e il thiamethoxam [47]. Anche l'acetamiprid, a dosi subletali (0,1 µg/ape) per ingestione, inibisce la memoria a lungo termine legata a stimoli odorosi; mentre il fipronil provoca disfunzioni di apprendimento e di memoria [48].

Gli insetticidi neonicotinoidi possono interferire anche con l'apprendimento spaziale e la memoria visiva legata ai colori, essenziali nell'orientamento in volo delle api, non solo per individuare le fonti di cibo in campo, ma anche, ad esempio, per ritrovare il percorso verso l'alveare. Dosi sub-letali di imidacloprid e clothianidin (1/10 e 1/100 della DL₅₀, rispettivamente) somministrati per ingestione, interferiscono sulla memoria sia a breve termine, ovvero dopo 1 ora dal trattamento, sia a lungo termine, cioè a 24 ore. Invece, il thiamethoxam e il fipronil (1/100 e 1/5 della DL₅₀, rispettivamente), provocano effetti sulla memoria a lungo termine [49].

L'imidacloprid, sempre in dosi sub-letali, può agire negativamente sulla capacità di comunicare alle compagne la posizione della fonte di cibo [40]. Tuttavia, anche alcuni piretroidi possono interferire sulla capacità delle api bottinatrici di trovare la via dell'alveare. La somministrazione per contatto a livello sub-letale (dosi fino a 25 volte inferiori alla DL₅₀) in condizioni controllate di permectrina e deltametrina, provoca l'incapacità delle api bottinatrici di ritornare al nido posizionato nelle vicinanze (8 m dall'alimentatore) [50]. A livello cognitivo, invece, gli effetti sub-letali degli insetticidi neonicotinoidi sono risultati più marcati rispetto a quelli provocati dai piretroidi o dai fosfororganici [51]. L'imidacloprid, ad esempio, somministrato in concentrazioni di 6 ppb, provoca la riduzione dell'attività di volo e di bottinamento [52]. In condizioni di campo, 100 ppb di imidacloprid (corrispondenti a 2–4 ng/ape) ritarda notevolmente il tempo di ritorno al nido delle api trattate [53]. L'ingestione di 1,5 ng/ape di imidacloprid o di 0,5 ng/ape di clothianidin provoca una diminuzione dei voli di bottinamento in campo e un aumento dell'intervallo di tempo tra due successivi ritorni all'alveare [54, 55]. Anche il thiamethoxam (1,34 ng/ape), ha determinato una difficoltà di ritornare all'alveare in tempi paragonabili con quelli delle api non trattate [56].

La deltametrina ha un'azione negativa sulla termoregolazione delle api, inducendo una forte ipotermia in singole api trattate per contatto con dosi sub-letali (2,5 e 4,5 ng/ape). Questo effetto è stato anche osservato con la somministrazione combinata di deltametrina e del fungicida prochloraz [57]. Coumaphos e fluvalinate, utilizzati per i trattamenti acaricidi contro la *Varroa*, possono interferire con il corretto sviluppo morfologico delle regine provocando una diminuzione di peso nelle larve e comportamenti anomali dopo lo sfarfallamento [58, 59]. A basse concentrazioni (100 ppm) il coumaphos inibisce l'accettazione delle regine trattate in alveari testimone [58]. Bifentrina e deltametrina (piretroidi) inducono, invece, una diminuzione della fertilità e della

fecondità [60]. La covata può essere esposta all'azione degli agrofarmaci anche per contatto attraverso la cera e per ingestione di polline stoccato (pane d'api). Da larve allevate su favi con un ampio numero di residui di pesticidi nella cera, si sono sviluppate api adulte con una longevità e una sopravvivenza inferiore, rispetto ad altre api allevate su favi nuovi. Inoltre, lo sfarfallamento dai favi contaminati è risultato ritardato [61]. L'ingestione di concentrazioni sub-letali di imidacloprid (0,5 ppb) ha provocato nelle api, dopo 72 ore dal trattamento, la riduzione del diametro degli acini delle ghiandole ipofaringee [62], il cui sviluppo nelle nutrici è funzionale per la secrezione di gelatina reale. Recentemente, sempre per l'imidacloprid, è stato anche osservato un effetto analogo in seguito all'ingestione di 2 e 3 ppb ripetuta per 14 giorni [63]. L'azione combinata di *Nosema ceranae* e dell'imidacloprid ha determinato la diminuzione dell'attività della glucosio ossidasi, enzima coinvolto nell'immunità sociale. Altri enzimi appartenenti al sistema anti-ossidante e detossificante sono stati studiati in relazione all'esposizione al thiamethoxam e al thiacloprid [64, 65]. Gli effetti sub-letali descritti colpiscono funzioni e aspetti centrali nella vita sociale delle api e, per questo motivo, la valutazione del rischio all'esposizione ai pesticidi non si dovrebbe limitare alle singole api ma estendersi all'intera famiglia. A questo proposito, è però importante considerare che, per evidenziare gli effetti sub-letali in campo sull'intero organismo alveare, le prove debbano essere condotte sul lungo periodo e, considerando l'estesa area di volo delle api, non si può prescindere dall'influenza di numerosi fattori che possono condizionare lo svolgimento della sperimentazione. In pratica, queste condizioni limitanti, non consentono di valutare gli effetti sub-letali dei prodotti fitosanitari verso le api tramite le prove classiche di campo, se non ricorrendo all'utilizzo di modelli. In determinati ambienti agricoli, infatti, l'elevata contaminazione da pesticidi, sia all'esterno che all'interno dell'alveare [66] espone le api a una moltitudine di residui per cui saggiare l'effetto di un singolo trattamento diventa più complesso. L'interpretazione dei risultati dovrà, quindi, tenere conto anche di queste influenze ambientali, rispetto alla stessa sperimentazione condotta in laboratorio.

Tramite l'uso di un modello è stata simulata l'esposizione per tre mesi delle api bottinatrici di una famiglia al nettare di colza contaminato con thiamethoxam, combinata con un moderato tasso di ovideposizione della regina. Il modello ha evidenziato una diminuzione drastica del numero di api, fin sotto la soglia delle 5000, predisponendo l'alveare al collasso [56]. Sebbene si tratti di una previsione su basi statistiche, questa è supportata da dati sperimentali sull'orientamento delle bottinatrici e sulla fertilità delle regine, a livello individuale, e dalla considerazione che la probabilità di sopravvivenza di ogni singola ape non possa considerarsi indipendente dalla mortalità del gruppo di individui in cui è inserita [67]. A livello di alveare, questa osservazione non è mai stata dimostrata sperimentalmente, ma è ragionevole ipotizzare che lo stesso meccanismo possa ripetersi. Gli effetti deleteri che derivano dalla contaminazione con prodotti fitosanitari, potrebbero quindi ripercuotersi anche sugli individui per i quali questa esposizione non si sia verificata.

11.7 Effetti sinergici di più fattori sulla mortalità per avvelenamento delle api

Negli ultimi anni, al fine di individuare le cause che entrano in gioco nel fenomeno del declino delle api, sono stati intrapresi molti studi sull'interazione di più cause.

Le api possono essere esposte a combinazioni di pesticidi attraverso molteplici vie quali, ad esempio, l'applicazione consecutiva di trattamenti con diversi principi attivi, l'uso di miscele di prodotti, oppure entrambe le eventualità, che sono estremamente frequenti nella realtà di campo. Inoltre, a causa dell'ampio raggio di volo, le bottinatrici possono attraversare diversi campi trattati e, quindi, entrare in contatto con differenti prodotti. Un'altra via di esposizione si realizza attraverso i residui rintracciabili nei prodotti raccolti dalle api, soprattutto in polline e nettare. La deltametrina, un insetticida piretroide, e il fungicida azotorganico prochloraz, se vengono utilizzati in miscela, risultano molto più tossici rispetto al loro impiego sequenziale oppure solitario [68]. Il fenomeno sembra dovuto all'inibizione dell'attività della monossigenasi microsomiale e, in particolare, del citocroma *P-450_{III}*, che entra nel metabolismo di detossificazione del piretroide [69]; questa teoria è stata però messa in discussione negli anni successivi tramite accurate sperimentazioni condotte utilizzando modelli che simulano la farmacocinesi della deltametrina in presenza o meno del prochloraz [70].

Allo stesso modo di quanto dimostrato per i piretroidi, anche l'associazione tra i neonicotinoidi e i fungicidi azolici presenta un carattere sinergico nei confronti delle api adulte. Il trattamento combinato per contatto con triflumizolo, ad esempio, ha aumentato la tossicità dell'acetamiprid e del thiacloprid più di 200 e 1000 volte, rispettivamente. Analogamente, la *DL₅₀* del thiacloprid è risultata di 500 volte più bassa in corrispondenza del trattamento abbinato con il propiconazolo [71, 72].

L'azione di diversi patogeni delle api, come la varroa, il *Nosema* o certi virus, è stata proposta da alcuni autori come la principale causa dei recenti spopolamenti di alveari. I trattamenti contro la varroa possono sensibilizzare maggiormente le api verso alcuni pesticidi, con un effetto molto più evidente rispetto ad alveari non trattati [73]. Vi sono altri casi in cui la miscela di due principi attivi è meno pericolosa dell'uso singolo, come è stato osservato, ad esempio, per l'insetticida fosfororganico dimetoato con l'erbicida fenossicarbossilico 2,4-DB [19]. La compresenza di *N. ceranae* e imidacloprid, in concentrazioni sub-letali nel polline, ha provocato conseguenze debilitanti sul sistema di difesa individuale e della famiglia [1]. In particolare, è stato dimostrato come le spore del patogeno siano in grado di replicarsi più velocemente in api esposte indirettamente all'imidacloprid durante lo stadio larvale [74]. Invece il clothianidin induce, in quantità subletali, la proliferazione del virus delle ali deformate (DWV) [2].

Tra gli stress ambientali che possono influire sul corretto sviluppo della famiglia, sono stati individuati la temperatura di allevamento della covata e il

regime alimentare. In condizioni non ottimali questi fattori possono contribuire allo stress indotto da un'intossicazione da pesticidi e agire in modo sinergico. Le larve allevate a una temperatura sub-ottimale (33 °C) hanno mostrato una minore sensibilità (DL_{50} alta) al trattamento con dimetoato, ma gli adulti sfarfallati avevano un tasso di sopravvivenza inferiore rispetto al controllo, mantenuto a 34,5 °C e una maggiore suscettibilità al pesticida [75]. La qualità pollinica è stata messa spesso in relazione con lo stato di salute delle api e, più in particolare, con lo sviluppo della covata e la longevità degli adulti. Tra le specie botaniche coltivate a carattere estensivo, il girasole e il mais sono ritenute non ottimali a livello nutrizionale. Un'alimentazione a base di polline di girasole, ad esempio, ha dimostrato di essere meno nutriente rispetto a un mix di pollini con diversa origine botanica [76]. Le famiglie alimentate solamente con mais hanno allevato meno covata rispetto a quelle nutrite con un mix pollinico; inoltre, le api neosfarfallate hanno mostrato una ridotta sopravvivenza e una maggior suscettibilità ai pesticidi [77].

11.8 Valutazione della mortalità delle api

Il rilevamento delle api morte presenta delle problematiche che molti autori hanno tentato di affrontare e di risolvere proponendo varie soluzioni che vanno dalle gabbie (o trappole) di raccolta ai conta-api elettronici. Con le prime è possibile conteggiare solamente le api che riescono a tornare all'alveare e, morendo, vengono espulse dalle compagne, ma non si rilevano quelle morte in campo o durante il viaggio di ritorno. Queste frazioni sono variabili e sono in relazione a numerosi fattori, come, ad esempio, il tipo di principio attivo con cui le api vengono in contatto (tossicità, formulazione, potere abbattente, ecc.). Nel corso degli anni molti ricercatori [78–82] hanno impiegato vari tipi di strutture atte alla raccolta di api morte nelle sperimentazioni di campo e di semi-campo per saggiare la pericolosità dei pesticidi impiegati in agricoltura. Le gabbie possono essere più o meno efficienti e devono assolvere ad alcuni requisiti. Oltre ad essere in grado di raccogliere le api espulse dall'alveare, non devono interferire con le normali attività delle api sul predellino, come volo e ventilazione, o facilitare l'accesso a eventuali saprofiti, per esempio le vespe, devono però permettere un facile conteggio, essere resistenti alle condizioni climatiche, facilmente applicabili e smontabili e, soprattutto, economiche. Uno dei problemi maggiori per queste strutture risiede nel fatto che le api possono abituarsi a tal punto alla presenza della gabbia che cominciano a considerarla una parte dell'alveare e, quindi, a rimuovere le api morte. Il tipo di gabbia denominata *underbasket*, è risultata quella maggiormente affidabile [83–87], ma sul mercato sono ormai da tempo disponibili anche i conta-api elettronici, in grado di contare le api in entrata e in uscita, determinando così anche il numero di api che muoiono in campo [88, 89].

11.9 Soglia critica di mortalità

I pesticidi, come abbiamo visto, possono indurre nell'alveare una mortalità subdola, cioè non percettibile, in caso di avvelenamenti sub-letali, ma anche una mortalità macroscopica, rilevabile soprattutto di fronte all'alveare, da distinguere però da quella fisiologica, che non è di facile accertamento in quanto dipendente dalla stagione, dalla forza della famiglia, dall'ambiente circostante e da numerose altre variabili. Tuttavia, considerando il numero di uova deposte dalla regina nel corso della stagione, quello delle celle di covata occupate, delle api sfarfallate e di quelle adulte, la mortalità naturale giornaliera, nel periodo di massimo popolamento, e cioè da maggio a luglio, dovrebbe essere circa un migliaio di api [90, 91]. Quindi, la valutazione tramite le gabbie di raccolta è una conta in difetto e, inoltre, la loro efficacia varia a seconda dell'ambiente in cui sono situati gli alveari, e della stagione. Pur tuttavia, una soglia fra la mortalità naturale e quella indotta dai pesticidi è stata definita tramite diverse sperimentazioni. Le api morte accumulate nell'arco di una settimana nelle gabbie *underbasket* collocate davanti ad alveari in diversi contesti ambientali sono state analizzate per individuare il livello di mortalità con residui di pesticidi. I campioni sono stati raccolti a varie soglie: da meno di 100 a più di 2.000 api morte/settimana/alveare. Dai risultati ottenuti si è rilevato che il 75% dei campioni che superavano la soglia di 125 api morte contenevano almeno un residuo di principio attivo, mentre solo il 25% dei campioni al di sotto di tale limite è risultato positivo [7, 92]. Quindi, in pratica, un numero giornaliero che supera le 20–25 api morte per alveare (circa il 2,5% della mortalità naturale massima), rilevato tramite le gabbie *underbasket*, dovrebbe essere il campanello d'allarme di una mortalità non più fisiologica ma indotta da un avvelenamento da pesticidi.

11.10 Diagnosi di avvelenamento

Il sintomo più evidente in seguito a un avvelenamento è, come riportato in precedenza, la presenza di numerose api morte o moribonde, con la ligula estroflessa, di fronte all'alveare. Normalmente, la maggior parte delle api colpite in campo da un trattamento fitosanitario non riesce a tornare all'alveare, ma una parte di esse, più o meno rilevante, non investita direttamente dal pesticida, riesce a compiere il viaggio di ritorno. Queste api, arrivando moribonde, possono presentare comportamenti anomali come rigurgitare il nettare contaminato imbrattando l'entrata dell'alveare, manifestare una limitata attività di volo, avere spasmi nervosi, tremori, movimenti lenti, saltellare o girare su se stesse, immobilizzarsi ed essere incapaci al volo. Alcuni di questi sintomi non sono esclusivi dell'azione di un pesticida sulle api, ma è comunque importante rilevarli per poterli mettere in relazione con altri parametri apistici e ambientali.

Infatti, per accertare le cause di un apicidio, è sempre molto importante relazionare le osservazioni sullo stato della famiglia con quelle dell'ambiente circostante, come esemplificato nel paragrafo 11.3. Se davanti all'entrata dell'alveare si ritrovano larve e pupe morte, è molto probabile che la covata sia stata alimentata con polline contaminato. La perdita della covata può determinare, dopo qualche settimana, uno spopolamento della famiglia che è possibile verificare con un'accurata visita alla famiglia. Durante il controllo, da effettuare possibilmente nelle primissime ore del mattino, oltre ad accertare la presenza di api morte sul fondo dell'arnia, è necessario osservare se le api adulte sulle facciate dei telaini sono sufficienti per mantenere la covata alla temperatura ottimale di 35 °C. Se l'area di covata non è completamente, o comunque in gran parte, ricoperta dalle api, è probabile che sia in atto uno spopolamento. Tale fenomeno può essere la causa scatenante di un lento ma progressivo declino della famiglia che, nei casi più gravi, porta alla sua estinzione. Fra gli effetti negativi dilazionati nel tempo, e per questo meno evidenti, bisogna anche ricordare i danni che colpiscono direttamente o indirettamente la regina. Talvolta queste alterazioni, a carico soprattutto della produzione dei feromoni reali e dell'ovideposizione, sono talmente gravi che le operaie sono stimolate ad allevare una nuova regina per sostituire quella vecchia. Le famiglie più forti e popolose, essendo caratterizzate da un numero di bottinatrici molto alto, subiscono danni per l'avvelenamento da pesticidi più consistenti di quelle più deboli. Bisogna anche ricordare che un eventuale stato patologico può mascherare una mortalità causata da pesticidi. Infatti, un alveare già indebolito da patologie è maggiormente suscettibile all'azione di un prodotto utilizzato nei campi coltivati per la difesa delle colture [93]. Viceversa, può anche accadere che un principio attivo poco tossico o captato dalle api in dosi sub-letali indebolisca le famiglie di api predisponendole a soccombere per cause patologiche. È quindi indispensabile conoscere gli effetti dell'interazione fra i pesticidi impiegati in agricoltura, gli acaricidi utilizzati per la lotta alla varroa e le patologie delle api (vedi paragrafo 11.7), perché, nella maggior parte degli eventi di mortalità o di spopolamento degli alveari, la causa è da ricercare nell'effetto combinato di più variabili. I rilievi apistici e ambientali, insieme agli esami di laboratorio (per determinare residui di pesticidi, patologie presenti sulla pelliccia delle api morte, per individuare le fioriture e le aree visitate dalle api, ecc.), consentono, nella maggior parte dei casi, di individuare le cause della mortalità delle api e/o dello spopolamento degli alveari.

11.11 Prevenzione e norme per ridurre il pericolo degli avvelenamenti

L'importanza strategica delle api per la produzione agricola e la biodiversità ambientale impone una coesistenza tra agricoltura e apicoltura che è possibile solo attraverso una vasta collaborazione a tutti i livelli in questi due settori, presupposto fondamentale per la riduzione degli apicidi causati dall'impiego dei

pesticidi. In molti casi, infatti, le api muoiono in seguito all'inosservanza delle più elementari norme di utilizzo di questi prodotti chimici. Vi è, però, anche da aggiungere che spesso le indicazioni d'impiego non sono sufficienti o sono irrealizzabili. Può succedere, infatti, che anche se un agricoltore le osserva scrupolosamente le api muoiano ugualmente. Ad esempio, fra le precauzioni d'impiego indicate, vi è lo sfalcio preventivo della flora spontanea, oltre che l'esecuzione dell'intervento fitosanitario verso sera e in assenza di vento. La barra falciatrice può però non riuscire a tagliare tutta la flora presente, in particolare quella con i fiori radenti a terra come il *Myosotis*, fra l'altro molto appetito alle api. Il trattamento verso sera, invece, può essere eseguito solo se gli appezzamenti da trattare sono piccoli, mentre è impossibile per le grandi estensioni. Inoltre, è spesso difficile effettuare l'intervento in condizioni atmosferiche ottimali (vento inferiore a 2 m/s, temperatura e umidità dell'aria non elevate, ecc.). In effetti, il trattamento può cominciare in un momento ideale ma se, ad esempio, il vento si alza improvvisamente a metà del lavoro, non si può certo pretendere che l'agricoltore si fermi in attesa che si calmi! In ogni caso, è molto importante che agricoltore e apicoltore concordino le loro attività al fine di limitare i rischi per le api dovuti all'utilizzo dei pesticidi.

La collaborazione può iniziare stabilendo il luogo dove collocare gli alveari, che non devono ostacolare le pratiche agricole aziendali, essere distanti almeno 30 m dagli appezzamenti da trattare, disposti sopravvento rispetto ad essi e, cercando di individuare le direzioni e i corridoi di volo prevalenti delle api, in aree che non le inducano a sorvolare le cosiddette "zone di morte", cioè gli appezzamenti trattati, per andare a bottinare su specie botaniche in fiore. La presenza di siepi e bordure andrebbe salvaguardata, in quanto queste strutture funzionano, oltre che da aree rifugio per gli insetti utili, anche come barriera all'effetto deriva. L'agricoltore dovrebbe valutare sempre con estrema cura il livello d'infestazione della coltura per evitare trattamenti inutili e non intervenire mai durante la fioritura delle specie entomofile e anemofile, coltivate e spontanee, o in presenza di flussi di melata. A questo proposito, bisogna stare molto attenti alla fine effettiva della fioritura, in particolare di certe coltivazioni come la vite, in cui non è facilmente valutabile, e anche alle insidiose seconde fioriture. In caso di attacco di afidi e conseguente produzione di melata, non bisogna trattare nessuna coltura, nemmeno i cereali. Altre cose da stabilire con l'apicoltore sono le modalità del trattamento fitosanitario (che devono tener conto dei suggerimenti d'uso e delle norme vigenti sui limiti e le proibizioni, come ad esempio lo sfalcio della flora spontanea) e la scelta del prodotto, che dovrebbe essere effettuata, nel limite del possibile, fra quelli meno tossici per le api e meno persistenti per l'ambiente.

È anche molto utile concordare le modalità di distribuzione dell'agrofarmaco (tramite atomizzatore, barra, manichetta, ecc.) e il periodo in cui eseguire l'intervento fitosanitario. Il momento migliore, normalmente, è quando il vento è molto ridotto e nel pomeriggio inoltrato. Se però è indispensabile farlo al mattino, bisogna intervenire nelle prime ore del giorno e, se possibile, prima che si levi il sole. È necessario fare anche attenzione alle condizioni ottimali (umidi-

tà elevata dell'aria, assenza di vento e cielo sereno) per la formazione della rugiada. Infatti, un trattamento la sera precedente, così come un intervento mattutino con la rugiada già formata, metterebbe a disposizione delle api, qualora avessero la necessità di importare dell'acqua in alveare, del materiale contaminato. Le api, nel periodo primaverile-estivo, hanno bisogno di molta acqua e, per questo motivo, bisogna cercare di non contaminarla e di fornirgliela sempre fresca e pulita in appositi contenitori da collocare nelle vicinanze degli alveari, per evitare che vadano a prelevarla in luoghi a rischio. Le alte temperature estive, inoltre, inducono le api a formare la "barba" sul predellino dell'alveare, esponendole maggiormente ai trattamenti fitosanitari, mentre gli abbassamenti di temperatura prolungano notevolmente l'effetto residuale dei pesticidi.

L'agricoltore deve rendersi conto che provocare degli apicidi o allontanare gli apicoltori dalle zone che presentano pericoli per le famiglie di api, può voler dire ottenere raccolti scarsi, in particolare per quelle colture che hanno bisogno più di altre dell'impollinazione incrociata. L'apicoltore deve collaborare con gli agricoltori della zona, ad esempio apponendo sugli alveari i propri recapiti per essere immediatamente rintracciato in caso di problemi impellenti, come l'improvvisa necessità di un trattamento non programmato. In questi casi, è possibile contenere i danni spostando gli alveari fino alla scomparsa dell'effetto residuale del pesticida, oppure coprirli con teli di juta bagnati o, al limite, chiudendoli per qualche ora. Se questa operazione fosse indispensabile, è necessario fornire gli alveari di acqua, tramite gli alimentatori, e assicurare la circolazione dell'aria inserendo un melario vuoto e togliendo il cassetto sottostante. Dopo il trattamento, una volta liberate le api, sarà opportuno inserire le trappole per la raccolta del polline in modo da ridurne al massimo l'importazione e fornire nel contempo un'adeguata alimentazione [93].

Se, nonostante tutte queste precauzioni, si verifica un avvelenamento negli alveari, l'apicoltore dovrà inoltrare regolare denuncia presso il Servizio Veterinario dell'ASL competente per territorio.

11.12 Conclusioni

Le ricerche condotte negli ultimi anni sulle possibili cause di mortalità delle api portano verso un'interpretazione multifattoriale di questo fenomeno, in cui gli avvelenamenti da pesticidi, con esiti letali o sub-letali, costituiscono un importante elemento di rischio. I pesticidi, insieme ad altri fattori come ad esempio i parassiti e le patologie dell'alveare, la conduzione apistica, le condizioni nutrizionali, climatiche e ambientali, contribuiscono all'indebolimento della famiglia di api e al suo eventuale collasso. L'importanza relativa di ciascun fattore non è fissa, ma estremamente variabile in funzione, soprattutto, del luogo e della stagione. La valutazione degli effetti dei pesticidi sulle api diventa quindi molto importante al fine di differenziarli da quelli delle patologie. Bisogna cercare di minimizzare la presenza dei fattori dipendenti dall'uomo, come ad esempio l'impiego dei pesticidi, perché l'insorgenza delle patologie è condizio-

nata anche da numerosi altri fattori difficilmente gestibili. La valutazione della pericolosità dei pesticidi per le api, inoltre, richiede molta attenzione nel processo di registrazione e utilizzo di questi prodotti, considerando che gli effetti possono interessare anche altri importanti impollinatori e insetti utili.

Bibliografia

1. Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C et al (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* 12:774–782
2. Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D et al (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Nat Acad Sci USA*. www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1314923110/-/DCSupplemental
3. Bovey P (1947) Les traitements antiparasitaires et l'apiculture. *Rev Romande d'Agriculture, de Viticulture et d'Arboriculture* 3:27–30
4. Accorti M (1994) Influenza dell'ambiente sul comportamento e sulla biologia delle api nel monitoraggio ambientale. Atti del convegno: "L'ape come insetto test dell'inquinamento agricolo" P.F "Lotta biologica e integrata per la difesa delle colture agrarie e delle piante forestali" del Ministero Agricoltura e Foreste, Firenze, 28 marzo 1992, pp 45–57
5. Celli G, Porrini C (1991) L'ape, un efficace bioindicatore dei pesticidi. *Le Scienze* 274:42–54
6. Crane E (1984) Bees, honey and pollen as indicators of metals in the environment. *Bee Wld* 55:47–49
7. Porrini C, Ghini S, Girotti S et al (2002) Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: Devillers J, Pham-Delègue MH (eds) *Honey bees: the environmental impact of chemicals*. Taylor&Francis, London, pp 186–247
8. Bortolotti L, Sabatini AG, Mutinelli F et al (2009) Pertes printanières d'abeilles en Italie. *La santé de l'abeille* 229:1–4
9. Porrini C, Sabatini AG, Mutinelli F et al (2009) Le segnalazioni degli spopolamenti e delle mortalità degli alveari in Italia: resoconto 2008. *L'Apis* 1:15–19
10. Corbett JR (1974) *The biochemical mode of action of pesticides*. London, New York, p 330
11. EFSA (2012) Scientific opinion on the science behind the development of a risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal* 10:2668
12. EFSA (2013) EFSA guidance document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal* 11:3295
13. Porrini C, Sabatini AG, Sgolastra F et al (2011) Tossicità verso le api – II. In: Muccinelli M (ed) *Prontuario degli agrofarmaci*, 12a ed. Edagricole, Milano, pp 905–909
14. Decourtye A, Pham-Delègue MH (2002) The proboscis extension response: assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee. In: Devillers J, Pham-Delègue MH (eds) *Honey bees: the environmental impact of chemicals*. Taylor&Francis, London, pp 67–84
15. Pourtallier J (1975) Aperçu de toxicologie apicole, pollutions chimiques des produits de la ruche. *Atti XXV Congr. Int. Apicolt., Apimondia*, Grenoble, pp 443–448
16. Sabatini AG, Savigni G (1976) Ricerca di residui di fitofarmaci clororganici e fosfororganici in campioni di miele dell'Emilia-Romagna. *Riv Sci Tecn Alim Nutr Um* 3:167–170
17. Sabatini AG, Savigni G (1977) Condizioni di salubrità, nei confronti dei residui di fitofarmaci, di campioni di miele prodotti in zone a vegetazione spontanea. *Quaderni di merceologia* 16:161–168
18. Grout RA (1981) *L'ape e l'arnia*. Edagricole, Bologna
19. Johansen CA (1979) Honeybee poisoning by chemicals: signs, contributing factors, current problems and prevention. *Bee Wld* 60:109–127
20. Bogo G, Medrzycki P, Tosi S et al (2010) Ruolo della temperatura in relazione all'età delle

- api in risposta ai pesticidi. In: Atti XIII Convegno nazionale dell'Associazione Italiana per lo studio degli artropodi sociali e presociali (AISASP), Reggio Calabria, 3–6 Maggio 2010
21. Johansen CA (1984) Behavior of pollinators following insecticide exposure. *Am. Bee J* 124:225–227
 22. Maccagnani B, Bortolotti L, Mattarozzi AR et al (2010) Effetti sulle api di neonicotinoidi e fipronil somministrati a diversa concentrazione. *Atti Giornate Fitopatologiche* 1:541–544
 23. Benedek P (1975) Effect of night temperature on the toxicity of field-weathered mevinphos residues to honeybees. *Z Angew Entomol* 79:328–331
 24. Nijjima K, Osawa K, Yoshida T (1985) Toxicity of several insecticides to honeybees: influence of post-treatment temperature. *B Fac Agr, Tamagawa Univ* 25:83–90
 25. Selkirk J (1976) Timed-release pesticide decimating northwest bees. *Environ Act B* 7:1
 26. Burgett M, Fisher G (1977) The contamination of foraging honey bees and pollen with Penncap-M. *Am Bee J* 117:626–627
 27. Atkins EL, Kellum D (1984) Microencapsulated pesticides: visual microscopical detection of capsules; quantification of residues in honey and pollen. *Am Bee J* 124:800–803
 28. Barker RJ, Lehner Y, Kunzmann MR (1979) Pesticides and honey bees: the danger of microencapsulated formulations. *Z Natur* 34:153–156
 29. Sgolastra F, Medrzycki P, Tesoriero D et al (2005) Relazione fra mortalità delle api e trattamenti fitosanitari in aree viticole dell'Emilia-Romagna. *Apoidea* 2:31–38
 30. Ruijter A, Van der Steen J (1987) A field study on the effect on honeybee brood of Insegar (fenoxycarb) applied on blooming apple orchards. *Apidologie* 18:355–357
 31. Gerig L (1991) La signification de l'Insegar pour l'apiculture et l'arboriculture. *J Suisse d'Apic* 6:189–196; 7:235–238; 8:283–285
 32. Marletto F, Arzone A, Dolci M (1992) Azione di fenoxycarb sulla covata dell'ape. *Apicolt Mod* 83:209–218
 33. Nitsch C (1992) The effect of Insegar on honeybees. *Apidologie* 23:346–348
 34. Fiedler L, Drescher W, Tasei JN (1984) Residue analysis of insecticides in nectar: possible contamination after pre-blossom treatment. *Proceedings of the 5th International Symposium on Pollination, Versailles*, pp 209–213
 35. Fiedler L (1987) Acephate residues after pre-blossom treatments: effects on small colonies of honey bees. *B Environ Contam Tox* 38:594–601
 36. Moffett JO, Morton HL (1975) Come i diserbanti agiscono sulle api. *Apicolt Mod* 66:132–134
 37. Belzunces LP, Tchamitchan S, Brunet J-L (2012) Neural effects of insecticides to the honey bee. *Apidologie* 43:348–370
 38. Schricker B, Stephen WP (1970) The effect of sublethal doses of parathion on honeybee behaviour. I. Oral administration and the communication dance. *J Apicult Res* 9:141–153
 39. Schricker B (1974) The effect of sublethal doses of parathion on the indication of distance in honeybees. *Apidologie* 5:149–175
 40. Eiri DM, Nieh JC (2012) A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *J Exp Biol* 215:2022–2029
 41. Guez D, Suchail S, Gauthier M et al (2001) Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* 76:183–191
 42. Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch Insect Biochem* 48:129–134
 43. Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S et al (2004) Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotox Environ Safe* 57:410–419
 44. Maccagnani B (2010) Metodi di indagine sugli effetti subletali di agrofarmaci sul comportamento delle api. *Apoidea* 7:41–45
 45. APENET (2011) "Effects of coated maize seed on honey bees". Report based on results obtained from the third year of activity of the ApeNet project. <http://www.reterurale.it/apenet>
 46. Aliouane Y, El Hassani AK, Gray V et al (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behaviour. *Environ Toxicol Chem* 28:113–122
 47. El Hassani A, Dacher M, Gary V et al (2008) Effects of sublethal doses of acetamiprid and

- thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch Environ Con Tox* 54:653–661
48. Bernadou A, Demares F, Couret-Fauvel T et al (2009) Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J Insect Physiol* 55:1099–1106
 49. APENET (2010) Effects of coated maize seed on honey bees. Report based on results obtained from the second year of activity of the ApeNet project. <http://www.reterurale.it/apenet>
 50. Cox RL, Wilson WT (1984) Effects of permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Environ Entomol* 13:375–378
 51. Matsumoto T (2013) Reduction in homing flights in the honey bee *Apis mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides. *B Insectol* 66:1–9
 52. Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I et al (2004) A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Con Tox* 47:387–395
 53. Bortolotti L, Montanari R, Marcelino J et al (2003) Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *B Insectol* 56:63–67
 54. Schneider CW, Tautz J, Grunewald B, Fuchs S (2012) RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One* 7:e30023
 55. Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH (2008) Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101:1743–1748
 56. Henry M, Beguin M, Requier F et al (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336:348–350
 57. Vandame R, Belzunces LP (1998) Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neurosci Lett* 251:57–60
 58. Pettis J, Collins AM, Wilbanks R, Feldlaufer MF (2004) Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 35:605–610
 59. Haarmann T, Spivak M, Weaver D et al (2002) Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J Econ Entomol* 95:28–35
 60. Dai PL, Wang Q, Sun JH et al (2010) Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica*. *Environ Toxicol Chem* 29:644–649
 61. Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS (2011) Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*): development and longevity. *PLoS ONE* 6:e14720
 62. Smodiš Škerl MI, Gregorc A (2010) Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honey bee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* 41:73–86
 63. Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L et al (2013) Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie*, pp 1–14
 64. Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet J-L et al (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotox Environ Safe* 82:22–31
 65. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J et al (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6:8
 66. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL et al (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5:e9754
 67. Dechaume Moncharmont F-X, Decourtaye A, Hennequet-Hantier C et al (2003) Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environ Toxicol Chem* 22:3088–3094
 68. Belzunces LP, Garin S, Colin ME (1993) A convenient biological method for evidencing synergies between pesticides in bees: effects of pyrethroid insecticides and azole fungicides applied at sublethal doses. *Proceedings of the 5th International Symposium on the Hazards of*

- pesticides to bees, Plant Protection Service, Wageningen (Olanda), 26–28 ottobre 1993, pp 69–75
69. Pilling E (1993) Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee, *Apis mellifera* L. Proceedings of the 5th International Symposium on the Hazards of pesticides to bees. Plant Protection Service, Wageningen (Olanda), 26–28 ottobre 1993, pp 1–82
 70. Chalvet-Monfray K (1996) Synergie entre la deltaméthrine et le prochloraze chez l'abeille (*Apis mellifera* L.). Hypothèses de mécanismes d'action testées par modélisation. Tesi di Dottorato, Università "Claude Bernard", Lione 1, Francia
 71. Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH et al (2010) Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* 5:e13181
 72. Ratnieks FLW, Carreck NL (2010) Clarity on honey bee collapse? *Science* 327:152–153
 73. Dustmann JH, Lienau FW (1993) Synergistic action of the varroacide perizin to other organophosphorus pesticides. Proceedings of the 5th International Symposium on the Hazards of pesticides to bees. Plant Protection Service, Wageningen (Olanda), 26–28 ottobre 1993, pp 83–89
 74. Pettis J, van Engelsdorp D, Johnson J, Dively G (2012) Pesticide exposure in honey bee results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99:153–158
 75. Medrzycki P, Sgolastra F, Bortolotti L et al (2010) Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides. *J Apicult Res* 49:52–59
 76. Schmidt LS, Schmidt J, Rao H et al (1995) Feeding preference and survival of young worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) fed rape, sesame, and sunflower pollen. *J Econ Entomol* 88:1591–1595
 77. Höcherl N, Siede R, Illies I et al (2012) Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees. *J Insect Physiol* 58:278–285
 78. McIndoo NE, Demuth GS (1926) Effects on honeybees of spraying fruit trees with arsenicals. *US Dept Agric Bull* 1364:32
 79. Rennie J (1927) Acarine disease in hive bees: its cause, nature and control. *North Scotland Coll Agric Bull* 33:22–24
 80. Herman FA, Brittain WH (1933) Apple pollination studies in the Annapolis Valley, N.S., Canada. *Canada Dept Agric Bull* 162:158–193
 81. Johansen CA, Coffey MD, Quist JA (1957) Effect of insecticide treatments to alfalfa on honey bees, including insecticidal residue and honey flavor analyses. *J Econ Entomol* 50:721–723
 82. Anderson LD, Atkins AL (1958) Toxicity of pesticides to honeybee in laboratory and field test in Southern California, 1955–1956. *J Econ Entomol* 51:103–108
 83. Marchetti S, Chiesa F, D'Agaro M (1987) Bee mortality following treatment with perizin in colonies of *Apis mellifera carnica* X *A. m. ligustica*. *Apicoltura* 3:157–172
 84. Accorti M, Luti F, Tarducci F (1991) Methods for collecting data on natural mortality in bee. *Ethol Ecol Evol Special Issue* 1:123–126
 85. Chiesa F, Barbattini R, Greatti M et al (1994) Confronto fra l'efficacia di raccolta di api morte in gabbie di tipo diverso. Atti del convegno del gruppo di Ricerca: "L'ape come insetto test dell'inquinamento agricolo" P.F "Lotta biologica e integrata per la difesa delle colture agrarie e delle piante forestali" del Ministero Agricoltura e Foreste, Firenze, 28 marzo 1992, pp 101–110
 86. Greatti M, Barbattini R, D'Agaro M (1994) Efficacia di diversi modelli di gabbie per la raccolta di api morte: verifica mediante l'utilizzo di api marcate allo sfarfallamento. Atti XVII Congr. Naz. it. Ent., Udine, 13–18 giugno 1994, pp 839–842
 87. Greatti M, Barbattini R, D'Agaro M, Nazzi F (1994) Effect of time on the efficiency of different traps for collecting dead honey bees. *Apicoltura* 9:67–72
 88. Struye MH (2000) Possibilities and limitations of monitoring the flight activity of honeybees by means of BeeSCAN bee counters. In: Pélissier C, Belzunces LP (eds) Hazards of pesticides to bees. *IOBC wprs Bull*, p 27
 89. Struye MH, Mortier HJ, Arnold G et al (1994) Microprocessor-controlled monitoring of honeybee light activity at the hive entrance. *Apidologie* 25:384–395

90. Chauvin R (1968) *Traité de biologie de l'abeille*, Masson et Cie, Parigi
91. Capelo A, Casalone P, Ferrari G (1983) Un modello matematico per la valutazione del numero di api presenti in un alveare. *Apicolt Mod* 74:239–245
92. Porrini C, Sabatini AG, Girotti S et al (2003) The death of honey bees and environmental pollution by pesticides: the honey bees as biological indicators. *B Insectol* 56:147–152
93. Accorti M (2000) Api e fitofarmaci: una convivenza possibile. In: Pinzauti M (ed) *Api e impollinazione*. Regione Toscana Dip. Sviluppo Economico, pp 263–308