



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

MONITORAGGIO AMBIENTALE CON LE API IN UN'OTTICA DI ONE HEALTH

Sala Zavagli - IZSLT -ROMA

«Le api come indicatori ambientali e non solo»

Dr. Alessandro Ubaldi: Alessandro.Ubaldi@izslt.it

Roma, 20 Febbraio 2025



INQUINAMENTO AMBIENTALE

Introduzione di Contaminanti nell'ambiente naturale responsabili di cambiamenti avversi nell'ambiente.

PRINCIPALI TIPOLOGIE DI INQUINAMENTO

- Inquinamento dell'acqua*
- Inquinamento dell'aria*
- Inquinamento del suolo e della vegetazione*
- Inquinamento acustico (*noise pollution*)
- Inquinamento termale (*thermal enrichment*)



L'APE come BIOINDICATORE

Ruolo in base all'obiettivo.

- **INDICATORE DI CONFORMITA'**: sostenibilità della popolazione;
- **INDICATORE DIAGNOSTICO**: misurazioni fatte sull'individuo;
- **INDICATORE PRECOCE**: risposta rapida e sensibile ai cambiamenti ambientali.



Apis mellifera indicatore ambientale – caratteristiche peculiari

- Specie diffusa livello globale;
- Le colonie sono di gestione agevole;
- Ogni colonia annovera migliaia di bottinatrici che agiscono da strumenti di campionamento;
- Interagiscono in modi diversi con l'ambiente: esposizione nei siti di impollinazione – durante il volo da e verso l'alveare
- Specie bottinatrice a lungo raggio;
- Resilienza della colonia ad accumulo di fattori di stress o rispondere a essi senza collassare.



Apis mellifera indicatore ambientale – Principali Contaminanti Monitorabili

- Particolato Atmosferico ;
- Sostanze Chimiche Persistenti (PCDD/Fs, PCBs, OCPs);
- Metalli Pesanti/Elementi (Pb, Cd, Hg, As....);
- Sostanze Attive (ss. aa.) di Prodotti Fitosanitari;



Apis mellifera indicatore ambientale – Matrici tipicamente campionate

- Api adulte;
- Pupe;
- Cera;
- Miele (previsto MRL);
- Polline;
- Pane d'api (*beebread*).



Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito Progetto “**INSIGNIA-EU**”

- Apiario collocato in un’area alluvionale del fiume Sacco nel 2015 e 2021;
- Considerate le tipiche matrici dell’alveare + APIStrip (Strisce di polimero adsorbente di «TENAX TA»)

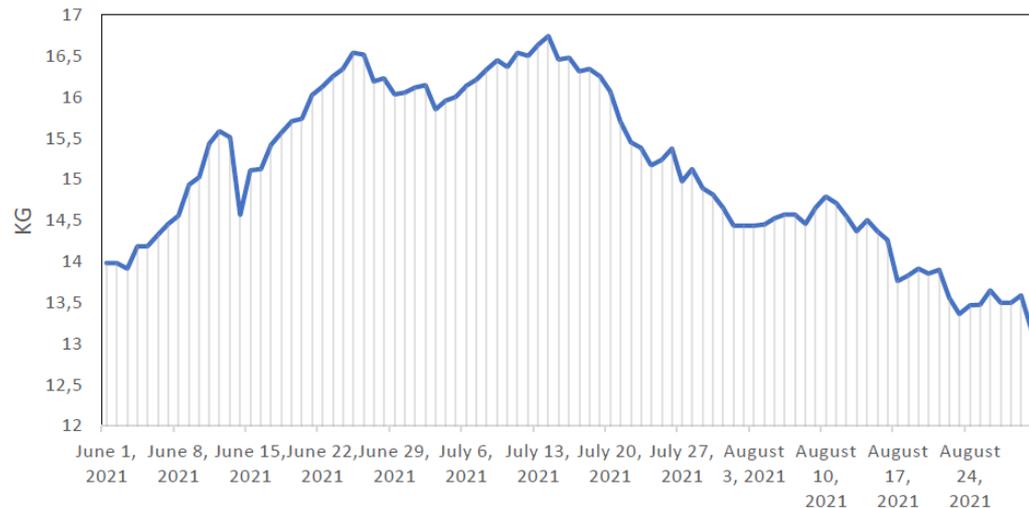
Number of samples collected during each sampling period								
Sampling date	Year	APIStrips	Adult bees	Wax	Pollen	Bee bread	Honey	Pupae
MAY	2015	-	1	1	1	-	1	1
JUN		-	1	1	1	-	1	1
JUL		-	1	1	1	-	1	1
AUG		-	1	1	1	-	1	1
1/JUN	2021	4	4	1	-	-	-	-
15/JUN		4	4	4	2	4	2	-
1/JUL		3	3	3	3	3	3	-
15/JUL		3	3	3	3	3	2	-
1/AUG		3	3	3	3	2	2	-
15/AUG		3	3	3	3	3	3	-
31/AUG		3	3	3	3	3	3	-





Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito Progetto **INSIGNIA**

- Attività preliminare 2015: monitoraggio principalmente orientato verso la ricerca degli isomeri α , β e γ dell'Esaclorocicloesano (HCH) – sostanza principalmente correlata all'inquinamento industriale dell'area monitorata) – 20 campioni prelevati in totale;
- Attività 2021: monitoraggio ad ampio spettro (460 principi attivi [pp. aa.] ricercati relativi a prodotti Fitosanitari, inclusi un ampio numero di pp. aa. organoclorurati) – 116 campioni prelevati in totale.



Peso dell'arnia registrato durante la prova del 2021

Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito
Progetto **INSIGNIA-EU**

RISULTATI DEL MONITORAGGIO

- Attività 2015: rilevata la presenza di 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of β -HCH in un solo campione di polline

- Attività 2021: su 116 campioni analizzati, 83 (71%) presentavano residui di pp. aa.;
- venivano identificati 65 diversi pp. aa.;
- sulle strisce di APIStrip veniva rilevato il maggior numero di pp. aa.

	Wax (n = 8)	APIStrips (n = 23)	Honey (n = 8)	Pollen (n = 12)	Beebread (n = 9)	Bees (n = 23)
<u>Totale aa.ss. rilevate</u> <u>in funzione della matrice</u>	21	26	15	15	18	18





Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito Progetto **INSIGNIA-EU** – aa. ss. Identificate nei campioni.

Table 2. Percentage of positive samples per matrix for each pesticide residue

Pesticide	Wax (n = 8)	APIStrips (n = 23)	Honey (n = 8)	Pollen (n = 12)	Beebread (n = 9)	Bees (n = 23)
Dimethomorph	100	9	38	33	100	4
Acetamiprid	75	13	75	83	100	9
Tau-fluvalinate	100	74	38			13
Metolachlor	75	17			100	22
Ametoctradin	75		13	25	100	
DMF	100	83	13			
Propargite	100		38			13
Chloranthraniliprole	100			8		4
Chlorpyrifos	63	17	13			
Terbuthylazine	25		13		56	
Dieldrin + endrin	13		25	17		
Boscalid			13		44	4
Coumaphos	100		38			
Hexythiazox	88		38			
Cypermethrin	88		25			
Bromopropylate	50	4				
Azoxystrobin	13				44	
Imidacloprid		52			11	
Diazinon		13		8		

Table 2. Percentage of positive samples per matrix for each pesticide residue

Pesticide	Wax (n = 8)	APIStrips (n = 23)	Honey (n = 8)	Pollen (n = 12)	Beebread (n = 9)	Bees (n = 23)
Carbendazim		13			44	
Tebufenpyrad		4	13			
Fluopyram		4			78	
Iprovalicarb				25	33	
Fipronil				17	22	
Lindane				17		9
Metalaxyl				8	67	
Ethoprophos				8		9
DEET	100					
4,4'-DDT	38					
Fenpyroximate	25					
Carbaryl	13					
Trifloxystrobin	13					
Quinoxifen		57				
Tebuconazole		13				
Proquizaop		9				
2,4'-DDE		4				
4,4'-DDE		4				
Fluazifop-p-butyl		4				
Lufenuron		4				





Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito
Progetto **INSIGNIA-EU** – pp. aa. identificati nei campioni.

Malathion		4				
Picolinafen		4				
Pymetrozine		4				
Tetraconazole		4				
Thiabendazole		4				
Triadimefon		4				
Zoxamide		4				
Chlorfenvinphos			38			
Chlordane				17		
Fenbuconazole				17		
Terbutylazine desethyl				17		
Fenpyrazamine				8		
Fluxapyroxad					78	
Mandipropamid					44	
Oxydemeton-methyl					33	
Buprofezin					11	
Fenpropimorph					11	
Flufenoxuron						22
Azinphos-ethyl						13
Diphenylamine						9
Metrafenone						9
Dimethenamid						4
Etofenprox						4
Etoxazole						4
Imidacloprid						4
Pyridate						4
Percentage of positive samples per matrix for each pesticide residue						
Pesticide	Wax (n = 8)	APIStrips (n = 23)	Honey (n = 8)	Pollen (n = 12)	Beebread (n = 9)	Bees (n = 23)

Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito Progetto **INSIGNIA-EU** - RISULTATI DEL MONITORAGGIO

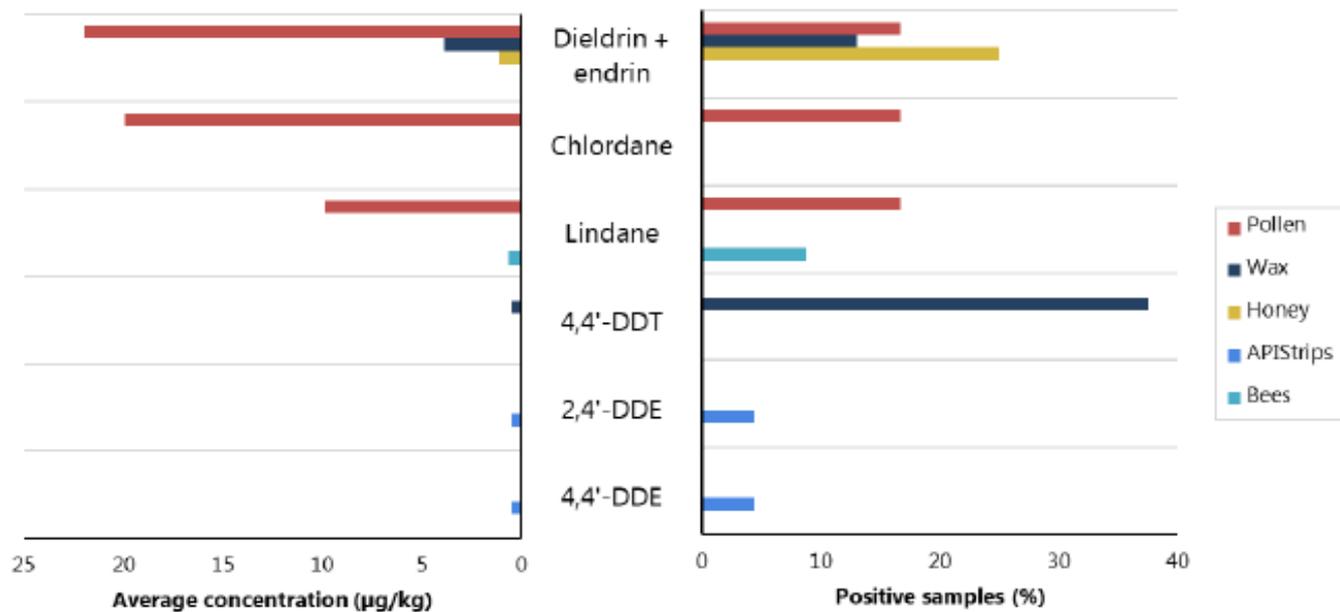
Fogli cerei
- pool di campioni -

	Pooled wax	Avg. Wax	Avg. API Strips	Avg. Honey	Avg. Pollen	Avg. Bee bread	Avg. Bees
Tau-fluvalinate	31.5	15.3	5.4	1.8	-	-	< LOQ
Coumaphos	19.0	7.5	-	1.3	-	-	-
DEET	14.9	1.4	-	-	-	-	-
Cypermethrin	11.6	6.0	-	1.3	-	-	-
DMF	11.0	1.3	-	< LOQ	-	-	-
Chloranthraniliprole	5.6	1.8	-	-	< LOQ	-	< LOQ
Propargite	3.5	2.1	-	< LOQ	-	-	< LOQ
Bromopropylate	1.3	0.7	< LOQ	-	-	-	-
Chlorpyrifos	0.5	< LOQ	0.7	< LOQ	-	-	-



Dimethomorph	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.5	0.5	1.1
Acetamiprid	< LOQ	< LOQ	-	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Metolachlor	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-	-	< LOQ	< LOQ
Ametoctradin	< LOQ	< LOQ	-	< LOQ	-	< LOQ	-
Hexythiazox	< LOQ	< LOQ	-	< LOQ	-	-	-
4,4'-DDT	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-	< LOQ	-	-

Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito
Progetto **INSIGNIA-EU** - RISULTATI DEL MONITORAGGIO



Concentrazione media ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o $\text{ng}/\text{APIStrip}$) e % di campioni con presenza di Organoclorurati in campioni provenienti dalla valle del fiume Sacco.





Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito
Progetto **INSIGNIA-EU** – QUALCHE CONSIDERAZIONE

- Si conferma in questo genere di studi, l'importanza del contributo potenziale che il foglio cereo può dare al profilo di contaminazione riscontrato sulle altre matrici, ai fini di una corretta interpretazione dei risultati;
- Data la natura non biologica del materiale di cui è costituito l'APIStrip, dal punto di vista del chimico-analitico, si ottengono tracciati del segnale più «pulito» => migliori limiti di rivelabilità.





Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito
Progetto **INSIGNIA-EU** – QUALCHE CONSIDERAZIONE

- Nel caso dei **composti organoclorurati**, sostanze tossicologicamente più rilevanti, per la sicurezza delle persone e delle attività agro-zootecniche della zona monitorata, la contaminazione si riscontra prevalentemente sul polline (23, 20 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - Dieldrin + Endrin, Chlordane e Lindano); nel miele presenza in 2 campioni ($< 1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ - Dieldrin + Endrin), molto inferiori all'LMR di 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- I **composti organoclorurati** non hanno comportamento sistemico e si fissano fortemente alle particelle di suolo, poi veicolate dalla ventilazione. Questi risultati suggeriscono come i pesticidi organoclorurati che inquinano l'area di campionamento espongono le colonie principalmente attraverso il polline raccolto e questi inquinanti non potrebbero costituire un rischio di contaminazione per le colonie poiché le matrici a lungo termine nell'alveare (ad esempio APIStrips) non sono state in grado di rilevarli.





Studio di Monitoraggio di Residui di β -HCH e altri Principi Attivi Organoclorurati ambito
Progetto **INSIGNIA-EU** – QUALCHE CONSIDERAZIONE

- Relativamente agli altri pp. aa. rilevati nei campioni, quelli riscontrati nella cera prodotta dalle api, ma non presenti nel foglio cereo (es. *azoxystrobin*, *carbaryl*, *dieldrin*, *fenpyroximate*, *terbuthylazine* e *trifloxystrobin*), se ne può affermare la presenza nell'ambiente compreso nel raggio di azione delle api.
- Analoga considerazione può essere fatta per tutti quei pp. aa. rimanenti che non sono stati rilevati in alcun campione di cera.





API e PRODOTTI FITOSANITARI

- Fenomeni di Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari (SSA): diversi i fattori scatenanti tra cui uso agricolo di **neonicotinoidi**, insetticidi neurotossici derivati della nicotina.
- Nel **2008** il Ministero della Salute decide di sospendere, in via cautelativa, l'utilizzo di prodotti fitosanitari a base di neonicotinoidi dopo che erano stati pubblicati diversi articoli sulla stampa che segnalavano una correlazione fra la dispersione di polveri contenenti prodotto conciante al momento delle semine primaverili di mais e le repentine morie negli alveari situati nei dintorni





API e PRODOTTI FITOSANITARI

- REG. (CE) N. 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE;
- Prevede «Procedura e criteri per l'approvazione delle sostanze attive, degli antidoti agronomici e dei sinergizzanti a norma del capo II» - Allegato II, => valutazione del rischio *fondata su orientamenti per l'esecuzione di test riconosciuti a livello comunitario o internazionale...*
- *comporta un'esposizione trascurabile per le api?*
- *non ha alcun **effetto inaccettabile acuto o cronico** per la sopravvivenza e lo sviluppo della colonia, tenendo conto degli effetti sulle larve di api e sul comportamento delle api.*





API e PRODOTTI FITOSANITARI

- Reg. UE 283 e 284 (2013) - Requisiti dei dati a supporto delle domande presentate dalle aziende produttrici di Sostanze Attive e di Prodotti Fitosanitari.
- REG. UE 283 (2013) - Requisiti dei dati per le **Sostanze Attive** - => ***Gli effetti sulle api devono essere valutati e il rischio valutato, incluso il rischio derivante dai residui della sostanza attiva o dei suoi metaboliti nel nettare, nel polline e nell'acqua, inclusa la guttazione, eccetto quando i prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva sono destinati esclusivamente all'uso in situazioni in cui è improbabile che le api siano esposte.***





API e PRODOTTI FITOSANITARI

- REG. UE 284 (2013) - Requisiti dei dati per i **Prodotti Fitosanitari** - => I possibili effetti sulle api devono essere studiati eccetto quando il prodotto fitosanitario è destinato esclusivamente all'uso in situazioni in cui è improbabile che le api siano esposte [...].

- La sperimentazione è richiesta se:
 - il prodotto fitosanitario contiene più di una sostanza attiva;
 - non è possibile prevedere in modo affidabile *che la tossicità di un prodotto fitosanitario sia uguale o inferiore a quella della sostanza attiva testata.*

- Nei casi in cui è probabile che le api siano esposte, devono essere effettuati test di **tossicità sia acuta (orale e da contatto) che cronica**, compresi gli effetti subletali.





API e PRODOTTI FITOSANITARI

Data Requirements - Reg. UE 283 and 284 (2013)

ACUTE ORAL AND CONTACT TOXICITY:

- Not required if negligible exposure
- **LD₅₀** ($\mu\text{g}_{\text{a.s.}}$ /bee or $\mu\text{g}_{\text{p.f.}}$ /bee)
- Guideline OECD 213 and 214 (48 h). The toxicity of one route cannot be predicted from the other.
- Sub-lethal effects, if observed, shall be reported.

CHRONIC ADULT TOXICITY

Non ancora rilasciata
la Linea Guida per la
valutazione del
Rischio Cronico

- Not required if negligible exposure
- **LDD₅₀** Lethal Dietary Dose after 10 days of exposure
- EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ together with the NOEC ($\mu\text{g}_{\text{a.s.}}$ /bee or $\mu\text{g}_{\text{p.f.}}$ /bee)
- Sub-lethal effects, if observed, shall be reported.
- Guideline OECD 245 (10 d)

CHRONIC LARVAE TOXICITY

- Not required if negligible exposure
- **NOED**
- EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ together with the NOEC ($\mu\text{g}_{\text{a.s.}}$ /bee or $\mu\text{g}_{\text{p.f.}}$ /bee)
- Sub-lethal effects, if observed, shall be reported.
- Guideline OECD 239-repeated exposure (22 d)





API e PRODOTTI FITOSANITARI

OECD protocols – Honeybees, Acute Oral Toxicity Test

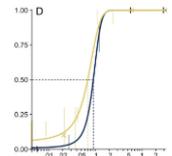
OECD 213 (1998): Adult worker honeybees are exposed to a range of doses of the test substance dispersed in sucrose solution. The bees are then fed the same diet, free of the test substance. Mortality is recorded daily during at least 48 hours and compared with control values.

At least 5 tested concentration (spacing factor ≤ 2.2) + control + toxic standard (dimethoate); 3 replicates for tested level; 10 bees for replicate. Test duration 48 h. A range-finding test enables the choice of the appropriate concentrations for dosage.

Validity criteria:

the average mortality for the total number of controls must not exceed 10 per cent at the end of the test.

the LD50 of the toxic standard meets the specified range.



Considered observations: mortality. All abnormal behavioural effects observed during the testing period should be recorded

Test conditions: bees should be held in the dark in an experimental room at a temperature of 25 ± 2 °C. The relative humidity, normally around 50-70 %, should be recorded throughout the test.



API e PRODOTTI FITOSANITARI

SANCO/10329/2002 rev 2 final, 17 October 2002



$$HQ_{\text{oral}} = \frac{\text{Application rate (g s.a./ha)}}{LD_{50\text{oral}} (\mu\text{g s.a./ape})}$$

$$HQ_{\text{contact}} = \frac{\text{Application rate}}{LD_{50\text{contact}}}$$



HQ < 50 : low risk concluded

HQ ≥ 50 : higher tier testing is required

HIGHER TIER TESTS

BEE BROOD FEEDING TESTS

If an active substance may act as an insect growth regulator (unless exposure of bee brood can be shown to be unlikely)

RESIDUE TESTS



HQ (contact) ≥ 50 and if significant residual traces of the substance are likely to remain on crops after application which could affect foraging bees.

HIGHER TIER TESTS

EPPO GL 170 for **CAGE/TUNNEL OR FIELD** trials. There are no clearly defined endpoints for higher tier studies, therefore, a degree of expert. judgement is required to interpret both semi-field and field study results





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

