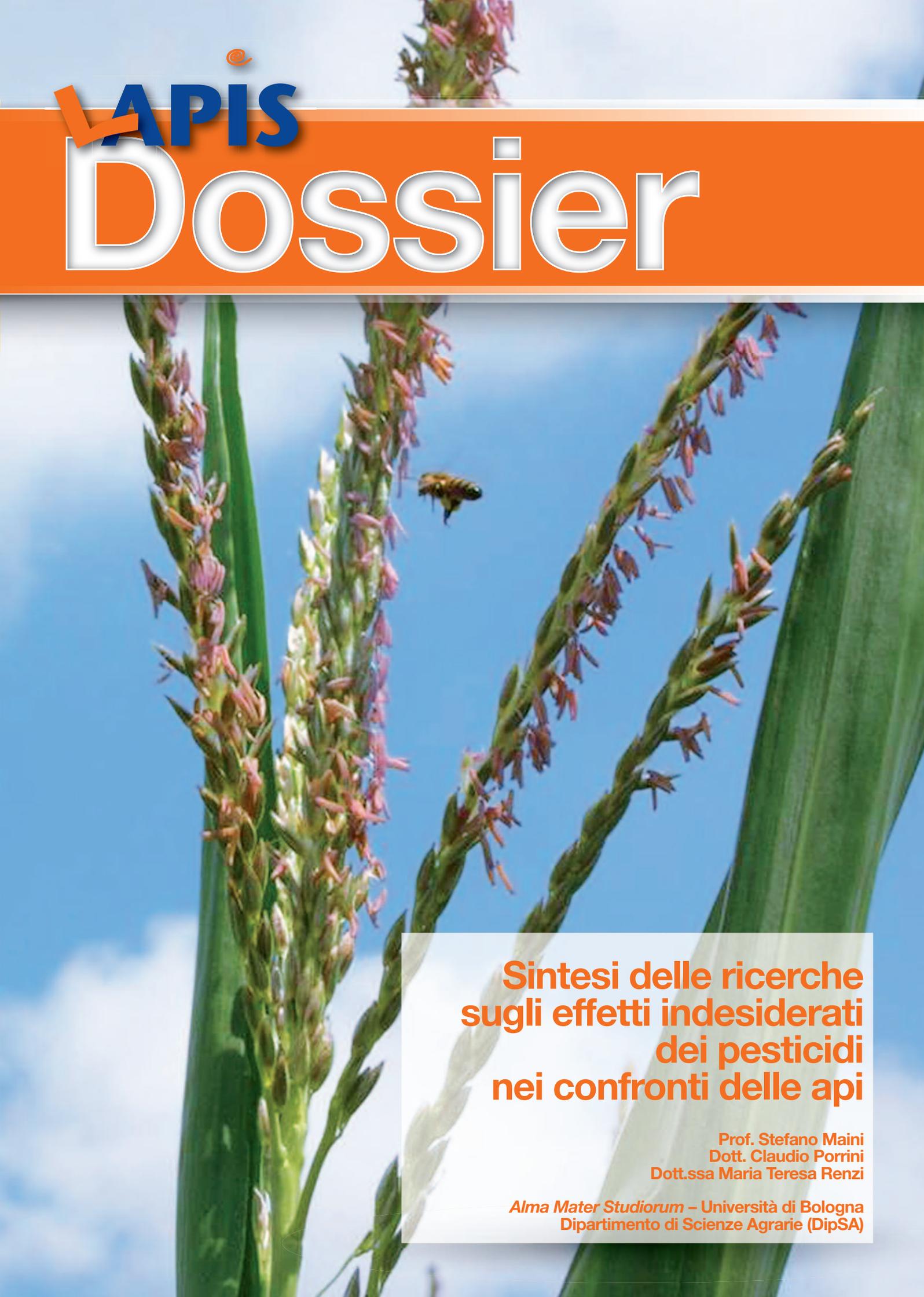




LAPIS

# Dossier



**Sintesi delle ricerche  
sugli effetti indesiderati  
dei pesticidi  
nei confronti delle api**

Prof. Stefano Maini  
Dott. Claudio Porrini  
Dott.ssa Maria Teresa Renzi

*Alma Mater Studiorum* – Università di Bologna  
Dipartimento di Scienze Agrarie (DipSA)

## Api/Pesticidi. Conoscere per parlare e... per poter agire... con cognizione di causa

Il Centro di Riferimento Tecnico per l'Apicoltura Problematiche Ambientali e Nutrizionali di Unaapi ha sviluppato negli anni una più che proficua collaborazione con tutti gli enti, soggetti istituzionali e scientifici che si sono variamente impegnati per rimediare alle cause che provocano il collasso di api e impollinatori.

Vai riconosciuta alla ricerca scientifica italiana – perché significativamente pubblica e non condizionata? - una notevole capacità di monitoraggio e d'indagine. Grazie anche all'insieme di ricerche italiane si sono affermate alcune semplici, ma determinanti, modalità di studio, quali: l'insensatezza della traslazione all'alveare della dose letale 50 manifestata dalle singole api; la distinzione fra mortalità invernali e in stagione attiva; l'impatto ambientale della contaminazione in epoca di semina con concianti sistemici; la considerazione della possibilità che sia: "la goccia prodotta dall'uomo che fa traboccare il vaso"; le variegata vie di esposizione "abituale" non considerate ecc...

Il CRT Unaapi ha quindi ritenuto indispensabile proporre una disamina dello stato delle conoscenze sui comprovati e possibili effetti dei pesticidi sulle api, per:

- Denunciare infondatezza e falsità delle assicurazioni sulla: "certa assenza di conseguenze".
  - Evidenziare quanti e quali sono gli aspetti non considerati rispetto ai possibili effetti dei pesticidi (puntuali o ancor peggio: cronici) su api, impollinatori e vivente.
  - Invitare apicoltori e cittadinanza tutta ad andare oltre la vaga lamentela, documentandosi adeguatamente.
- Ringrazio i ricercatori che hanno redatto tale imponente e istruttiva, complessa ma fruibile, rassegna. A quanti si misureranno con la lettura l'auspicio di far tesoro di tale mole di accertamenti scientifici...

Francesco Panella, 10 febbraio 2014

### Sommario

1	Introduzione	pag. 3
2	Modalità di esposizione delle api ai pesticidi	pag. 4
2.1	Esposizione delle api all'esterno dell'alveare	pag. 4
2.1.1	Contatto diretto ed indiretto con trattamenti spray	pag. 4
2.1.2	Contatto diretto ed indiretto con polveri contaminate	pag. 4
2.1.3	Ingestione di prodotti sistemici attraverso le gocce di guttazione	pag. 5
2.1.4	Ingestione di prodotti sistemici attraverso polline e nettare	pag. 5
2.2	Esposizione delle api all'interno dell'alveare	pag. 6
2.2.1	Ingestione di residui di principi attivi attraverso polline e nettare	pag. 6
2.2.2	Contatto con residui di principi attivi attraverso la cera	pag. 7
2.3	Esposizione delle api attraverso le acque di irrigazione contaminate	pag. 7
2.4	Esposizione ai metaboliti dei principi attivi	pag. 8
3	Effetti letali dei pesticidi nei confronti delle api	pag. 8
3.1	Effetti letali acuti in laboratorio	pag. 8
3.2	Effetti letali cronici in laboratorio	pag. 9
3.3	Effetti letali riscontrati in pieno campo	pag. 10
4	Effetti subletali dei pesticidi nei confronti delle api	pag. 11
4.1	Effetti cognitivi e comportamentali	pag. 11
4.2	Effetti sulla fisiologia	pag. 14
4.3	Ripercussioni di effetti subletali a livello della famiglia	pag. 15
5	Effetto combinato di più fattori di stress	pag. 16
5.1	Combinazioni di prodotti fitosanitari	pag. 16
5.2	Combinazione di patogeni e prodotti fitosanitari	pag. 17
5.3	Combinazione di prodotti fitosanitari ed altri fattori di stress	pag. 17
6	Conclusioni	pag. 18
7	Review of research on the adverse effects of pesticides on bees	pag. 20
8	Riferimenti bibliografici	pag. 23

# Sintesi delle ricerche sugli effetti indesiderati dei pesticidi nei confronti delle api\*

## 1. Introduzione

Gli effetti collaterali dei prodotti fitosanitari nei confronti delle api costituiscono materia di studio e di discussione da molto tempo; in Italia i primi tentativi di raccogliere segnalazioni sugli avvelenamenti in campo risalgono agli anni '80 e si riferiscono generalmente a intossicazioni dovute a trattamenti con clororganici, fosfororganici e carbammati [1, 2]. In vari Paesi europei sono in atto, da diversi anni, dei sistemi di segnalazione delle morie di api e degli spopolamenti degli alveari; in particolare la Germania, la Francia e l'Italia hanno organizzato sul proprio territorio anche reti di monitoraggio con stazioni fisse [3]. Questo sistema di raccolta di dati diffuso sul territorio ha permesso, tra le altre cose, di fornire dettagliate informazioni sugli effetti tossici di alcuni pesticidi, sulla probabilità che i fenomeni di intossicazione si verificano in un determinato periodo e sulla sintomatologia tipica degli avvelenamenti.

Gli episodi di mortalità delle api e/o spopolamento degli alveari, e le relative cause, possono essere ricondotti a due diversi periodi:

- nella stagione primaverile-estiva si verificano prevalentemente morie dovute ad intossicazioni acute in campo a causa di trattamenti fitosanitari effettuati sulle colture agricole, in momenti non idonei o senza il preventivo sfalcio delle fioriture spontanee. Tali episodi sono stati segnalati sia in concomitanza di trattamenti con sistemi spray sia in fertirrigazione o, come è stato messo in luce più recentemente, durante la semina di alcune colture estensive. Negli anni '90, infatti, in Europa sono state segnalate forti mortalità di api e spopolamenti di alveari imputabili all'utilizzo di sementi di mais conciate con insetticidi neonicotinoidi, le cui polveri si disperdono durante le operazioni di semina. Gli episodi di mortalità, segnalati in Francia a partire dal 1995 [4], sono stati in seguito registrati anche in altri Paesi europei come l'Italia [5].

- Il secondo periodo, in cui vengono frequentemente segnalate perdite di alveari, è l'autunno e l'uscita dell'inverno, in cui gli apiari possono essere interessati dalla cosiddetta "sindrome da spopolamento degli alveari". A partire dall'inverno 2006/2007, negli Stati Uniti, sulla base delle segnalazioni di molti apicoltori che avevano subito fortissimi spopolamenti e mortalità senza che si fossero osservati i sintomi classici dell'avvelenamento, è stata formulata la diagnosi di questo fenomeno "misterioso" della scomparsa delle api, già descritto negli anni in varie parti del mondo [6]. La sintomatologia ad esso associata è la seguente: l'assenza di api morte di fronte all'alveare, la presenza di pochissime api all'interno dell'arnia, la presenza di scorte e covata e la mancanza di sintomi palesi riconducibili a patologie. Successivamente, le segnalazioni di spopolamenti e mortalità di alveari si sono succedute in tutto il Nord America ed in Europa [7-10], acquisendo le caratteristiche di un fenomeno globale. Negli Stati Uniti, il collasso delle colonie di api è stato denominato CCD - *Colony Collapse Disorder*.

Le cause scatenanti del CCD (o della sindrome da spopolamento degli alveari, come viene definita in Europa) sono ancora in parte sconosciute, anche se una mole consistente di studi ha messo in luce una multifattorialità, nella quale diversi elementi contribuiscono all'indebolimento progressivo della colonia, fino al suo collasso. Le numerose patologie dell'alveare (varroasi, noseemias, virosi, ecc.), insieme alla contaminazione di pesticidi, a condizioni ambientali e climatiche sfavorevoli ed a pratiche apistiche molto stressanti per la colonia, come la transumanza (particolarmente negli USA per l'attività di impollinazione), sembrano costituire i maggiori fattori di rischio [11-15]. Attualmente, un intenso dibattito a livello europeo sta affrontando il tema della revisione della valutazione del ri-



Api morte in seguito ad un episodio di avvelenamento da pesticidi. (Foto: C. Porrini)

schio dei pesticidi. I metodi ufficiali proposti dall'OEPP (Organizzazione Europea per la Protezione delle Piante) [16] per la valutazione degli effetti indesiderati dei prodotti fitosanitari sulle api, non sembrano infatti adeguati ai prodotti di più recente introduzione e alle nuove vie di esposizione che la ricerca scientifica ha messo in luce. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) sta aggiornando le linee guida per la valutazione del rischio, con l'inserimento di nuovi metodi, in particolare quelli relativi agli effetti cronici e a quelli sulla covata.

Nell'ottica di un ulteriore contributo alla revisione della problematica relativa agli effetti dei pesticidi sulle api, in questo documento si sintetizzano i principali risultati della ricerca internazionale degli ultimi dieci anni su questa tematica.

---

## 2. Modalità di esposizione delle api ai pesticidi



Ape su un fiore di convulvolo. (Foto: T. Renzi)

Le vie attraverso le quali le api possono venire in contatto con i pesticidi, utilizzati per l'agricoltura, la cura del verde ornamentale, urbano e la salute pubblica (lotta alle zanzare), 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, granulata, liquida, ecc.). In questo capitolo distingueremo le fonti di contaminazione, interne o esterne all'alveare, cui le api possono essere esposte.

Questa classificazione è stata scelta per mettere in rilievo le relazioni tra le diverse vie di esposizione e le caratteristiche biologiche della società delle api che rendono questo insetto particolarmente vulnerabile.

### 2.1 Esposizione delle api all'esterno dell'alveare

#### 2.1.1 Contatto diretto ed indiretto con trattamenti spray

Le api bottinatrici, durante i voli di ricognizione e bottinamento, svolti numerose volte nell'arco di una giornata, possono trovarsi in un campo coltivato al momento di un trattamento fitosanitario ed essere quindi direttamente colpite dalla sostanza tossica. La problematica assume una notevole rilevanza se si prendono in considerazione anche le fioriture spontanee sottostanti la coltura principale e circostanti i campi che sono ugualmente interessate dai trattamenti per deriva del prodotto, anche a notevole distanza. Nonostante le corrette norme di utilizzo dei prodotti fitosanitari prevedano, almeno in Italia, l'interdizione del trattamento con prodotti pericolosi per le api (in particolare insetticidi ed acaricidi) durante le fioriture ed in condizioni meteorologiche sfavorevoli, oltretutto consigliare lo sfalcio di vegetazione spontanea presente nel campo, l'eventualità che questa forma di esposizione delle api si realizzi non può essere esclusa. In questo caso quindi, le api bottinatrici, sono esposte per contatto diretto ad un prodotto fitosanitario o, altrettanto frequentemente, ad una miscela di prodotti a diversa azione.

In ragione del tempo di persistenza caratteristico del prodotto, ed in base alle condizioni meteorologiche, delle quantità residuali del formulato possono rimanere sulla superficie delle piante e rappresentare quindi un'altra modalità di esposizione. In questo caso, poiché le api si trovano a contatto con una superficie precedentemente contaminata, si parla di contatto indiretto.

#### 2.1.2 Contatto diretto ed indiretto con polveri contaminate

L'utilizzo di sementi conciate rappresenta un'altra fonte importante di contaminazione della vegetazione spontanea, dei suoli e delle acque di falda con le molecole ad azione insetticida presenti nel trattamento al seme. Già nel 2003, in Italia, si era messo in evidenza il rischio legato alle polveri emesse dalle macchine seminatrici pneumatiche durante la semina del mais [17]. In seguito, a partire dal 2009, il progetto di ricerca finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali "ApeNet", si è occupato della valutazione dell'impatto delle semine del mais sulla salute delle api e degli alveari. Secondo le prove condotte nell'ambito di

questo progetto, le api bottinatrici possono essere esposte alle polveri per contatto diretto, nel momento in cui si trovino a sorvolare l'area in cui sta operando una macchina seminatrice [18] e per contatto indiretto, andando a bottinare sulla flora spontanea circostante il campo che, a seguito della deriva delle polveri, viene contaminata. Uno degli scopi del progetto è stato quello di determinare sperimentalmente la concentrazione dei principi attivi usati nella concia delle sementi, nelle polveri ricadute all'esterno di un campo di mais, durante la semina. Dai dati raccolti tra il 2009 ed il 2011 è emerso che i tre insetticidi neonicotinoidi clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e il fenilpirazolo fipronil, utilizzati nella concia, sono effettivamente presenti nelle polveri cadute a terra, in concentrazioni che vanno da 0,2 a 5,9  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  in base al principio attivo, alla distanza ed alla dimensione del campo [19, 20].

In Germania, sono stati condotti studi paralleli sulla tematica del rischio rappresentato da tecniche di semina del mais non adeguate a limitare la deriva dei prodotti [21].



Dispersione di polveri contaminate durante la semina di mais.  
(Foto: C. Porrini) - "Tratto da Carpana E., Lodesani M. (2014) Patologia e avversità dell'alveare. Springer-Verlag Italia, Milano"

### 2.1.3 Ingestione di prodotti sistemici attraverso le gocce di guttazione

Nel 2009, sempre nell'ambito del progetto ApeNet, è stata messa in evidenza un'altra possibile via di esposizione delle api in campo, a proposito dei prodotti utilizzati nella concia delle sementi di mais. Dal momento che gli insetticidi neonicotinoidi utilizzati nella concia sono dei prodotti a movimento sistemico, è possibile rintracciarne residui nelle gocce di guttazione\*\* emesse dalla pianta dopo l'emergenza. Le quantità massime di principi attivi ritrovate nelle gocce di guttazione di piante di mais in vaso vanno dai 100 mg/L per il clothianidin ed il thiamethoxam, fino ai 200 mg/L per l'imidacloprid. In entrambi i casi le concentrazioni analizzate sono potenzialmente molto tossiche per le api [22]. Successivamente, è stata valutata la presenza degli stessi prodotti nelle gocce di guttazione emesse dalla vegetazione spontanea circostante un campo di mais seminato, e la concentrazione di principi attivi contenuta non è sembrata in grado di spiegare delle forti mortalità [18]. Inoltre le osservazioni di campo non hanno rilevato la presenza di api su questa fonte di approvvigionamento idrico [19, 20, 23]. Sebbene l'esposizione alle gocce di guttazione non possa essere considerata di principale importanza, resta tuttavia una delle possibili modalità attraverso la quale le api possono essere intossicate. Inoltre, nonostante questa via di contaminazione sia stata messa in luce solo nel contesto dei trattamenti in concia, potrebbe risultare possibile anche nel caso di prodotti utilizzati in formulazioni granulari o spray. Recentemente, infatti, si è dimostrata la presenza di quantità di imidacloprid che vanno da 1,07  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fino a 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , nelle gocce di guttazione prelevate su melone trattato con formulazioni spray [24].

### 2.1.4 Ingestione di prodotti sistemici attraverso polline e nettare

Il carattere sistemico di molti prodotti fitosanitari, indipendentemente dal loro modo di applicazione, garantisce la protezione di tutti gli organi della pianta. Come conseguenza, gli insetti pronubi, tra cui le api, che si nutrono di polline e nettare, non sono protetti dalla loro azione.

La relazione tra trattamenti con prodotti sistemici e rischio di contaminazione del polline è da molto tempo oggetto di indagine, ma le conferme sperimentali più importanti sono state ottenute negli ultimi anni. Grazie all'evoluzione delle tecniche chimico-analitiche, infatti, è stato possibile verificare come molti principi attivi possano contaminare nettare e soprattutto polline a concentrazioni molto basse, dell'ordine di 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (=parti per miliardo=ppb).

Questo fenomeno è stato verificato sia per i trattamenti con formulati spray, che per i prodotti utilizzati nella concia delle sementi. Come esempio della prima categoria di utilizzo, uno studio condotto in Slovenia all'interno di meleti trattati secondo i disciplinari previsti, ha dimostrato la presenza degli insetticidi diazinon e thiacloprid e del fungicida difenoconazolo nelle pallottole di polline riportate all'alveare delle bottinatrici, 10 giorni dopo l'applicazione del prodotto in campo [25].

Gli insetticidi utilizzati nella concia delle sementi riescono, allo stesso modo, a contaminare la pianta dopo l'emergenza e a traslocare negli organi floreali in concentrazioni non trascurabili.

Nel 2003 è stato per la prima volta dimostrato che il polline di piante di girasole provenienti da semente concia

con imidacloprid (Gaucho®) conteneva, in media, 3 µg/kg di principio attivo [26]. Risultati simili sono stati ottenuti anche nel caso del mais trattato con lo stesso formulato; in quel caso la concentrazione di imidacloprid nel polline, in media, era di 2,1 µg/kg [27].

Più recentemente è stata provata anche la contaminazione del polline in seguito a trattamenti al terreno con neonicotinoidi. L'applicazione al suolo, in pre-semina o in post-trapianto (attraverso le acque d'irrigazione) su zucchini, ha determinato infatti la presenza di residui nel polline superiori ai 10 ppb per imidacloprid e thiamethoxam [28].

Una campagna condotta in Francia dal 2002 al 2005 su 125 famiglie di api e nella quale sono stati analizzati campioni di polline provenienti da trappole poste all'ingresso degli alveari, ha individuato nel 49% dei casi (81 campioni analizzati) la presenza di 1,2 µg/kg in media di imidacloprid e nel 44% dei casi di un suo metabolita, l'acido cloro-nicotinico. Il fipronil è stato rilevato nel 12% dei casi ad una concentrazione di 1,2 µg/kg, insieme ai suoi due metaboliti (fipronil sulfone e fipronil disulfonile). Nello stesso studio, è stata messa in evidenza la presenza di 7 fungicidi della classe dei triazoli nei campioni di polline analizzato, con concentrazioni da 12 a 38 µg/kg [29].

La problematica dei residui nel polline non può considerarsi però limitata ad un solo ciclo colturale. È stato infatti accertato che gli insetticidi ed i fungicidi presenti nella concia delle sementi possono contaminare il terreno ed hanno una persistenza abbastanza prolungata da venir adsorbiti anche dalla coltura in successione. Questo fenomeno fu verificato per la prima volta nel caso del girasole trattato con il conciante Gaucho®; l'imidacloprid, contenuto nel formulato commerciale, ha contaminato i campi trattati, determinando residui nel terreno di 12 µg/kg in media [26]. A distanza di un anno dal trattamento, l'imidacloprid è stato rintracciato anche in piante di girasole non trattate ma seminate sullo stesso terreno, in concentrazioni pari a 1,5 µg/kg negli organi floreali [26]. Il problema della persistenza nel terreno coinvolge anche le colture spontanee che si trovano ai bordi del campo trattato; è stato dimostrato, anche in questo caso, che si può verificare l'adsorbimento di principi attivi derivati da precedenti trattamenti della coltura principale. Ad esempio, campioni di tarassaco prelevati, durante il periodo delle semine, ai lati di un campo di mais in cui era stata utilizzata semente concia con clothianidin, hanno mostrato la presenza di 3,75 µg/kg di residui di questo prodotto. Questa contaminazione può essere spiegata come il risultato sia della deriva delle polveri durante la semina, sia della traslocazione del principio attivo dal suolo alla pianta [30].

Anche per questo motivo, sembra opportuno rivedere il concetto di rischio associato all'attrattività delle colture per le api; è necessario, infatti, tenere conto che per alcuni prodotti particolarmente persistenti, i residui di principio attivo o suoi metaboliti possono essere ritrovati a distanza di molto tempo e con condizioni diverse [31]. Il trattamento effettuato su una coltura non attrattiva dunque, potrebbe ugualmente costituire un rischio, se la coltura in successione fosse invece appetibile alle api. Occorre inoltre tenere presente che l'attrattività di una coltura può variare in ragione della disponibilità di altre fonti di cibo.

## **2.2 Esposizione delle api all'interno dell'alveare**

### **2.2.1 Ingestione di residui di prodotti attraverso polline e nettare**

Dal momento che le api bottinatrici in campo possono essere esposte ai trattamenti fitosanitari, il polline e il nettare raccolti e immagazzinati nei favi, possono contenere residui di prodotti, costituendo un'importante fonte di esposizione all'interno dell'alveare. Diversi studi di monitoraggio forniscono un quadro delle molecole chimiche che è possibile riscontrare nelle principali matrici apistiche.

Dopo il trasporto e la trasformazione operata dalle api, il polline stoccato (o pane d'api) può mostrare un alto contenuto di pesticidi; in un'indagine condotta su 350 campioni di pane d'api provenienti da apiari situati in Florida e in California, è stata documentata la presenza di ben 98 principi attivi, con un massimo di 31 composti trovati in un singolo campione. Gli acaricidi impiegati in apicoltura (soprattutto coumaphos e fluvalinate) sono la classe di utilizzo più rappresentata, seguita da 14 fungicidi sistemici, da 13 insetticidi piretroidi e da 4 neonicotinoidi [32]. Uno studio analogo, condotto in Spagna, dimostra come più del 40% dei campioni di pane d'api prelevati dai favi, risulti positivo alla presenza di almeno un principio attivo. Oltre agli acaricidi, il fipronil è stato rintracciato nel 3,7 % dei campioni [33]. In Germania, un monitoraggio triennale ha permesso il ritrovamento di 42 diversi principi attivi nel pane d'api, la cui presenza è stata correlata positivamente a coltivazioni estensive di colza [34].

Per quanto riguarda il nettare, gli studi a disposizione sono meno numerosi. La sua contaminazione è stata dimostrata nel girasole trattato con imidacloprid in concia (1,9 µg/kg) [26], nella zucca trattata con imidacloprid, dinotefuran e thiamethoxam, attraverso le acque di fertirrigazione (11,2; 9,2 e 9,5 µg/kg, rispettivamente) [35] e nello zucchini trattato con imidacloprid e thiamethoxam (11 e 10 µg/kg, rispettivamente) [28]. In generale, la concentrazione di residui in questa matrice risulta inferiore rispetto a quella riscontrata nel polline [26, 35].

L'esposizione per ingestione ai residui di pesticidi, è proporzionale al consumo in nettare e polline delle api. Per quanto riguarda il nettare, le api che svolgono delle attività particolarmente impegnative dal punto di vista energetico, richiedono un maggiore apporto di zuccheri; le api d'inverno e le api bottinatrici sono dunque le più importanti consumatrici di miele e nettare, rispettivamente [36]. Nei primi giorni della loro vita adulta, le api svolgono il ruolo di nutrici, si occupano cioè dell'alimentazione delle larve; l'alimentazione altamente proteica a base di polline, permette loro di secernere la pappa reale per le larve delle operaie (fino a tre giorni di età) e della regina (per tutta la vita) dalle ghiandole ipofaringee. Si è stimato che un'ape adulta può mangiare 65 mg di polline nei 10 giorni della sua vita in cui si occupa delle larve; le nutrici quindi sono le più grandi consumatrici di polline dell'alveare, seguite dalle larve [36, 37].

Anche in questo caso, l'ipotesi di contaminazione indiretta della covata era stata considerata già da molti decenni, a proposito dell'effetto degli IGR (*Insect Growth Regulators*, prodotti insetticidi che agiscono sui processi di sviluppo e metamorfosi degli insetti), dei carbammati e degli organo fosforici [38]. La possibilità di analizzare anche a livello di tracce i pesticidi nelle matrici apistiche con nuove tecniche analitiche, ha però permesso di valutare meglio e quantificare con più precisione questo fenomeno.

In un recente studio, la contaminazione della pappa reale è stata osservata in seguito a trattamenti con acaricidi nell'alveare; i principi attivi utilizzati (amitraz, fluvalinate) sono stati rintracciati sia a livello del capo delle api operaie sia nella pappa reale, dimostrando il passaggio dei residui tra individui attraverso la trofalassi e la successiva contaminazione della pappa reale secreta [39].

È dunque provato che anche le larve possono essere esposte a piccole concentrazioni di prodotti, ma ripetutamente nel tempo; le api nutrici alimentano infatti le larve esclusivamente con pappa reale per i primi tre giorni, con una frequenza di 100-200 volte al giorno [40]. In seguito, le larve di operaie vengono nutrite con una dieta a base di miele, polline ed acqua ancora per 3 giorni, i fuchi per 2,5 giorni, mentre le regine vengono alimentate con la pappa reale per tutto lo sviluppo larvale (5 giorni e mezzo) e tutta la vita adulta. Di conseguenza, le larve di regine e fuchi, sarebbero esposte, ipoteticamente, a quantitativi maggiori di residui.

## 2.2.2 Contatto con residui di principi attivi attraverso la cera

I favi risultano generalmente contaminati da una moltitudine di principi attivi, allo stesso modo del polline. Un'indagine statunitense condotta su 259 campioni di cera ha documentato la presenza di ben 87 principi attivi, tra cui 23 fungicidi e 11 erbicidi [32]. Tra gli insetticidi e gli acaricidi, le molecole più frequentemente ritrovate nella cera sono state piretroidi e fosfororganici utilizzati per il controllo dell'acaro parassita *Varroa destructor* (fluvalinate, coumaphos) [41]; quindi, in questo caso, la contaminazione avverrebbe direttamente nell'alveare. La presenza di insetticidi sistemici, tra cui neonicotinoidi, è stata ugualmente verificata [42]. Un'ipotesi proposta sulle modalità di contaminazione della cera da parte dei pesticidi usati in campo, è la cessione di queste sostanze dal nettare e dal polline, immagazzinati nelle cellette, alla cera; questo processo sarebbe tanto più efficace quanto più il materiale stoccato nelle cellette è ricco di acqua [41].

Le concentrazioni della maggior parte di principi attivi nella cera, come nel polline, è dell'ordine dei µg/kg, tuttavia alcune evidenze scientifiche dimostrano che quantità paragonabili sono in grado di provocare effetti subletali sulle api (vedi capitolo 4).

## 2.3 Esposizione delle api attraverso le acque di irrigazione contaminate

Oltre a raccogliere scorte di cibo, le api bottinatrici durante i loro voli si riforniscono di acqua, utile, oltre che per abbeverarsi, anche a diversi altri scopi all'interno della colonia, come la termoregolazione dell'alveare nella stagione più calda.

In seguito a segnalazioni di morie di api avvenute in prossimità di appezzamenti di melone, è stata condotta un'indagine parallela al Nord e al Sud Italia, per valutare la possibile esposizione delle api ai prodotti fitosanitari (thiamethoxam e imidacloprid) disciolti nelle acque degli impianti di irrigazione a goccia, impiegati nella coltura del melone. Un aumento della mortalità è stato rilevato nel giorno successivo al trattamento e 4 giorni dopo nella stazione trattata con thiamethoxam [43].



Api che si abbeverano dalla manichetta per la fertirrigazione. (Foto: C. Porrini)

## 2.4 Esposizione ai metaboliti dei principi attivi

Nel trasporto sistemico di alcuni principi attivi all'interno della pianta, le molecole originarie vengono metabolizzate dal sistema di detossificazione e degradate in altri composti. Un fenomeno simile ha luogo anche all'interno del corpo delle api che vengano in contatto con il composto madre. In alcuni casi, come per l'acetamiprid, le molecole prodotte dalla degradazione non sono in grado di esprimere tossicità. Per altri principi attivi, invece, i metaboliti possono avere proprietà tossiche paragonabili o superiori a quelle della molecola madre.

La tossicità espressa per ingestione dall'olefina, metabolita dell'imidacloprid, è risultata 2 volte superiore rispetto a quella della molecola originaria, somministrata con la stessa modalità [44]. Il 5-idrossi-imidacloprid, altro metabolita dell'imidacloprid, oltre alla tossicità acuta (pari ad 1/5 di quella del composto madre), ha anche dimostrato un effetto sulla capacità di apprendimento olfattivo, ad una dose di 120 ppb, somministrata in maniera cronica e per ingestione [45].

Nell'ambito della classe dei neonicotinoidi, troviamo un altro composto, il thiamethoxam, che, una volta metabolizzato, dà origine al suo metabolita clothianidin. Quest'ultimo esprime una tossicità maggiore del composto madre, tanto che il suo uso in agricoltura come insetticida è diventato paragonabile se non superiore a quello del thiamethoxam. Secondo i dati messi a disposizione dalla Commissione Europea, il clothianidin è più tossico del suo composto madre per ingestione, mentre risulta meno nocivo per contatto diretto [46].

Come i composti originari, inoltre, questi metaboliti sono in grado di raggiungere in modo sistemico tutti gli organi della pianta trattata. Infatti, la presenza di questi composti nei tessuti vegetali (es. foglie di girasole trattato con imidacloprid) [47], nel polline [32] e nelle api esposte al composto madre [48, 49] è stata dimostrata sperimentalmente.

---

## 3. Effetti letali dei pesticidi nei confronti delle api

Il primo parametro che viene preso in considerazione per valutare la pericolosità degli agrofarmaci verso le api è la mortalità. La capacità di un prodotto di indurre effetti letali è dipendente dalla sua tossicità e dalla dose (o concentrazione) alla quale viene somministrato; tuttavia questi due parametri non sono sufficienti per poter prevederne l'effetto tossico. Almeno altri due fattori vanno presi in considerazione: la modalità di esposizione (contatto diretto, contatto indiretto, ingestione) e la durata dell'esposizione (acuta o cronica).

### 3.1 Effetti letali acuti in laboratorio

I test obbligatori condotti attualmente per poter registrare l'uso di un prodotto fitosanitario e valutarne la tossicità nei confronti delle api, fanno riferimento esclusivamente alla  $DL_{50}^{***}$  [50, 51]. Questa rappresenta una misura della tossicità acuta di un prodotto, cioè quella che, per convenzione, si manifesta entro le 48 ore dalla sua somministrazione; questo valore è quindi specifico per ogni principio attivo e variabile a seconda del tipo di esposizione (contatto o ingestione).

Nell'ambito dei prodotti fitosanitari, i fungicidi e gli erbicidi hanno generalmente una  $DL_{50}$  più alta rispetto agli insetticidi, perché presentano una minore tossicità acuta nei confronti delle api, anche se vi sono alcune eccezioni,



Allevamento di api adulte in laboratorio per la valutazione della tossicità acuta e cronica dei pesticidi.  
(Foto: T. Renzi)

come per esempio alcuni erbicidi (es. 2,4 D [52]) e fungicidi (es. propiconazole [53]) che risultano tossici per le api (vedi il capitolo 5 per gli effetti sinergici tra insetticidi e fungicidi). La tossicità dei principi attivi ad azione insetticida di uso più comune in agricoltura, è andata crescendo nel tempo. In particolare, i neonicotinoidi, introdotti sul mercato negli anni '90, nella maggior parte dei casi presentano una DL<sub>50</sub> molto bassa. Questi prodotti possiedono inoltre delle caratteristiche di tossicità particolari non ancora del tutto chiarite, che rendono complesso prevederne gli effetti, anche in termini di mortalità acuta.

Normalmente gli insetticidi appartenenti a questo gruppo risultano più tossici per ingestione piuttosto che per contatto diretto, al contrario, ad esempio, dei piretroidi o dei fosfororganici [54]. All'interno della classe dei neonicotinoidi esistono due gruppi con caratteristiche tossicologiche distinte: i composti nitro-sostituiti e i composti ciano-sostituiti. I primi (es. imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin) hanno una tossicità fino a 1000 volte superiore rispetto ai secondi (es. acetamiprid e thiacloprid) [55].

La tossicità acuta provocata dall'imidacloprid è caratterizzata da un'alta variabilità di risposte: la DL<sub>50</sub> orale, valutata da diversi autori, va da 3,7 a 60-90 ng/ape [44, 45, 55, 56]. Analogamente, la tossicità per contatto è associata a valori di DL<sub>50</sub> che vanno da 18 a 100 ng/ape [47, 55]. Questa marcata variabilità è stata spiegata da alcuni autori con la differente sensibilità delle api ai trattamenti, col variare dell'età, della stagione e di altre condizioni esterne [46]. In particolare, il genotipo sembra giocare un ruolo importante nella diversa risposta all'esposizione ai pesticidi. Nel caso dell'imidacloprid, ad esempio, api di sottospecie diverse hanno dimostrato una differente sensibilità all'azione di questo pesticida, anche se gli autori concordano nel considerare che questo fattore non possa spiegare in maniera esaustiva la grande variabilità di risposte osservate [54, 57]. Le differenze di sensibilità legate al genotipo possono evidenziarsi anche tra diverse colonie, all'interno della stessa sottospecie, rendendo molto complicata la determinazione di soglie di tossicità che abbiano valore universale [46, 54, 57].

Il thiamethoxam ed il proprio metabolita clothianidin, anch'esso usato come principio attivo in molti formulati, presentano una tossicità acuta simile a quella dell'imidacloprid; per contatto, la DL<sub>50</sub> calcolata a 24 ore corrisponde a 21 ng e 29 ng ape, rispettivamente [55], mentre per ingestione 2,8 e 4,6 ng per ape sono sufficienti per uccidere il 50% degli individui [56].

Nel caso di queste due molecole, è stata presa in considerazione anche l'esposizione per contatto indiretto (vedi 2.1.2) con formulazioni liquide e polverulente. La sperimentazione è stata realizzata coprendo il fondo di gabbiette con foglie trattate e lasciando le api libere di camminarvi all'interno. Trattando le foglie con diverse concentrazioni di clothianidin, è stato possibile stabilire la CL<sub>50</sub> a 4,4 ng/μL [56]. Con un metodo simile è stata valutata la tossicità acuta in laboratorio della quantità di polveri ricadute a terra ad una distanza di 5 m dal bordo del campo di mais seminato sperimentalmente con semente concia con clothianidin. Un quantitativo di 36 ng per gabbietta ha provocato una mortalità finale maggiore del 50%. La polvere contaminata dispersa dalla seminatrice ha quindi mostrato una tossicità paragonabile a quella di un formulato liquido impiegato alla stessa concentrazione [20, 58].

Al contrario dell'imidacloprid, il fipronil, appartenente alla famiglia dei fenilpirazoli ha una DL<sub>50</sub> meno soggetta a variazioni. Tuttavia, analogamente ai principi attivi neonicotinoidi, l'effetto sulla mortalità a breve termine provocato da dosi molto basse, si è rivelato significativo. Dosi subletali (0,1 e 1 ng/ape), sia per contatto sia per ingestione, hanno infatti causato una mortalità superiore al controllo dopo 48 ore dal trattamento [59].

### 3.2 Effetti letali cronici in laboratorio

L'intossicazione acuta delle api rappresenta uno scenario realistico ma non corrisponde alla situazione più frequente, soprattutto dopo l'introduzione di principi attivi sistemici che a causa del loro elevato potere tossico verso l'organismo target (ma non solo), vengono utilizzati a dosi molto ridotte. L'intossicazione di tipo cronico è dovuta ad un'esposizione ripetuta nel tempo a basse dosi, spesso subletali, che si verifica sia in campo, sia all'interno dell'alveare. Infatti la presenza di quantitativi residuali di molti prodotti è dimostrata in entrambi i casi (vedi capitolo 2). La maggior parte degli studi condotti sulla tossicità cronica degli agrofarmaci si riferisce a piretroidi, neonicotinoidi e fenilpirazoli e viene realizzata alimentando le api con soluzioni zuccherine contaminate. Il meccanismo attraverso cui quantitativi minimi di un prodotto tossico riescano a provocare un effetto dilazionato nel tempo, non è stato ancora completamente chiarito.

Uno dei possibili fenomeni da considerare è quello dell'accumulo del principio attivo nell'organismo. Nel caso di molecole lipofile, come la deltametrina e tutti i piretroidi, questa ipotesi sembra particolarmente plausibile. In laboratorio è stato dimostrato come la deltametrina, in concentrazioni pari a 15 e 30 parti per miliardo (ppb), sia in grado di determinare dopo 40 giorni di trattamento, la morte di più dell'80% delle api [60].

Lo stesso effetto tossico differito nel tempo è stato riscontrato per i neonicotinoidi. Se prolungata fino a 60 giorni, l'alimentazione con 4 e 8 ppb di imidacloprid può causare infatti un forte aumento della mortalità intorno al 30esimo giorno, per arrivare al massimo effetto (100%) dopo 45 giorni [60]. In questo caso, però, l'accumulo di

imidacloprid nei tessuti rappresenta un'ipotesi meno probabile; per questi prodotti si suppone, invece, una diversa suscettibilità delle api in funzione della loro età.

Un'altra particolarità dell'esposizione cronica riscontrata nei piretroidi e in alcuni neonicotinoidi, è la relazione negativa che lega la dose e la mortalità provocata, per cui a dosi più alte non corrisponde necessariamente una mortalità finale maggiore. L'imidacloprid, se somministrato cronicamente in concentrazioni riscontrabili nel polline (1 e 10 ppb) attraverso una soluzione zuccherina, è in grado di provocare una mortalità del 50% dopo 8 giorni [44]. Nel medesimo studio è stato dimostrato che, per raggiungere un effetto comparabile, in modalità acuta, è necessaria una dose fino a 6000 volte superiore della stessa sostanza.

Acetamiprid e thiacloprid, al contrario, non mostrano lo stesso comportamento. L'acetamiprid, ad esempio, se somministrato in dosi subletali (0,1 e 1 µg/ape) per 11 giorni, sia per ingestione, che per contatto, non provoca un aumento della mortalità rispetto ad api non trattate [61].

I fenilpirazoli presentano caratteristiche simili a quelle dei neonicotinoidi nitro-sostituiti, e sono in grado di provocare effetti significativi sulla mortalità in seguito a trattamenti ripetuti. L'alimentazione con fipronil, a diverse dosi corrispondenti ad 1/20 fino ad 1/80 della DL<sub>50</sub> per ingestione, se ripetuta per 11 giorni, ha infatti comportato un aumento significativo della mortalità delle api, fino al 91% per la dose più alta [62]; il medesimo risultato è stato confermato anche utilizzando una dose equivalente ad 1/60 della DL<sub>50</sub> [61].

### 3.3 Effetti letali riscontrati in pieno campo

L'utilizzo di sementi conciate con insetticidi neonicotinoidi è stato indicato come possibile causa di mortalità di api durante la stagione primaverile, in concomitanza con la semina del mais [17, 63-66]. Indagando questa ipotesi, diversi Paesi europei (Italia compresa) hanno condotto ricerche riproducendo la semina in condizioni di campo, e seguendo la mortalità e lo sviluppo delle famiglie di api posizionate nelle vicinanze. Nel 2010, uno studio sull'effetto della concia con thiamethoxam ha mostrato una mortalità più alta nelle famiglie maggiormente esposte alla deriva delle polveri, perché vicine al campo di mais seminato [67].

Il volo condizionato di api al di sopra del campo di mais durante la semina e l'osservazione successiva di api catturate durante la prova, ha confermato il potenziale effetto letale del contatto diretto con le polveri contaminate da imidacloprid e clothianidin. Le quantità di principio attivo ritrovate nel corpo delle api sono risultate maggiori della DL<sub>50</sub> calcolata in laboratorio. L'effetto letale è stato tuttavia verificato, in un momento successivo all'esposizione, solo in condizioni di alta umidità; le ragioni di questa differenza di tossicità non sono state ancora chiarite [18, 68].

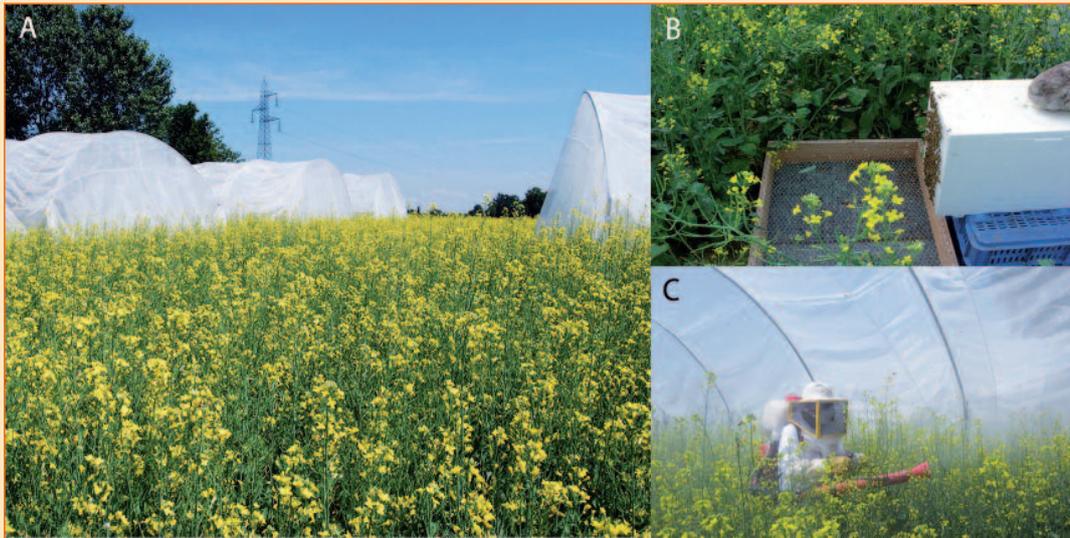
Il rischio associato alle semine è stato dimostrato anche in semicampo, utilizzando le quantità di polveri contaminate ricadute all'esterno di un campo di mais seminato, determinate in precedenti prove sperimentali [58]. Il momento della semina del mais è dunque uno dei periodi, nel corso dell'anno, in cui le famiglie di api sono più a rischio di avvelenamento.

Gli studi sulla tossicità a lungo termine di questi prodotti in campo hanno spesso prodotto risultati contraddittori. Nel caso delle sementi conciate con clothianidin e imidacloprid (colza e girasole rispettivamente), ad esempio, non sono stati riscontrati effetti a lungo termine sulla sopravvivenza delle famiglie [69, 70]. Al contrario, due ipotesi sono state portate a sostegno del ruolo dell'intossicazione cronica con neonicotinoidi, nell'eziologia del *Colony Collapse Disorder* (CCD). L'esposizione prolungata per 13 settimane a diverse concentrazioni di imidacloprid (0,1-400 ppb) disciolto in uno sciroppo zuccherino derivato dal mais (HFCS) e fornito agli alveari come alimento di sostituzione



Postazione sperimentale con alveari provvisti di gabbie underbasket, per la valutazione della mortalità. (Foto: F. Sgolastra)

durante l'inverno, ha provocato il collasso del 94% degli alveari trattati, con sintomi simili a quelli del CCD [71]. Più recentemente uno studio ha ipotizzato che l'induzione dello stress ossidativo provocato, a livello cellulare, dall'esposizione ai neonicotinoidi, possa essere messo in relazione con i marcati effetti che si possono evidenziare a livello cognitivo (es. danni all'apprendimento olfattivo e visivo) [72]. Questi effetti deleteri sul comportamento porterebbero, in determinate condizioni, come proposto anche da altri studi, al collasso delle colonie [73].



Valutazione degli effetti di pesticidi in semicampo. Tunnel in campo di colza in fiore (A); Trattamento con il prodotto da saggiare (B); nucleo con gabbia underbasket (C) (Foto: T. Renzi)

## 4. Effetti subletali dei pesticidi nei confronti delle api

Gli effetti causati dall'esposizione ad un prodotto tossico che non comportano la morte dell'individuo, vengono definiti come subletali. Le dosi in grado di provocare tali effetti sono, per definizione, sempre inferiori alla  $DL_{50}$  e, per convenzione, inferiori ad un decimo di essa [74].

Le ricerche condotte finora su quest'argomento hanno considerato gli effetti sul singolo individuo e per lo più in condizioni di laboratorio o, in qualche caso, di semicampo. I sintomi estremamente eterogenei, riscontrabili nelle api, possono essere catalogati considerando gli effetti di disturbo del comportamento e quelli invece di perturbazione di altre funzionalità fisiologiche come la fertilità e la termoregolazione.

### 4.1 Effetti cognitivi e comportamentali

Questo genere di effetti subletali provoca delle alterazioni nelle capacità cognitive indotte dall'esposizione ad uno specifico contaminante. I prodotti fitosanitari che comportano effetti a carico del comportamento sono essenzialmente quelli che esprimono un'azione principale di tipo neurotossico [75].

#### Apprendimento e memoria olfattivi

Il metodo che ha permesso lo sviluppo degli studi intorno agli effetti sull'apprendimento e la memoria olfattivi è il P.E.R. (*Proboscis Extension Reflex*, riflesso dell'estensione della ligula). Il test si basa sulla presentazione di un odore (stimolo condizionato) alle api, in concomitanza con una soluzione zuccherina (stimolo incondizionato) con la quale vengono stimolate le antenne; in risposta allo zucchero, l'ape estroflette la ligula e riceve quindi una ricompensa. In questo modo l'ape associa l'odore con la ricompensa e, quando si troverà di nuovo ad "annusare" l'odore appreso, estrofletterà la ligula in attesa della ricompensa [76]. La durata di questa memoria olfattiva può persistere anche per diversi giorni. Grazie a questo metodo, è stato possibile indagare tre differenti processi cognitivi: l'abituazione ad uno stimolo, l'apprendimento di un odore e la memoria a breve, medio e lungo termine. Il potenziale tossico di alcuni insetticidi ad attività neurotrofa può esplicitarsi in ognuna di queste fasi ed in particolare gli insetticidi neonicotinoidi sono stati oggetto di studio in questo campo [77].

L'imidacloprid, anche nel caso degli effetti sulla memoria, è stato il primo principio attivo ad essere studiato; somministrato per contatto in dosi comprese tra 0,1 e 20 ng/ape, ha dimostrato la capacità di modificare il tempo (aumentandolo o diminuendolo) necessario ad un'ape adulta per reagire allo stimolo odoroso del cibo [78, 79]. Allo stesso modo, l'ingestione di una soluzione contaminata con concentrazioni subletali di imidacloprid, in condizioni di semicampo, ha diminuito la capacità delle api di associare uno stimolo odoroso ad una ricompensa [80, 81]. Un risultato simile è stato dimostrato anche attraverso un'altra via di esposizione all'imidacloprid, cioè il contatto indiretto con polveri contaminate. Una quantità infinitesimale (0,004  $\mu\text{g}$ /gabbietta di 57,2  $\text{cm}^2$ ) di questa polvere ha infatti provocato effetti sulla capacità di memorizzare l'associazione odore-ricompensa sia a breve sia a medio e lungo termine. Sempre nell'ambito della stessa ricerca, il principio attivo clothianidin (0,003  $\mu\text{g}$ /gabbietta) ha mostrato effetti comparabili con quelli dell'imidacloprid [81].

Anche il thiamethoxam, per contatto diretto con 0,1 e 1 ng/ape in condizioni di laboratorio, ha provocato un calo della capacità delle api di apprendere gli odori e di memorizzare le informazioni apprese [61].



Valutazione di effetti subletali in laboratorio; condizionamento di un'ape bottinatrice in preparazione al test P.E.R.  
(Foto: B. Maccagnani)

Analogamente l'acetamiprid, a dosi subletali e per ingestione ( $0,1 \mu\text{g}/\text{ape}$ ), ha dimostrato di inibire la memoria a lungo termine legata a stimoli odorosi [82]. L'interpretazione di questi risultati è interessante anche alla luce del fatto che, nella maggior parte degli studi, gli odori usati come stimoli sono sostanze comuni nella vita delle api come il citronellolo o il linalolo, componenti naturali dell'aroma dei fiori o come la miscela di molecole emessa dalla ghiandola di Nasonov nelle api operaie. La minore reattività a questo genere di stimoli in un'ape bottinatrice, ad esempio, potrebbe andare a danneggiare la capacità di rintracciare le fonti di cibo migliori. L'effetto deleterio del clothianidin sull'apprendimento e la memoria delle api, è stato inoltre dimostrato anche nel caso in cui l'odore proposto era rappresentato dal feromone reale, un altro componente essen-

ziale della vita e dell'aggregazione della famiglia di api [20].

Le sperimentazioni condotte con il principio attivo fipronil, hanno ugualmente dimostrato un marcato effetto deleterio sulla capacità di apprendimento e sulla durata della memoria olfattiva. Dopo una singola somministrazione per ingestione ad una dose 10 volte inferiore alla  $DL_{50}$ , il fipronil ha provocato disfunzioni di apprendimento e di memoria [83]. Un risultato simile è stato ottenuto per contatto con una dose pari a  $0,5 \text{ ng}/\text{ape}$ , che ha provocato una riduzione della capacità di discriminare gli odori e quindi di reagire con un comportamento adeguato allo stimolo [59]. L'ingestione cronica per 11 giorni di una dose pari ad  $1/40$  della  $DL_{50}$ , ha dato origine ad una diminuzione sia del riflesso di riposta al cibo, sia delle performances di apprendimento [62].

### **Apprendimento e memoria visivi**

Ulteriori aspetti cognitivi che sono stati indagati in relazione alla tossicità degli insetticidi neonicotinoidi, sono l'apprendimento spaziale e la memoria visiva legata ai colori. Sappiamo che le capacità visive delle api sono essenziali nell'orientamento in volo, non solo per individuare le fonti di cibo in campo, ma anche, ad esempio, per ritrovare il percorso verso l'alveare. Il condizionamento di api per mezzo di un labirinto a due bracci, all'interno di ciascuno dei quali si trovava un pannello colorato associato o meno ad una ricompensa (soluzione zuccherina), è stato utilizzato come strumento della valutazione dell'apprendimento visivo. In questo caso, l'imidacloprid ed il clothianidin, somministrati per ingestione a dosi corrispondenti ad  $1/10$  ed  $1/100$  della  $DL_{50}$  rispettivamente, hanno mostrato effetti sulla memoria sia a breve termine, ovvero dopo 1 ora dal trattamento, sia a lungo termine, cioè a 24 ore dal trattamento. Il thiamethoxam ed il fipronil ( $1/100$  ed  $1/5$  della  $DL_{50}$ , rispettivamente) hanno ugualmente provocato effetti sulla memoria a lungo termine [20].

Oltre che perturbare la memoria visiva, è stato recentemente dimostrato che l'imidacloprid può agire negativamente su altri due aspetti fondamentali per l'attività di bottinamento, quali la sensibilità verso un alimento zuccherino e la capacità di comunicare alle compagne la posizione della fonte di cibo. Dosi subletali di imidacloprid ( $0,21$  e  $2,16 \text{ ng}/\text{ape}$ ) somministrate per ingestione, hanno infatti determinato un comportamento "esigente" da parte delle api, che hanno preferito nutrirsi con soluzioni zuccherine più concentrate, rispetto alle api testimone. In secondo luogo, le bottinatrici trattate hanno mostrato un numero significativamente inferiore di "danze", con le quali abitualmente le api si scambiano le informazioni necessarie per raggiungere una fonte di cibo in campo [84].

### **Orientamento e attività di bottinamento**

L'apprendimento olfattivo e spaziale sono processi fondamentali se si pensa all'attività di volo che le api svolgono ogni giorno. Sebbene gli studi a riguardo tengano distinti gli effetti che si esplicano strettamente sull'attività di bottinamento da quelli che danneggiano le capacità di orientamento [75], i due aspetti fanno parte della stessa problematica e possono essere qui considerati unitamente. Le prime ipotesi riguardo l'effetto dei prodotti fitosanitari sulla capacità delle api bottinatrici di trovare la via dell'alveare, sono state formulate in seguito ad un'intossicazione subletale di permotrina [85] e deltametrina in condizioni controllate e su distanze molto ridotte. La deltametrina, in particolare, se somministrata per contatto a dosi fino a 25 volte inferiori alla

DL<sub>50</sub>, provoca l'incapacità nell'81% delle api bottinatrici di ritornare, entro un tempo stabilito, al nido posto a soli 8 m dall'alimentatore. Con l'osservazione del volo delle api, si è notata una tendenza a volare verso il sole senza però riuscire a dirigersi nella giusta direzione per rientrare all'alveare [86]. Gli effetti della cipermetrina, un altro insetticida piretroide, in condizioni di semicampo sono stati dimostrati in seguito all'alimentazione per 5 mesi con sciroppo addizionato a 12,5 µg/L di principio attivo. Le famiglie così alimentate hanno mostrato un'attività di bottinamento fortemente ridotta [87].

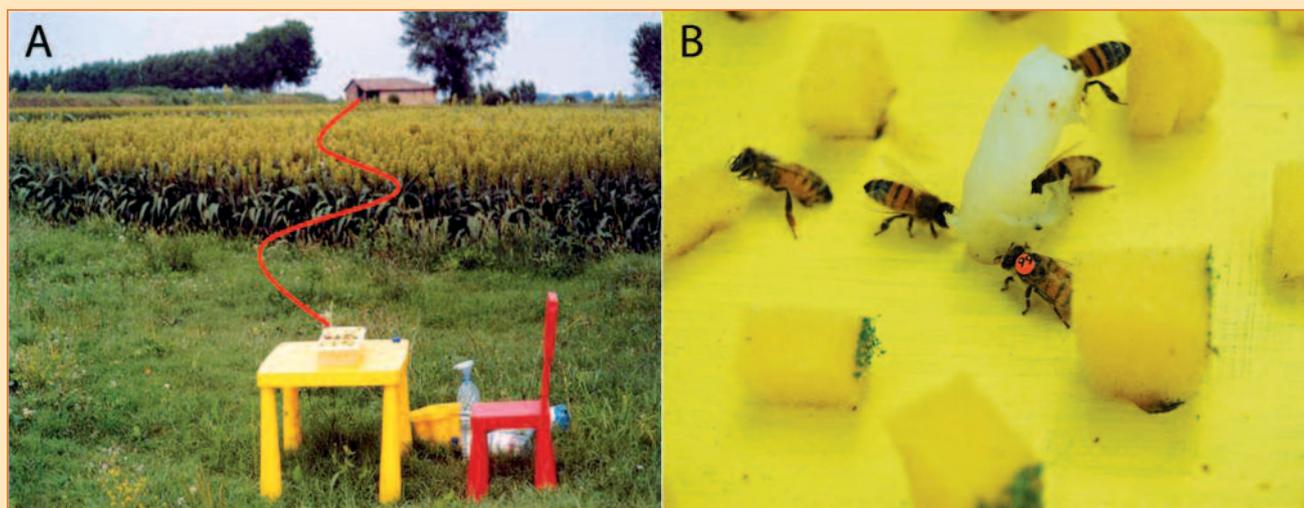
A partire dal 2000, le sperimentazioni sugli effetti subletali, anche in questo settore di studio, hanno interessato quasi esclusivamente gli insetticidi neonicotinoidi. Il particolare meccanismo d'azione di questi prodotti, infatti, determina effetti nocivi più marcati a livello cognitivo, rispetto a quelli provocati dai piretroidi o da altri insetticidi, come i fosfororganici [88].

L'imidacloprid e il fipronil, diluiti in concentrazioni di 6 e 2 ppb rispettivamente in una soluzione zuccherina, hanno provocato la riduzione dell'attività di volo e di bottinamento di famiglie di api mantenute sotto tunnel [89]. In condizioni di campo, coerentemente con questi risultati, una soluzione zuccherina contenente 100 ppb di imidacloprid ha ritardato il tempo di ritorno al nido delle api trattate. In questo caso l'alveare era stato posto ad una distanza di 500 m dall'alimentatore, e la presenza delle api nei due punti (alveare ed alimentatore) è stata controllata nelle 5 ore successive al trattamento e il giorno seguente ad esso. I risultati di questo studio hanno quindi dimostrato per la prima volta, nel caso dei neonicotinoidi, un effetto sulla capacità di orientamento in un ambiente complesso come quello di un paesaggio agricolo [90].

Ultimamente, la tecnologia dell'RFID (*Radio Frequency Identification*, identificazione a radio frequenza), ha permesso uno studio più approfondito delle performances di orientamento di api bottinatrici in seguito al trattamento con neonicotinoidi. Grazie a questi piccoli dispositivi elettronici montati sul torace delle api e riconosciuti da un lettore posto all'ingresso dell'alveare, è stato possibile controllare singolarmente i tempi di volo delle bottinatrici marcate oltre a stimare, con maggiore precisione, quante delle api sottoposte a trattamento risultavano effettivamente disperse [91].

L'ingestione di 0,3 ng/ape di fipronil (corrispondenti ad 1/20 della DL<sub>50</sub>), è stata correlata alla riduzione del numero di voli effettuati da ogni ape ed all'aumento del tempo di volo per il ritorno all'alveare. Questo duplice effetto è stato interpretato alla luce del complesso meccanismo d'azione del fipronil: la riduzione del numero di voli sarebbe dovuta ad un effetto neuromuscolare, che ostacola la coordinazione necessaria al volo, mentre l'aumento del tempo di ritorno sarebbe da attribuire all'azione neurotossica che compromette le capacità di orientamento [91]. Allo stesso modo, il trattamento per contatto con una dose subletale di fipronil (0,01 ng/ape) si è dimostrato deleterio nei confronti delle api bottinatrici, che restavano a lungo immobili prima di spiccare il volo [61].

In maniera molto simile, l'ingestione di imidacloprid ( $\geq 1,5$  ng/ape) e clothianidin ( $\geq 0,5$  ng/ape), ha provocato una diminuzione dei voli di bottinamento in campo [92], mentre concentrazioni maggiori di 50 ppb di imidacloprid hanno determinato un aumento dell'intervallo di tempo tra due successivi ritorni all'alveare [93]. Anche il thiamethoxam, in dose più alta (1,34 ng/ape), ha determinato una difficoltà per le api trattate e rilasciate di ritornare all'alveare in tempi paragonabili con quelli di api non trattate [73].



Valutazione degli effetti di pesticidi sull'orientamento in campo.  
Traiettoria tra l'alveare e l'alimentatore (A) Ape marcata all'alimentatore (B)  
(Foto: L. Bortolotti - T. Renzi)

## 4.2 Effetti sulla fisiologia

### Termoregolazione

La capacità di mantenere la temperatura corporea entro un intervallo ottimale è di primaria importanza per tutti gli organismi; in aggiunta ad un sistema di regolazione individuale, le api hanno anche bisogno di controllare la temperatura interna all'alveare, in modo che questa rimanga intorno a valori idonei per il corretto sviluppo della covata (35°C). A questo scopo, la contrazione tetanica dei muscoli del volo ed il successivo contatto ripetuto del torace con gli opercoli delle cellette, permette alle api operaie di riscaldare la zona di covata [94]. Inoltre, dei complessi meccanismi di regolazione vengono messi in atto durante la stagione invernale all'interno del glomere in modo che la temperatura non scenda mai eccessivamente [95]. Gli studi disponibili in letteratura relativi agli effetti deleteri dei prodotti fitosanitari sulla capacità di termoregolazione delle api, si limitano ad alcuni lavori riguardanti soprattutto i piretroidi. Per la deltametrina, è stato dimostrato come questa induca una forte ipotermia in singole api trattate per contatto con dosi subletali (2,5 e 4,5 ng/ape). A questo proposito, è stato ipotizzato che l'azione a livello cerebrale della deltametrina e di altri piretroidi sia il principale meccanismo attraverso cui questi prodotti ostacolano la contrazione tetanica dei muscoli delle ali per produrre calore. A conferma di questa ipotesi, è stato visto che le api trattate con deltametrina non avevano ripercussioni sulla capacità di muovere le ali per volare, ma presentavano problemi nell'orientarsi in volo [86]. Questo effetto è ancora più rilevante, se si considera che, normalmente, i piretroidi esprimono una tossicità maggiore a basse temperature. Inoltre la somministrazione combinata di deltametrina e del fungicida prochloraz, induce un effetto sinergico sulla capacità di termoregolazione, aggravando così i problemi di ipotermia [96].

### Fertilità e fecondità

Anche per quanto riguarda i possibili effetti deleteri di pesticidi sulla fertilità e fecondità dell'ape regina, le ricerche condotte, soprattutto recentemente, sono poco numerose, lasciando dunque spazio a futuri studi riguardanti questo aspetto centrale della fisiologia dell'alveare. I principali disturbi a livello subletale sulle regine sono stati riscontrati in seguito a trattamenti acaricidi contro la *Varroa* con il coumaphos ed il fluvalinate. Questi due prodotti hanno infatti mostrato la capacità di interferire nel corretto sviluppo morfologico delle regine, provocando una diminuzione di peso nelle larve e comportamenti anomali dopo lo sfarfallamento [97, 98]. A basse concentrazioni (100 ppm) il coumaphos ha inoltre dimostrato un effetto deleterio sull'accettazione delle regine trattate ed in seguito trasferite in alveari testimone [97].

Analizzando più specificamente l'azione sulla fisiologia riproduttiva, due piretroidi (bifentrina e deltametrina), aggiunti nell'alimentazione di famiglie di api per 20 giorni ad una concentrazione pari al 5% della CL<sub>50</sub>, hanno indotto una diminuzione del numero di uova deposte. Una percentuale inferiore di schiusura delle uova e di opercolazione delle cellette è stata inoltre verificata, nello stesso studio, per la deltametrina [99].

Per quanto concerne i neonicotinoidi, è stato osservato che l'imidacloprid, a dosi subletali, riduce la fecondità nei bombi. L'effetto potrebbe però essere dovuto, almeno in parte, anche all'azione di repellenza dell'imidacloprid evidenziata nella sperimentazione, che ha indotto i bombi ad una alimentazione non adeguata [100].

### Sviluppo larvale

Dal momento che anche la covata può essere esposta all'azione dei contaminanti ambientali, sia per contatto, attraverso la cera, sia per ingestione, principalmente attraverso il polline fresco e stoccato (pane d'api), è necessario che la valutazione del rischio dei pesticidi sulle larve venga presa in considerazione.

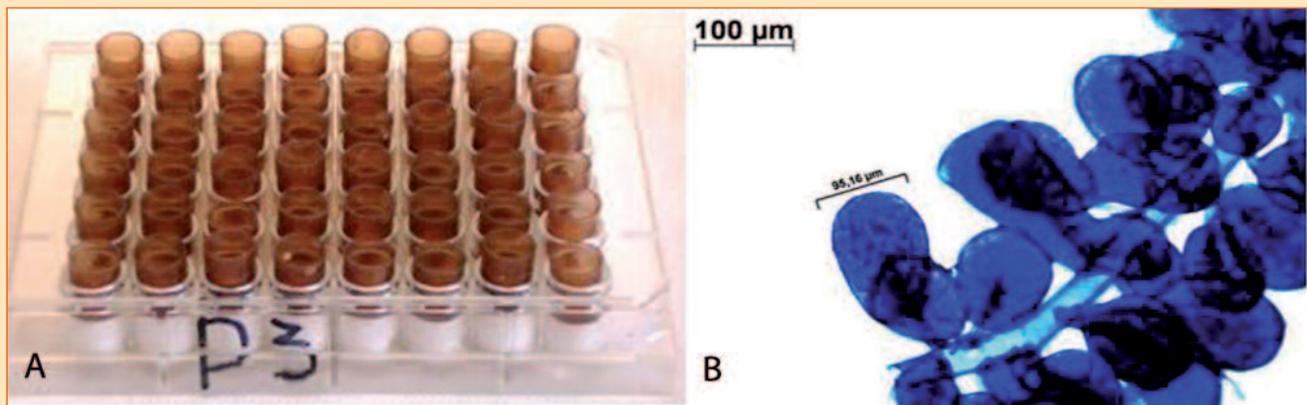
Un metodo di allevamento *in vitro* delle api, sviluppato e proposto nel 2005 da un'équipe di ricerca francese [101], è diventato il protocollo più comune per questo tipo di valutazione. Attraverso questo metodo, è stato possibile individuare la DL<sub>50</sub> larvale per il dimetoato ed il fenoxycarb [102].

Più recentemente uno studio ha dimostrato come dalle larve, allevate su favi con un ampio numero di residui di pesticidi nella cera, si sviluppino api adulte con una longevità ed una percentuale di sopravvivenza inferiori rispetto ad altre allevate su favi nuovi.

Inoltre lo sfarfallamento dai favi contaminati, è risultato ritardato [42]. Va sottolineato come un allungamento della fase preimmaginale delle api, costituisca un fattore favorevole per lo sviluppo e l'accoppiamento delle femmine di *Varroa* presenti nel fondo delle cellette di covata [42].

### Altri effetti sulla fisiologia

L'ingestione di concentrazioni subletali di imidacloprid (0,5 ppb) ha provocato nelle api, dopo 72 ore dal trattamento, la riduzione del diametro degli acini delle ghiandole ipofaringee [103], il cui sviluppo nelle nutrici è funzionale per la secrezione di pappa reale necessaria al nutrimento delle larve e delle regine. Recentemente, è stato osservato un effetto analogo in seguito all'ingestione ripetuta per 14 giorni di concentrazioni subletali di imidacloprid (2 ppb e 3 ppb) [104]. L'effetto inibitorio sullo sviluppo di questi organi può dunque causare un passaggio prematuro dal ruolo di nutrici ad altre funzioni all'interno della famiglia, con possibili ripercussioni sull'allevamento



Valutazione degli effetti subletali di pesticidi in laboratorio. Allevamento in vitro per la valutazione della tossicità di fitofarmaci su larve e pupe (A); Ghiandole ipofaringeeali di ape adulta (B) (Foto: P. Medrzycki - N. Gasol)

della covata [103]. Inoltre, in seguito all'esposizione delle api nutrici, è stata dimostrata la presenza di residui di pesticidi nella pappa reale, confermando dunque l'ipotesi che la covata possa essere contaminata attraverso l'alimentazione [39]. Ulteriori osservazioni sono state effettuate a livello istologico. In api trattate con basse concentrazioni croniche di fipronil (1 ppb), sono state descritte modificazioni cellulari a livello dell'epitelio intestinale, legate allo stress ossidativo probabilmente indotto dal pesticida [105].

Nell'ambito delle ricerche sugli effetti verso le api dopo l'esposizione ai pesticidi, è stato anche intrapreso uno studio per valutare le variazioni dell'attività di alcuni enzimi. In particolare, 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 di thiamethoxam e thiacloprid [106, 107].

Le tecniche istologiche, biochimiche ed immunologiche, risultano quindi interessanti per studiare gli effetti subletali dei pesticidi verso le api, ad un livello di organizzazione biologica diverso rispetto ai parametri classici presi in considerazione per la valutazione della tossicità. Questi metodi permettono di dimostrare l'azione a livello subindividuale che potrebbero ripercuotersi anche sull'individuo e sulla famiglia.

### 4.3 Ripercussioni di effetti subletali a livello della famiglia

Gli effetti subletali descritti colpiscono funzioni ed aspetti centrali nella vita sociale delle api. Per questo motivo è necessario considerare che il rischio costituito dall'esposizione ai pesticidi, per lo più a bassissime dosi, non si limita alle conseguenze sulle singole api, ma può compromettere anche gli equilibri interni all'alveare.

Numerosi lavori scientifici hanno dimostrato che, in diverse condizioni sperimentali, gli insetticidi neonicotinoidi possono interferire sull'orientamento e quindi sull'attività di bottinamento [73, 90, 92, 93]. In uno di essi, oltre a verificare l'effetto deleterio del thiamethoxam in dose subletale (1,34 ng/ape) sulla capacità di orientamento, è stato valutato, attraverso l'uso di un modello, il possibile impatto a livello della famiglia con una previsione a lungo termine. I parametri considerati sono stati la percentuale di api bottinatrici esposte alla sostanza tossica e la fertilità della regina, cioè la quantità giornaliera di uova deposte. L'esposizione del 90% delle api bottinatrici per tre mesi al nettare di colza contaminato con thiamethoxam (in alcuni Paesi europei, il thiamethoxam è usato nella concia della semente di colza), o un moderato tasso di ovideposizione della regina (1600 uova/giorno, valore più basso utilizzato nello studio), non sarebbero sufficienti, singolarmente, a provocare il collasso della famiglia. Tuttavia, la compresenza di questi due fattori determina, secondo il modello, una drastica diminuzione del numero di api, fin sotto la soglia delle 5000, predisponendo l'alveare al collasso [73]. Sebbene si tratti di una previsione su basi statistiche, questa è supportata da dati sperimentali riguardo gli effetti sull'orientamento delle bottinatrici e sulla fertilità delle regine, a livello individuale. L'intossicazione e la perdita di bottinatrici potrebbero avere ripercussioni negative anche sulla covata. Se infatti il loro numero dovesse subire una diminuzione, le api più giovani abbandonerebbero più rapidamente il loro compito di nutrici per andare alla ricerca di cibo; di conseguenza la covata potrebbe subire un calo della temperatura di allevamento ed, in questo modo, essere indirettamente colpita. Uno studio recente sull'effetto congiunto di imidacloprid e lambda-cialotrina verso i bombi, ha messo in evidenza come questo abbia un'azione negativa sulla capacità individuale di bottinare in maniera efficiente con forti ripercussioni sulla colonia. I bombi trattati con entrambi i prodotti eseguono infatti un numero minore di voli di bottinamento, raccogliendo meno polline rispetto a quelli non trattati. Questo determina, a livello della famiglia, un cambiamento nella struttura dei ruoli: le operaie si dedicano al bottinamento, abbandonando la cura della covata. Lo sviluppo ridotto di quest'ultima, insieme alla diminuzione di operaie, predispone quindi la colonia al

collasso [108]. Queste evidenze, dimostrate per i bombi, potrebbero essere verificate anche per le api, in cui l'organizzazione sociale più complessa potrebbe far emergere altri effetti negativi.

Un ulteriore aspetto che potrebbe verosimilmente avere ripercussioni sulla famiglia, è l'influenza di alcuni pesticidi sulla capacità di comunicazione attraverso la danza, come dimostrato nel caso di dosi subletali di imidacloprid [84].

Alcuni autori hanno messo in luce un'interessante considerazione, derivata dall'osservazione dei gruppi di api con i quali, in laboratorio, si conducono gli esperimenti di tossicità. È stato notato come la probabilità di sopravvivenza di ogni singola ape non può considerarsi indipendente dalla mortalità del gruppo di individui in cui è inserita [60]. A livello di alveare questa osservazione non è mai stata dimostrata sperimentalmente, ma è ragionevole ipotizzare che lo stesso meccanismo possa ripetersi; quindi, gli effetti deleteri che derivano dalla contaminazione con prodotti fitosanitari, potrebbero ripercuotersi anche sugli individui per i quali questa esposizione non si sia verificata.

---

## 5. Effetto combinato di più fattori di stress

Alla base della mortalità delle api e dello spopolamento degli alveari vi sono più fattori, e molte delle sperimentazioni condotte nell'ultimo decennio sono state impostate per mettere in luce le varie cause che entrano in gioco in questo fenomeno, e la quota-parte di ognuna nelle diverse situazioni.

### 5.1 Combinazioni di prodotti fitosanitari

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 essere esposte a differenti prodotti. Un'altra via di esposizione si realizza attraverso i residui rintracciabili nei prodotti raccolti dalle api, soprattutto in polline e nettare (vedi capitolo 2). Come evidenziato dai molti studi di monitoraggio sui residui di fitofarmaci nelle matrici apistiche [32, 109], all'interno dell'alveare le api vengono in contatto con una moltitudine di prodotti, i quali possono produrre effetti sinergici. Oltre ai principi attivi, anche le sostanze utilizzate come co-formulanti potrebbero, da sole o in sinergia con la sostanza attiva, avere un effetto deleterio sulla salute delle api. In nessuna ricerca, però, è stata presa in considerazione la presenza residuale di queste sostanze, per valutarne l'azione sulle api. Inoltre, nonostante lo studio degli effetti delle combinazioni di pesticidi sia di grande interesse per comprendere il rischio rappresentato dalle pratiche agricole verso le api, uno scarso numero di ricerche si è concentrato su questa tematica, limitandosi principalmente sulle interazioni tra una classe di fungicidi ed alcuni insetticidi.

L'azione sinergica tra la deltametrina ed il fungicida imidazolico prochloraz, è stata verificata sulle api adulte sia per quanto riguarda la mortalità [110], sia per gli effetti subletali come la capacità di termoregolazione [96]. L'aumento di tossicità sarebbe provocato da un'interazione a livello biochimico, grazie alla quale i fungicidi azolici sono in grado di ostacolare la detossificazione dei piretroidi, rendendo quindi le api più suscettibili all'azione di questi comuni insetticidi. In condizioni di semicampo questi risultati sono stati confermati, presentando però anche un'altra interpretazione del fenomeno. Secondo questa infatti, il fungicida prochloraz sarebbe in grado di ridurre l'effetto repellente della deltametrina, aumentando quindi il rischio di esposizione al piretroide [111]. Nel caso dei neonicotinoidi, la combinazione con altri principi attivi è prevista in molte formulazioni commerciali; tra i prodotti spray troviamo infatti associazioni tra neonicotinoidi e piretroidi (deltametrina e cipermetrina prevalentemente), mentre tra le formulazioni utilizzate nella concia di sementi, la combinazione tra insetticida e fungicida è molto diffusa. Allo stesso modo di quanto dimostrato per i piretroidi, anche l'associazione tra i neonicotinoidi e i fungicidi azolici presenta un carattere sinergico negativo 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  $DL_{50}$  del thiacloprid è risultata di 500 volte più bassa in corrispondenza del trattamento combinato con il propiconazolo. Questo tipo di sinergia si verifica soprattutto con i neonicotinoidi di tipo "ciano-sostituito", che esprimono una tossicità individuale molto inferiore rispetto agli altri; nel caso dell'imidacloprid, infatti, l'effetto sinergico con i fungicidi menzionati è risultato molto limitato [55].

Il piperonil-butossido (PBO) è un sinergizzante utilizzato anche come inibitore di resistenza; il suo effetto è stato verificato in combinazione con molti principi attivi. Ad esempio, l'associazione con imidacloprid permette di ottenere un effetto su popolazioni di aleurodidi (*Bemisia tabaci*) resistenti al neonicotinoide [112], così come un trattamento combinato con thiamethoxam permette di superare la resistenza sviluppata da popolazioni di

ortotteri (*Nilaparvata lugens*) [113]. Le api non fanno eccezione a questo meccanismo ed in una sperimentazione il PBO è risultato la causa dell'aumento di tossicità del thiacloprid di 150 volte [55]. In campo la combinazione tra PBO ed altri insetticidi, come i piretroidi, è regolarmente usata in agricoltura, in particolare nel vigneto per la lotta alla cicalina della vite (*Scaphoideus titanus*). Sebbene non ci siano studi che abbiano indagato gli effetti di questo tipo di combinazione sulle api, è importante sottolineare il rischio che tali trattamenti, ammessi anche in agricoltura biologica, potrebbero comportare.

Altre associazioni di molecole, il cui effetto non è ancora stato indagato in apicoltura, vengono tuttavia già impiegate come presidi medico-chirurgici. In particolare, la combinazione tra fipronil ed amitraz, entrambi insetticidi ad azione acaricida, è già stata dimostrata più efficace rispetto all'applicazione dei singoli prodotti separatamente nel controllo di parassiti dei mammiferi [114]. Considerando che l'amitraz è un principio attivo già largamente utilizzato per il controllo della *Varroa*, e dato che il fipronil può essere presente in forma di residui nel polline e nella cera, il carattere sinergico di questa associazione potrebbe risultare rilevante nel contesto dell'alveare.

## 5.2 Combinazione di patogeni e prodotti fitosanitari

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, soprattutto negli Stati Uniti [115, 116]. Tuttavia, negli ultimi anni, sono state condotte numerose indagini sulla combinazione tra condizioni di salute dell'alveare e sensibilità ad eventuali intossicazioni, mettendo in luce come la concomitanza di patogeni e pesticidi possa costituire una chiave di lettura più realistica del fenomeno degli spopolamenti. Uno dei primi studi che ha aperto questo filone di ricerca, ha indagato gli effetti della compresenza di *Nosema ceranae* ed imidacloprid, in concentrazioni subletali ma comunque rintracciabili nel polline. L'interazione cronica tra questi due fattori ha provocato, in condizioni di laboratorio, effetti sinergici negativi sulla mortalità delle api. Tale dato è anche supportato da conferme a livello biochimico, in cui si sono potute osservare delle conseguenze debilitanti sul sistema immunitario individuale e della famiglia [117]. In seguito a questa prima indagine, molte altre hanno confermato gli stessi risultati, combinando il *Nosema* con altri insetticidi, quali il fipronil ed il thiacloprid. Anche in questo caso, api infettate con *Nosema* e trattate in laboratorio con concentrazioni subletali di questi insetticidi (1 ppb e 5,1 ppm rispettivamente), hanno mostrato una mortalità superiore a quella provocata singolarmente dal patogeno e dal pesticida. Il fipronil, in particolare, ha provocato la morte del 90% degli individui, nel giro di 20 giorni, in api precedentemente infettate con *N. ceranae* [107, 118]. Parallelamente l'esposizione a dosi sub letali (20 ppb) di imidacloprid sensibilizza le api nei confronti dell'infezione con *Nosema*. Infatti, la covata allevata in famiglie esposte all'imidacloprid, ha dato origine ad adulti più suscettibili all'infezione con *Nosema*. In particolare, si è dimostrato come le spore del patogeno siano in grado di replicarsi più velocemente in api esposte indirettamente all'imidacloprid durante lo stadio larvale [119].

La parassitizzazione da parte dell'acaro *Varroa destructor* costituisce il problema più importante a carico degli alveari. La sua pericolosità è anche correlata alla capacità di trasmettere numerose virosi che contribuiscono ad acutizzare i problemi a carico dell'alveare. In alcune recenti ricerche si è potuto dimostrare il ruolo della *Varroa* nell'aumentare la virulenza del DWV, deprimendo il sistema immunitario delle singole api e della colonia, incrementando di conseguenza il rischio di collasso per l'alveare [120-122]. È stato inoltre provato che quantità subletali di clothianidin inducono la proliferazione del virus delle ali deformate (DWV) e inibiscono le vie di trasduzione del segnale intracellulare che portano alla risposta antivirale in altri organismi. Ad oggi, questo risulta essere il primo studio che correla positivamente l'effetto di un pesticida con un agente patogeno virale delle api [81].

## 5.3 Combinazione di prodotti fitosanitari ed altri fattori di stress

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 agrofarmaci ed agire in modo sinergico.

La temperatura di allevamento delle larve nelle cellette, è mantenuta costante (34-35°C) dal lavoro di termoregolazione operato dalle api adulte. L'importanza della temperatura uniforme e costante per la covata, risiede nel fatto che anche differenze di un grado centigrado compromettono il corretto sviluppo larvale e pupale e la sopravvivenza delle api dopo lo sfarfallamento [123]. Il trattamento con l'insetticida fosfororganico dimetoato induce risposte diverse, con la temperatura di allevamento, a seconda dello stadio di sviluppo dell'insetto. Le larve che erano state allevate a 33°C (condizioni subottimali) hanno infatti mostrato una minore sensibilità (DL<sub>50</sub> alta) al trattamento con dimetoato, contrariamente agli adulti che sono risultati più sensibili. Questi ultimi hanno presentato inoltre un tasso di sopravvivenza inferiore rispetto al controllo, mantenuto invece a 34,5°C [124].

Il regime alimentare delle api si basa strettamente su polline e nettare; il fabbisogno in proteine e zuccheri è quindi soddisfatto da queste due risorse. Ma in condizioni di scarsa presenza di specie botaniche con un alto

potere nutrizionale, la dieta delle api potrebbe subire un notevole impoverimento. Il cambiamento delle condizioni climatiche globali [125] e l'impoverimento del paesaggio agricolo con lo sviluppo delle monocolture, potrebbero avere una forte influenza su questi fattori, limitando la varietà florale e pollinica a disposizione delle api. La qualità del polline, valutata come contenuto proteico, è un parametro molto variabile (dal 2,5% al 61% di contenuto in proteine grezze) a seconda della specie. Al contrario del miele, il polline non viene conservato a lungo nell'alveare, ma è consumato in fretta, soprattutto in relazione alle esigenze della covata. Se le risorse polliniche sono insufficienti, infatti, si può assistere alla mancata schiusa delle uova, alla riduzione dell'estensione della covata, e anche al cannibalismo delle larve [126]. La qualità pollinica è stata messa spesso in relazione con lo stato di salute delle api e più in particolare con la longevità degli adulti e con lo sviluppo della covata. In condizioni di laboratorio, è stato verificato che l'alimentazione con polline proveniente da un ambiente naturale è preferibile rispetto a quella con polline raccolto in zone agricole perché più ricco di proteine. In particolare, le api nutrite con una dieta povera in proteine, hanno mostrato una mortalità maggiore e una sensibilità più alta all'intossicazione con fipronil [127]. I fiori di mais, in contesti agricoli monocolturali o in condizioni di scarsità di fioriture, possono essere intensamente visitati dalle api. Il valore nutrizionale del polline di mais è ritenuto basso, in particolare per la carenza di un aminoacido essenziale (istidina) e, probabilmente, di altre sostanze come vitamine, sali minerali o steroli [128]. Infatti, famiglie di api mantenute in gabbie di volo ed alimentate solamente con polline di mais, hanno allevato meno covata rispetto a quelle nutrite con un mix pollinico ed hanno inoltre mostrato una ridotta sopravvivenza delle api neosfarfallate [128]. Un'alimentazione basata su pollini multiflorali, inoltre, confrontata con pollini monoflorali di alto valore nutritivo, provoca un aumento marcato dell'enzima Glucosio-ossidasi, che esprime proprietà antisettiche e viene utilizzato dalle api per sterilizzare il cibo, in particolare la pappa reale ed il miele [129]. Si deduce quindi che la disponibilità di varietà pollinica sia di grande valore per l'alimentazione delle famiglie. Sebbene gli studi pubblicati sino ad oggi sull'argomento della sinergia dieta-agrofarmaci non siano numerosi, il potenziale impatto del regime alimentare sull'indebolimento della colonia e quindi sulla suscettibilità a contaminanti chimici sembra poter giocare un ruolo importante nella salute globale dell'alveare.



Mais: Ape bottinatrice su infiorescenza di mais. (Foto: F. Sgolastra)

## 6. 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, con esiti letali o subletali, costituiscono un importante elemento di rischio [14]. L'esposizione ai pesticidi, insieme alle patologie, ai parassiti, alle pratiche apistiche ed alle condizioni nutrizionali e climatiche contribuiscono, in proporzioni differenti, a causare l'indebolimento o il successivo collasso di un alveare. L'importanza relativa di ciascun fattore non è fissa, ma estremamente variabile in funzione del luogo, della stagione, delle condizioni meteo-ambientali, del tipo di apicoltura condotta, ecc. Nel complesso problema delle interazioni tra pesticidi e patogeni risulta difficile stabilire quale dei due fattori rappresenti l'agente scatenante. In questo caso bisognerebbe cercare di minimizzare la presenza della variabile direttamente gestita dall'uomo e cioè i pesticidi. L'insorgenza di patologie, infatti, dipende anche da numerosi altri fattori. La valutazione del rischio dei pesticidi in laboratorio (primo gradino dello schema del *risk assessment*) è un passaggio chiave per comprendere i meccanismi della tossicità e valutare i rischi in un cosiddetto "*worst case scenario*" (condizione di massimo rischio). Lo svolgimento delle prove di semicampo e di campo (gradini successivi del *risk assessment*) è invece previsto per le condizioni di

maggior realismo e per una valutazione che tenga conto del livello effettivo di esposizione delle api. Il problema dell'armonizzazione dei diversi livelli del *risk assessment* è diventato urgente soprattutto dopo l'immissione sul mercato degli insetticidi neonicotinoidi. Molte delle ricerche condotte in campo, infatti, non hanno confermato le conseguenze letali e subletali causate in laboratorio da basse dosi di questi pesticidi [69, 130-132]. Questa discrepanza di risultati ha alimentato il dibattito sull'effettiva pericolosità ambientale dei prodotti neonicotinoidi [133], soprattutto dopo la recente decisione delle Istituzioni Europee di sospendere per due anni l'utilizzo di

imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin in concia e in prefioritura sulle colture considerate attrattive per le api in pieno campo.

Nel caso di questi tre principi attivi, l'EFSA ha recentemente condotto un lavoro esteso di valutazione del rischio nei confronti delle api [134-136] nel quale si ribadisce come, a livello di semicampo e di campo, non ci siano sufficienti dati a supporto di una tossicità rilevante dei pesticidi verso la famiglia di api. A questo proposito, è importante considerare che, per evidenziare gli effetti subletali sull'intero organismo alveare, le prove devono essere condotte in campo e sul lungo periodo. Considerando l'estesa area di volo delle api, è però quasi impossibile prescindere dall'influenza di numerosi altri fattori che possono condizionare lo svolgimento della sperimentazione. In pratica queste condizioni limitanti, non consentono di valutare gli effetti subletali dei prodotti fitosanitari verso le api tramite le prove classiche di campo, se non ricorrendo all'utilizzo di modelli [73]. In determinati ambienti agricoli, infatti, l'elevata contaminazione da pesticidi, sia all'esterno che all'interno dell'alveare [32] espone le api ad 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. Come descritto per le prove di laboratorio, il genotipo delle api può giocare un ruolo sostanziale nella sensibilità ad un pesticida; questo avviene non solo nel caso del confronto tra le varie sottospecie di api [54, 57], ma anche tra diverse famiglie della stessa sottospecie [46].

Altrettanta variabilità può essere determinata dalle condizioni sanitarie delle colonie, soprattutto nel caso di infezioni asintomatiche o latenti e dall'andamento della temperatura. Entrambi questi fattori sono stati infatti studiati in concomitanza con l'esposizione ai pesticidi, dimostrando una rilevante interazione [117, 124].

Nelle prove di laboratorio, il numero elevato di ripetizioni che è possibile effettuare consente di controllare le variabili sperimentali. Le prove di campo sono invece caratterizzate da un'influenza maggiore dei numerosi fattori di variabilità, e dalla difficoltà di realizzare un numero adeguato di ripetizioni. Questo si traduce in una minore potenza statistica, per cui è possibile rilevare un effetto significativo solo quando la differenza tra i trattamenti sia molto consistente [137]. La difficoltà di controllare i fattori ambientali, riduce anche la riproducibilità delle prove nel tempo e nello spazio. Ad esempio, le osservazioni fatte in un appezzamento al momento della sperimentazione potrebbero non essere rappresentative della reale esposizione delle api, dal momento che queste possono bottinare un'area molto vasta, comprendente diversi ambienti colturali [138].

La valutazione degli effetti dei pesticidi a livello della famiglia, inoltre, deve tenere presente la capacità di resilienza dell'alveare. La colonia va considerata, infatti, non come la somma degli individui ma come un superorganismo [139] coordinato da un'intricata rete di relazioni tra individui e con un'alta capacità di far fronte alle perturbazioni esterne. Gli eventuali effetti che potrebbero essere osservati sul lungo periodo possono quindi non essere evidenti nel corso di una sperimentazione. Tuttavia, anche alla luce della difficoltà di appurare l'azione di un pesticida in condizioni di campo, le evidenze fornite dalle attività di monitoraggio, come le numerose segnalazioni di morie e spopolamenti, dovrebbero essere prese in considerazione nel processo di valutazione del rischio post-registrazione (agrofarmaco-sorveglianza).

In conclusione, la vasta produzione scientifica e le numerose evidenze che dimostrano la pericolosità di molti pesticidi nei confronti delle api, richiedono una particolare attenzione nel processo di registrazione ed utilizzo di questi prodotti, tenendo presente che gli effetti riscontrati sulle api possono interessare anche altri impollinatori ed insetti utili, con un notevole impatto sull'agroecosistema.



Teoria del vaso traboccante. Diverse cause più o meno gravi (dimensione della goccia), sia ambientali sia apistiche, agiscono simultaneamente sulla famiglia di api facendola collassare. Basta che manchi una singola causa anche non grave, cioè una piccola goccia, per non fare traboccare il vaso (quarto caso). (Disegno di C. Porrini) - "Tratto da Carpana E., Lodesani M. (2014) *Patologia e avversità dell'alveare*. Springer-Verlag Italia, Milano"

## 7. Adverse effects of pesticides on bees: a review\*

### Introduction

Occurrences of death and poisoning of bees in correlation with the use of pesticides have been noted since the 1980s [1]. More recently the establishment of multi-year monitoring networks in various countries has made it possible to identify two main periods of the year during which these events are concentrated. In the spring-summer season deaths occur mainly due to acute poisoning in the field, in connection with treatments involving sprayed products or coated seeds [2; 5]. The second critical period occurs in autumn and at the end of winter, when entire bee colonies can be affected by a depopulation syndrome (first observed in the U.S. and called Colony Collapse Disorder). The causes of this disorder, which has become a global problem [7-10], are not yet clear, even though the synergy of many factors (pesticides, pathologies, intensive beekeeping practices, weather conditions, etc.) seems to be the most likely key for understanding this phenomenon [11-15].

### Exposure of bees to pesticides

Bees are particularly prone to exposure to contamination from pesticides used in agriculture, especially due to their capability of foraging on a vast area, up to 6 km from the hive, and also due to the establishment of highly organized colonies in which any contamination can have more complex negative side effects than with non-social insects. Forager bees' exposure can occur directly by contact with the treatments applied in the field. Contamination can also occur at a considerable distance from the treated field, due to the drift effect caused by weather conditions that are not optimal for the treatment. Indirect contact with active ingredient residues on vegetation represents another way in which the forager bees can be exposed in the field. The risk of exposure can be further increased depending on the persistency of the active ingredient molecule.

In various crops, seed-treatment with insecticides, especially neonicotinoids, can result in a risk of exposure comparable to that of sprayed products [58]. The abrasion of the coated seeds in the seeder's hopper produces a dust that can be dispersed during sowing, creating a cloud that is deadly for bees in flight [18] or, upon being deposited on the surrounding vegetation, creates another route of exposure, poisoning the bees at a later time [17; 58].

Many pesticides' property of being able to be transferred systemically to every part of the plant, opened the possibility of other exposure scenarios, which have since been experimentally verified.

In fact, forager bees search for sources of food, especially nectar, pollen, honeydew, and water, which are contaminated with systemic molecules in many cases.

When considering the products used for seed-dressing of maize, their transfer into the guttation droplets has been verified, with concentrations that are theoretically able to cause toxic effects in adult bees [22]. However, this source of water did not attract forager bees, therefore it was not possible to confirm the importance of this mode of exposure [23].

Nevertheless, for other crops such as melons and rapeseed, it has been shown that guttation droplets are visited by bees [24].

However, the contamination of pollen and nectar should be considered the main modality of exposure of forager bees in the field. The presence of the active ingredients used for the treatment of crops in pollen has been verified in a considerable number of cases, such as: spray treatments of orchards [25], treatments involving seed-dressing in maize and sunflower [26; 27] or soil treatments of zucchinis [28].

The high persistency in the ground of molecules such as imidacloprid, which is used to dress seeds, can also result in the adsorption and transfer even to the pollen, in plants that are untreated but that are grown on contaminated soil, even after many months [27; 30].

The large amount of residues in the pollen and the nectar causes a significant exposure risk even inside the hive, for the in-hive worker bees as well as for the larvae, the drones, and the queen. In fact, numerous studies have pointed out the large diversity of active ingredients that can be found by chemically analyzing the hive's main components: fresh pollen, stored pollen (or bee bread), and wax. The pesticides that are most frequently found are miticides, followed by fungicides and insecticides of every chemical class [29; 32-34].

Therefore, the risk of exposure inside the hive is mainly correlated with the amount of pollen ingested. For this reason it is estimated that the nurse bees, that take care of the brood, are the most exposed. Since nurse bees produce the food that is reserved for the larvae, the latter are equally exposed to the risk of ingesting or coming into contact with pesticide residues [36]. Similarly, also the drones and the queen can be contaminated through their food, even though there are fewer studies on these two castes than on worker bees, due to the difficulties of conducting experiments.

## ABSTRACT

During the systemic transfer of some active ingredients within the plant, the original molecules are metabolized by the detoxification system and degraded into other compounds. A similar phenomenon also takes place within the bodies of the bees that come into contact with the original compound. In some cases, such as for thiamethoxam, the metabolites could be more toxic than the original compound [46]. The metabolites are able to reach systemically all the tissues of the treated plant and thereby contaminate sources of nutrition that are important for bees [47; 32].

### Effects of pesticides on bees

The obligatory tests that are currently conducted to evaluate toxicity for bees consider exclusively just one parameter, DL<sub>50</sub> (or CL<sub>50</sub>), as the measurement of a product's acute toxicity [50; 51]. Within the group of pesticides, fungicides and herbicides possess a higher DL<sub>50</sub> than do insecticides, indicating lower acute toxicity for bees, even though there are some exceptions. Moreover, for certain neonicotinoid insecticides, the acute toxicity is highly influenced by other factors and is difficult to evaluate in an unequivocal manner [46].

Due to the risk of bees' repeated exposure to contaminated components, the chronic toxicity is one of the most interesting parameters to study. In fact, many pesticides, especially pyrethroid and neonicotinoid insecticides, result in significant and delayed mortality following repeated administration of very low doses [44; 60; 61]. Therefore, amounts of insecticide that are considered sublethal can actually result in high levels of mortality. These characteristics, which have been demonstrated under laboratory conditions, have been partially confirmed in semi-field and field studies, especially due to the difficulty of limiting the effect of other factors under natural conditions.

Those effects that do not result in the death of the individual, which are defined as sublethal effects, include various dysfunctions which can affect bees at the cognitive and behavioural level and impair several important physiological functions.

Forager bees' ability to learn and memorize olfactory stimuli can be compromised by a single or repeated exposure to very low concentrations of pyrethroid and neonicotinoid insecticides. Especially imidacloprid, both by contact and by ingestion, is able to modify the amount of time necessary for a bee to recognize food odour stimuli [78; 79] and to reduce the percentage of recognition of previously learned odours, both in the medium and the long term [80; 81]. These effects have been verified even in the case of exposure to contaminated dust from dressed seeds and for other neonicotinoid active ingredients [81].

The interpretation of these results is interesting especially since the odours used as stimuli in the majority of the studies are substances typically associated with bees' lives, such as citronellol or linalool, which are natural components of the scent of flowers. The lower reactivity to this type of stimulus in forager bees, for example, could damage their ability to find good sources of food [84]. The same effects were demonstrated in the case of clothianidin, with regard to the queen pheromone, which is another essential component in the life and aggregation of bee colonies [20]. Furthermore, exposure to sublethal doses of imidacloprid can disrupt communications between forager bees, reducing the typical waggle dances [84].

Another cognitive aspect that was studied in relation to the toxicity of neonicotinoid insecticides is the visual memory linked to colours and spatial orientation. Also in this case, very low concentrations that are consistent with the environmental contamination caused by the use of coated seeds can result in a reduction in the ability to recognize colours [20].

Orientation in the field, which is evaluated as forager bees' ability to find their way back to the hive, has long been considered an important sublethal effect of pesticides. The first studies of this parameter were conducted in relation to sublethal poisoning from permethrin [85] and from deltamethrin [86].

Beginning in 2000, also in this field, the experimentation on sublethal effects regarded almost exclusively neonicotinoid insecticides. In fact, these products' specific mode of action results in harmful effects that are more marked at a cognitive level than those caused by pyrethroids or other insecticides such as organophosphorous pesticides. Imidacloprid [90] and thiamethoxam [73], in particular, were found to be able to obstruct bees from finding their way back to the hive. Forager bees' disorientation in the field can have serious effects on the colony, which under conditions of stress or weakness could become critical and result in the collapse of the colony [73]. In fact, a reduction in the number of forager bees could cause a change in the structure of the bees' roles: the in-hive bees would begin foraging and neglect the care of the brood. These findings, which have been demonstrated for bumble bees, could also be verified for bee colonies [108].

Other effects of pesticides have been observed regarding the ability to regulate temperature, fertility, and larval development.

Temperature regulation inside the hive is performed by the bees in a very precise manner, especially with regard to brood rearing. In fact, maintaining a temperature between 34 and 35 °C is essential for the proper development of the larvae [94]. Some pyrethroid insecticides, individually or in combination with fungicides, induce hypothermia

## ABSTRACT

at sublethal doses, probably by limiting the contraction of the indirect flight muscles, by means of which bees produce heat [96].

Exposure to pesticide residue in pollen and in wax has been correlated with disruptions in the development of bee larvae. Specifically, emergence could be delayed and the adult survival could be reduced [42].

### Effect of the combination of stress factors

If the possible routes of exposure of the bees to pesticides are taken into consideration, it seems clear that the combination of different active ingredients is of great interest in understanding the risk posed by agricultural practices on bees. Despite this, very few research studies address this subject, shedding light mainly on the interactions between one class of fungicides and a few insecticides.

Specifically the synergy between deltamethrin and the imidazole fungicide prochloraz has been verified in adult bees with regard to both mortality [110] and sublethal effects, such as the ability to regulate temperature [96]. Similarly to what was demonstrated for pyrethroids, also the combination of neonicotinoids and azole fungicides has a synergic effect with regard to adult bees [55].

In the last few years many research studies have been conducted on the relationship between the hive's state of health and the sensitivity to a poisoning event. One of these studies examined the effects of the concurrence of an infection by *Nosema ceranae* and a sublethal treatment with imidacloprid, in concentrations retrievable in pollen. The chronic combination of these two factors resulted in synergic effects on the survival of the bees under laboratory conditions, supported by confirmation at a biochemical level of the debilitating consequences on the individuals' and the colony's immune system [117]. These results were confirmed also for the combination of *Nosema* and other insecticides, such as fipronil and thiacloprid [107]. Similarly, exposure to sublethal doses of imidacloprid, corresponding to 20 ppb, sensitizes the colony with regard to infection by *Nosema* [119].

If, in the case of interactions between pesticides and pathogens, it is difficult to establish which of these two factors represents the sensitizing agent, it is therefore necessary to attempt to minimize the presence of the factor directly under human control, that is, pesticides. In fact, the occurrence of pathologies also depends on a multitude of other factors.

The environmental stresses that can affect the proper development of the colony include the brood rearing temperature and diet; under non-optimal conditions these factors can contribute to the stress induced by pesticide poisoning and thus act in a synergic manner.

For example, the rearing of larvae at a suboptimal temperature resulted in greater sensitivity of newly emerged bees to contamination with an organophosphorous insecticide [124].

The quality of the pollen has often been associated with the bees' state of health and especially with the brood's development and the adults' longevity. For example, a diet based on multifloral pollen, when compared with highly nutritious monofloral pollen, results in a marked increase in an enzyme involved in the sterilization of the royal jelly and the honey [129], leading us to assume a possible involvement in the sensitization to any contamination from pesticides.

### Conclusions

The research studies conducted in the last few years on the possible causes of bee mortality lead us toward an interpretation of this phenomenon that involves multiple factors, in which poisoning, with lethal or sublethal results, constitutes an important risk element [14]. Exposure to pesticides, together with pathologies, parasites, weather conditions, and beekeeping practices, contribute, in different proportions, to cause the weakening or subsequent collapse of a colony.

\* Per la presente relazione sono stati presi in considerazione i lavori pubblicati fino al 31 maggio 2013 (references up to: 5-31-13). I termini "prodotti fitosanitari", "agrofarmaci" e "pesticidi" in questo testo vengono usati indistintamente per indicare l'insieme dei prodotti chimici utilizzati in agricoltura per la difesa delle colture agrarie dagli organismi dannosi (insetti, acari, malarbe, crittogame, ecc.).

\*\* La guttazione è il fenomeno per cui l'acqua interna alle piante assorbita dalle radici viene eliminata allo stato liquido, attraverso idatodi e stomi, formando delle gocce, normalmente all'apice delle foglie. Questo si verifica in condizioni di bassa temperatura e alta umidità, che ostacolano l'evaporazione.

\*\*\* In tossicologia la DL<sub>50</sub> (Dose Letale 50) è la dose di una sostanza che, somministrata una sola volta, è in grado di provocare la morte del 50% degli individui presi in considerazione nella prova sperimentale. Nel caso in cui la sostanza sia dispersa nell'aria, diluita in una soluzione o cosparsa su una superficie, si parla di CL<sub>50</sub> (Concentrazione Letale 50).

## 8. Riferimenti bibliografici

1. Porrini C., Ghini S., Girotti S., Sabatini A. G., Gattavecchia E. e Celli G. (2002) *Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy* in: *Honey bees: the environmental impact of chemicals*. Ed: Devillers J. e Pham-Delègue M. H., Taylor&Francis, London, pp. 186-247.
2. Celli G., Porrini C. e Raboni F. (1988) *Monitoraggio con api della presenza di Ditiocarbammati nell'ambiente (1983-1986)*. Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell'Università degli Studi di Bologna, **43**: 195-205.
3. Bortolotti L. (2010) *Monitoraggio della mortalità delle api e dello spopolamento degli alveari in altri paesi europei*. APOidea, **2**: 29-42.
4. Comité Scientifique et Technique (2003) *Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho) et troubles des abeilles. Rapport du Comité scientifique et Technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles remis au Ministère de l'Agriculture*.
5. Bortolotti L., Sabatini A. G., Mutinelli F., Astuti M., Lavazza A., Piro R., Tesoriero D., Medrzycki P., Sgolastra F. e Porrini C. (2009) *Spring honey bee losses in Italy*. Julius-Kuhn Archives, **423**: 148-152.
6. Underwood R. M. e vanEngelsdorp D. (2007) *Colony Collapse Disorder: have we seen this before?* Bee Culture, **135**: 13-18.
7. Topolska G., Gajda A. e Hartwig A. (2008) *Polish honey bee colony-loss during the winter of 2007/2008*. Journal of Apicultural Science, **52**: 95-104.
8. Bacandritsos N., Granato A., Budge G., Papanastasiou I., Roinioti E., Caldon M., Falcaro C., Gallina A. e Mutinelli F. (2010) *Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies*. Journal of Invertebrate Pathology, **105**: 335-340.
9. Oldroyd B. P. (2007) *What's killing american honey bees?* PLoS Biol, **5**: e168.
10. vanEngelsdorp D., Hayes J. J., Underwood R. M. e Pettis J. (2008) *A survey of honey bee colony losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008*. PLoS ONE, **3**: e4071.
11. Frazier M., Mullin C., Frazier J. e Ashcraft S. (2008) *What have pesticides got to do with it?* American Bee Journal, **148**: 521-523.
12. Johnson R. M., Ellis M. D., Mullin C. A. e Frazier M. (2010) *Pesticides and honey bee toxicity - USA*. Apidologie, **41**: 312-331.
13. Stokstad E. (2007) *The case of the empty hives*. Science, **316**: 970-972.
14. Maini S., Medrzycki P. e Porrini C. (2010) *The puzzle of honey bee losses: a brief review*. Bulletin of Insectology, **63**: 153-160.
15. Neumann P. e Carreck N. L. (2010) *Honey bee colony losses*. Journal of Apicultural Research, **49**: 1-6.
16. OEPP/EPPO (2010) *PP 1/170 (4): Side-effects on honeybees*. EPPO Bulletin, **40**: 313-319.
17. Greatti M., Sabatini A. G., Barbattini R., Rossi S. e Stravisi A. (2003) *Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results*. Bulletin of Insectology, **56**: 69-72.
18. Marzaro M., Vivan L., Targa A., Mazzon L., Mori N., Greatti M., Toffolo E. P., Di Bernardo A., Giorio C., Marton D., Tapparo A. e Girolami V. (2011) *Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat*. Bulletin of Insectology, **64**: 119-126.
19. APENET (2009) *"Effects of coated maize seed on honey bees". Report based on results obtained from the first year of activity of the ApeNet project*. Online: <http://www.reterurale.it/apenet>.
20. 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*. Online: <http://www.reterurale.it/apenet>.
21. Georgiadis P. T., Pistorius J. e Heimbach U. (2010) *Dust in the wind - drift of dust containing insecticides - a risk for honey bees (Apis mellifera L.)? Dust in the wind - Abdrift insektizidhaltiger Staube - ein risiko fur Honigbienen (Apis mellifera L.)?* Julius-Kuhn Archives, **430**: 15-19.
22. Girolami V., Mazzon L., Squartini A., Mori N., Marzaro M., Di Bernardo A., Greatti M., Giorio C. e Tapparo A. (2009) *Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees*. Journal of Economic Entomology, **102**: 1808-1815.
23. Sgolastra F., Lanzoni A., Lilli A., Serra G., Medrzycki P. e C. P. (2010) *Valutazione del rischio per le api all'esposizione di gocce di guttazione derivanti da mais conciato*. ATTI Giornate Fitopatologiche, **1**: 537-540.
24. Hoffmann E. J. e Castle S. J. (2012) *Imidacloprid in melon guttation fluid: a potential mode of exposure for pest and beneficial organisms*. Journal of Economic Entomology, **105**: 67-71.
25. Smodiš Škerl M. I., Bolta S. V., Cesnik H. B. e Gregorc A. (2009) *Residues of pesticides in honeybee (Apis mellifera carnica) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, **83**: 374-377.
26. Bonmatin J. M., Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M. E. e Bengsch E. R. (2003) *A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens*. Analytical Chemistry, **75**: 2027-2033.
27. Bonmatin J.-M., Marchand P., Charvet R., Moineau I., Bengsch E.R. e Colin M. E. (2005) *Quantification of imidacloprid uptake in maize crops*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53**: 5336-5341.
28. Stoner K. A. e Eitzer B. D. (2012) *Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (Cucurbita pepo)*. PLoS ONE, **7**: e39114.

29. Chauzat M. P., Faucon J. P., Martel A. C., Lachaize J., Cougoule N. e Aubert M. (2006) *A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France*. Journal of Economic Entomology, **99**: 253-262.
30. Krupke C. H., Hunt G. J., Eitzer B. D., Andino G. e Given K. (2012) *Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields*. PLoS ONE, **7**: e29268.
31. Alix A. e Vergnet C. (2007) *Risk assessment to honey bees: a scheme developed in France for non-sprayed systemic compounds*. Pest Management Science, **63**: 1069-1080.
32. Mullin C. A., Frazier M., Frazier J. L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D. e Pettis J. S. (2010) *High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health*. PLoS ONE, **5**: e9754.
33. Bernal J., Garrido Bailén E., Del Nozal M. J., González-Porto A. V., Martín H., R., Diego J. C., Jiménez J. J., Bernal J. L. e Higes M. (2010) *Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (Apis mellifera) losses in Spain*. Journal of Economic Entomology, **103**: 1964-1971.
34. Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Buchler R., Berg S., Ritter W., Muhlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G. e Rosenkranz P. (2010) *The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies*. Apidologie, **41**: 332-352.
35. Dively G. P. e Kamel A. (2012) *Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **60**: 4449-4456.
36. Rortais A., Arnold G., Halm M.-P. e Touffet-Briens F. (2005) *Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees*. Apidologie, **36**: 71-83.
37. Halm M. P., Rortais A., Arnold G., Tasei J. N. e Rault S. (2006) *New risk assessment approach for systemic insecticides: The case of honey bees and imidacloprid (Gaucho)*. Environmental Science & Technology, **40**: 2448-2454.
38. Davis A. R. (1989) *The study of insecticide poisoning of honeybee brood*. Bee World, **70**: 163-174.
39. Smodiš Škerl M. I. (2010) *Exposure to pesticides at sublethal level and their distribution within a honey bee (Apis mellifera) colony*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, **85**: 125-128.
40. Free J. B. (1982) *L'organizzazione sociale delle api*. Edagricole (traduzione da: *The Social Organization of Honeybees*, Edward Arnold Publisher, London, 1977), Bologna
41. Chauzat M. P. e Faucon J. P. (2007) *Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (Apis mellifera L.) in France*. Pest Management Science, **63**: 1100-1106.
42. Wu J. Y., Anelli C. M. e Sheppard W. S. (2011) *Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (Apis mellifera): development and longevity*. PLoS ONE, **6**: e14720.
43. Porrini C. (2010) *Studi sul ruolo degli agrofarmaci nella sindrome della scomparsa delle api in Italia, nell'ambito del progetto Apenet*. APOidea, **2**: 20-25.
44. Suchail S., Guez D. e Belzunces L. P. (2001) *Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in Apis mellifera*. Environmental Toxicology and Chemistry, **20**: 2482-2486.
45. Decourtye A., Lacassie E. e Pham-Delègue M. H. (2003) *Learning performances of honeybees (Apis mellifera L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season*. Pest Management Science, **59**: 269-278.
46. Decourtye A. e Devillers J. (2010) *Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees*. in: *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. Ed: Thany S. H., Springer, New York, p. 85-95.
47. Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U. e Schmuck R. (2001) *Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae)*. Pest Management Science, **57**: 577-586.
48. Suchail S., De Sousa G., Rahmani R. e Belzunces L. P. (2004) *In vivo distribution and metabolisation of C-14-imidacloprid in different compartments of Apis mellifera L.* Pest Management Science, **60**: 1056-1062.
49. Suchail S., Debrauwer L. e Belzunces L. P. (2004) *Metabolism of imidacloprid in Apis mellifera*. Pest Management Science, **60**: 291-296.
50. OECD (1998) *Honeybees, acute oral toxicity test*. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems, **Guideline 213**: 1-8.
51. OECD (1998) *Honeybees, acute contact toxicity test*. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems, **Guideline 214**: 1-7.
52. Papaefthimiou C., Pavlidou V., Gregorc A. e Theophilidis G. (2002) *The action of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the isolated heart of insect and amphibian*. Environmental Toxicology and Pharmacology, **11**: 127-140.
53. Ladurner E., Bosch J., Kemp W. P. e Maini S. (2005) *Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to Osmia lignaria Say and Apis mellifera*. Apidologie, **36**: 449-460.
54. Suchail S., Guez D. e Belzunces L. P. (2000) *Characteristics of imidacloprid toxicity in two Apis mellifera subspecies*. Environmental Toxicology and Chemistry, **19**: 1901-1905.
55. Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J. T. e Roe R. M. (2004) *Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, Apis mellifera*. Crop Protection, **23**: 371-378.
56. Laurino D., Porporato M., Patetta A. e Manino A. (2011) *Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests*. Bulletin of Insectology, **64**: 107-113.
57. Laurino D., Manino A., Patetta A. e Porporato M. (2013) *Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes*. Bulletin of Insectology, **66**: 119-126.
58. Sgolastra F., Renzi T., Draghetti S., P. M., Lodesani M., Maini S. e C. P. (2012) *Effects of neonicotinoid dust from maize*

seed-dressing on honey bees. *Bulletin of Insectology*, **65**: 273-280.

59. El Hassani A. K., Dacher M., Gauthier M. e Armengaud C. (2005) *Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (Apis mellifera)*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **82**: 30-39.
60. Dechaume Moncharmont F., Decourtye A., Hennequet-Hantier C., Pons O. e Pham - Delègue M. H. (2003) *Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**: 3088-3094.
61. Aliouane Y., El Hassani A. K., Gray V., Armengaud C., Lambin M. e Gauthier M. (2009) *Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behaviour*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**: 113-122.
62. Decourtye A., Devillers J., Genecque E., Le Menach K., Budzinski H., Cluzeau S. e Pham-Delegue M. H. (2005) *Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **48**: 242-250.
63. Greatti M., Barbattini R., Stravisi A., Sabatini A. G. e Rossi S. (2006) *Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho® dressed seeds*. *Bulletin of Insectology*, **59**: 99-103.
64. Pistorius J., Bischoff G., Heimbach U. e Stahler M. (2009) *Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize*. *Julius-Kühn-Archives*, **423**: 118-126.
65. Bortolotti L., Sabatini A. G., Mutinelli F., Astuti M., Lavazza A., Piro R., Tesoriero D., Medrzycki P., Sgolastra F. e Porrini C. (2009) *Pertes printanières d'abeilles en Italie*. *La santé de l'abeille*, **229**: 1-4.
66. Porrini C., Sabatini A. G., Mutinelli F., Astuti M., Lavazza A., Piro R., Tesoriero D., Medrzycki P., Sgolastra F. e Bortolotti L. (2009) *Le segnalazioni degli spopolamenti e delle mortalità degli alveari in Italia: resoconto 2008*. *L'Apis*, **1**: 15-19.
67. Tremolada P., Mazzoleni M., Saliu F., Colombo M. e Vighi M. (2010) *Field trial for evaluating the effects on honeybees of corn sown using Cruiser® and Celest® treated seeds*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **85**: 229-234.
68. Girolami V., Marzaro M., Vivan L., Mazzon L., Greatti M., Giorio C., Marton D. e Tapparo A. (2012) *Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication*. *Journal of Applied Entomology*, **136**: 17-26.
69. Cutler G. C. e Scott-Duprée C. D. (2007) *Exposure to Clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees*. *Journal of Economic Entomology*, **100**: 765-772.
70. Schmuck R., Schoning R., Stork A. e Schramel O. (2001) *Risk posed to honeybees (Apis mellifera L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers*. *Pest Management Science*, **57**: 225-238.
71. Lu C., Warchlol K. e Callahan R. A. (2012) *In situ replication of honey bee colony collapse disorder*. *Bulletin of Insectology*, **65**: 99-106.
72. Farooqui T. (2013) *A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis*. *Neurochemistry International*, **62**: 122-136.
73. Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J. F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S. e Decourtye A. (2012) *A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees*. *Science*, **336**: 348-350.
74. 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* 2012, **10**: 2668.
75. Belzunces L. P., Tchamitchan S. e Brunet J.-L. (2012) *Neural effects of insecticides to the honey bee*. *Apidologie*, **43**: 348-370.
76. Giurfa M. e Sandoz J. C. (2012) *Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees*. *Learning & Memory*, **19**: 54-66.
77. Blacquière T., Smagghe G., van Gestel C. e Mommaerts V. (2012) *Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment*. *Ecotoxicology*, **21**: 973-992.
78. Guez D., Suchail S., Gauthier M., Maleszka R. e Belzunces L. P. (2001) *Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (Apis mellifera)*. *Neurobiology of Learning and Memory*, **76**: 183-191.
79. Lambin M., Armengaud C., Raymond S. e Gauthier M. (2001) *Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **48**: 129-134.
80. Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S., Charreton M. e Pham-Delègue M. H. (2004) *Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **57**: 410-419.
81. 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*. Online: <http://www.reterurale.it/apenet>.
82. El Hassani A. K., Dacher M., Gary V., Lambin M., Gauthier M. e Armengaud C. (2008) *Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (Apis mellifera)*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **54**: 653-661.
83. Bernadou A., Demares F., Couret-Fauvel T., Sandoz J. C. e Gauthier M. (2009) *Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee*. *Journal of Insect Physiology*, **55**: 1099-1106.
84. Eiri D. M. e Nieh J. C. (2012) *A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing*. *Journal of Experimental Biology*, **215**: 2022-2029.
85. Cox R. L. e Wilson W. T. (1984) *Effects of permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, Apis mellifera*

- L. (Hymenoptera: Apidae)*. Environmental Entomology, **13**: 375-378.
86. Vandame R., Meled M., M.E. C. e Belzunces L. P. (1995) *Alteration of the homing-flight in the honey bee Apis mellifera L. exposed to sublethal dose of deltamethrin*. Environmental Toxicology and Chemistry, **14**: 855-860.
  87. Bendahou N., Fleche C. e Bounias M. (1999) *Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary cypermethrin (Cybush) on honeybee colonies (Hymenoptera: Apidae)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, **44**: 147-153.
  88. Matsumoto T. (2013) *Reduction in homing flights in the honey bee Apis mellifera after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides*. Bulletin of Insectology, **66**: 1-9.
  89. Colin M. E., Bonmatin J. M., Moineau I., Gaimon C., Brun S. e Vermandere J. P. (2004) *A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, **47**: 387-395.
  90. Bortolotti L., Montanari R., Marcelino J., Medrzycki P., Maini S. e Porrini C. (2003) *Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees*. Bulletin of Insectology, **56**: 63-67.
  91. Decourtye A., Devillers J., Aupinel P., Brun F., Bagnis C., Fourrier J. e Gauthier M. (2011) *Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides*. Ecotoxicology, **20**: 429-437.
  92. Schneider C. W., Tautz J., Grunewald B. e Fuchs S. (2012) *RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of Apis mellifera*. PLoS ONE, **7**: e30023.
  93. Yang E. C., Chuang Y. C., Chen Y. L. e Chang L. H. (2008) *Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae)*. Journal of Economic Entomology, **101**: 1743-1748.
  94. Tautz J., Maier S., Groh C., Rössler W. e Brockmann A. (2003) *Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development*. PNAS, **100**: 7343-7347.
  95. Stabentheiner A., Pressl H., Papst T., Hrasnigg N. e Crailsheim K. (2003) *Endothermic heat production in honeybee winter clusters*. Journal of Experimental Biology, **206**: 353-358.
  96. Vandame R. e Belzunces L. P. (1998) *Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation*. Neuroscience Letters, **251**: 57-60.
  97. Pettis J. S., Collins A. M., Wilbanks R. e Feldlaufer M. F. (2004) *Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, Apis mellifera*. Apidologie, **35**: 605-610.
  98. Haarmann T., Spivak M., Weaver D., Weaver B. e Glenn T. (2002) *Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations*. Journal of Economic Entomology, **95**: 28-35.
  99. Dai P. L., Wang Q., Sun J. H., Liu F., Wang X., Wu Y. Y. e Zhou T. (2010) *Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee Apis mellifera ligustica*. Environmental Toxicology and Chemistry, **29**: 644-649.
  100. Laycock I., Lenthall K., Barratt A. e Cresswell J. (2012) *Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (Bombus terrestris)*. Ecotoxicology, **21**: 1937-1945.
  101. Aupinel P., Fortini D., Dufour H., Tasei J.N., Michaud B., Odoux J-F. e M.H. P.-D. (2005) *Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing Apis mellifera larvae*. Bulletin of Insectology, **58**: 107-111.
  102. Aupinel P., Fortini D., Michaud B., Marolleau F., Tasei J. N. e Odoux J. F. (2007) *Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (Apis mellifera), using a new in vitro standardized feeding method*. Pest Management Science, **63**: 1090-1094.
  103. Smodiš Škerl M. I. e 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.
  104. Hatjina F., Papaefthimiou C., Charistos L., Dogaroglu T., Bouga M., Emmanouil C. e Arnold G. (2013) *Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo*. Apidologie, **44**: 467-480.
  105. Cruz A. d. S., Silva-Zacarin E. C. M. d., Bueno O. C. e Malaspina O. (2010) *Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (Apis mellifera L.) larvae*. Cell Biology and Toxicology, **26**: 165-176.
  106. Badiou-Bénéteau A., Carvalho S. M., Brunet J.-L., Carvalho G. A., Buleté A., Giroud B. e Belzunces L. P. (2012) *Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee Apis mellifera: Application to the systemic insecticide thiamethoxam*. Ecotoxicology and Environmental Safety, **82**: 22-31.
  107. Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vignes B., Brunet J. L., Texier C., Biron D. G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L. P. e Delbac F. (2011) *Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by Nosema ceranae*. PLoS ONE, **6**: 8.
  108. Gill R. J., Ramos-Rodriguez O. e Raine N. E. (2012) *Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees*. Nature, **491**: 105-119.
  109. Celli G. e Porrini C. (1988) *Apicidi e residui di pesticidi nelle api e nell'alveare in Italia (1983-1986)*. Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell'Università degli Studi di Bologna, **42**.
  110. Chalvet-Monfray K., Belzunces L. P., M.E. C., Fleche C. e Sabatier P. (1995) *Modelling synergistic effects of two toxic agents in the honeybee*. Journal of Biological Systems, **3**: 253-263.
  111. Thompson H. M. e Wilkins S. (2003) *Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures*. Bulletin of Insectology, **56**: 131-134.

112. Nauen R. e Denholm I. (2005) *Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **58**: 200-215.
113. Bass C., Carvalho R. A., Oliphant L., Puinean A. M., Field L. M., Nauen R., Williamson M. S., Moores G. e Gorman K. (2011) *Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, CYP6ER1, is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, Nilaparvata lugens*. Insect Molecular Biology, **20**: 763-773.
114. Prullage J. B., Cawthorne W. G., Hir de Fallois L. P. e Timmons P. R. (2011) *Synergy between fipronil and amitraz in a Rhipicephalus sanguineus tick residual contact test*. Experimental and Applied Acarology, **54**: 173-176.
115. Bromenshenk J. J., Henderson C. B., Wick C. H., Stanford M. F., Zulich A. W., Jabbour R. E., Deshpande S. V., McCubbin P. E., Seccomb R. A., Welch P. M., Williams T., Firth D. R., Skowronski E., Lehmann M. M., Bilimoria S. L., Gress J., Wanner K. W. e Cramer R. A., Jr. (2010) *Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline*. PLoS ONE, **5**: e13181.
116. Ratnieks F. L. W. e Carreck N. L. (2010) *Clarity on honey bee collapse?* Science, **327**: 152-153.
117. Alaux C., Brunet J. L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L. P. e Le Conte Y. (2010) *Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (Apis mellifera)*. Environmental Microbiology, **12**: 774-782.
118. Aufauvre J., Biron D. G., Vidau C., Fontbonne R., Roudel M., Diogon M., Vignes B., Belzunces L. P., Delbac F. e Blot N. (2012) *Parasite-insecticide interactions: a case study of Nosema ceranae and fipronil synergy on honeybee*. Science Report, **2**: e326.
119. Pettis J., vanEngelsdorp D., Johnson J. e Dively G. (2012) *Pesticide exposure in honey bee results in increased levels of the gut pathogen Nosema*. Naturwissenschaften, **99**: 153-158.
120. Gregorc A., Evans J. D., Scharf M. e Ellis J. D. (2012) *Gene expression in honey bee (Apis mellifera) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (Varroa destructor)*. Journal of Insect Physiology, **58**: 1042-1049.
121. Yang X. e Cox-Foster D. (2007) *Effects of parasitization by Varroa destructor on survivorship and physiological traits of Apis mellifera in correlation with viral incidence and microbial challenge*. Parasitology, **134**: 405-412.
122. Nazzi F., Brown S. P., Annoscia D., Del Piccolo F., Di Prisco G., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E. e Pennacchio F. (2012) *Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies*. PLoS Pathogens, **8**: 16.
123. Tautz J., Kleinhenz M., Bujik B., Bock F. e Fuchs S. (2004) *La climatizzazione dell'ambiente: un capolavoro dell'ape*. APOidea, **1**: 55-59.
124. Medrzycki P., Sgolastra F., Bortolotti L., Bogo G., Tosi S., Padovani E., Porrini C. e Sabatini A. G. (2010) *Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides*. Journal of Apicultural Research, **49**: 52-59.
125. Le Conte Y. e Navajas M. (2008) *Climate change: impact on honey bee populations and diseases*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., **27**: 499-510.
126. Brodschneider R. e Craillsheim K. (2010) *Nutrition and health in honey bees*. Apidologie, **41**: 278-294.
127. Tosi S., Bergamini D., Porrini C. e Medrzycki P. (2013) *Influence of pollen quality on honey bee health*. Proceedings of the American Bee Research Conference, edited by Zachary Huang. American Bee Journal, **153**: 306-307.
128. Höcherl N., Siede R., Illies I., Gatschenberger H. e Tautz J. (2012) *Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees*. Journal of Insect Physiology, **58**: 278-285.
129. Alaux C., Ducloz F., Crauser D. e Le Conte Y. (2010) *Diet effects on honeybee immunocompetence*. Biology Letters, **6**: 562-565.
130. Maus C., Curé G. e Schmuck R. (2003) *Safety of imidacloprid seed dressings to honey bees: a comprehensive overview and compilation of the current state of knowledge*. Bulletin of Insectology, **56**: 51-57.
131. Thompson H. M. e Maus C. (2007) *The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment*. Pest Management Science, **63**: 1058-1061.
132. Nguyen B. K., Saegerman C., Pirard C., Mignon J., Widart J., Thirionet B., Verheggen F. J., Berkvens D., De Pauw E. e Haubruge E. (2009) *Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality?* Journal of Economic Entomology, **102**: 616-623.
133. Cressey D. (2013) *Europe debates risks to bees*. Nature, **496**: 408.
134. EFSA (2013) *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid*. EFSA Journal 2013, **11**: 3068.
135. EFSA (2013) *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin* EFSA Journal 2013, **11**: 3066.
136. EFSA (2013) *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam*. EFSA Journal 2013, **11**: 3067.
137. Cresswell J. E. (2010) *A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees*. Ecotoxicology, **20**: 149-57.
138. van der Sluijs J. P., Simon-Delso N., Goulson D., Maxim L., Bonmatin J.-M. e Belzunces L. P. (2013) *Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services*. Current Opinion in Environmental Sustainability. In press.
139. Wilson E. O. (1971) *The insect societies*. Belknap Press, Cambridge MA.



## Sintesi delle ricerche sugli effetti indesiderati dei pesticidi nei confronti delle api

Prof. Stefano Maini  
Dott. Claudio Porrini  
Dott.ssa Maria Teresa Renzi

*Alma Mater Studiorum* – Università di Bologna  
Dipartimento di Scienze Agrarie (DipSA)

**Associazione  
Produttori  
Miele  
Piemonte**  
[www.aspromiele.it](http://www.aspromiele.it)



UNIONE EUROPEA



MINISTERO PER LE POLITICHE  
AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

REALIZZATO CON IL CONTRIBUTO DEL REGOLAMENTO CEE 1234/07