



C.Re.Ha. *nature*
Conservation and Restoration of Habitats

SO.GE.NU.S. S.P.A

**BIOMONITORAGGIO AMBIENTALE NEL SITO
SO.GE.NU.S. MEDIANTE L'UTILIZZO DI APIS
MELLIFERA**

I Relazione

Gennaio 2014

Egregio Sig. Direttore, con riferimento al contratto **“Biomonitoraggio ambientale nel sito SO.GE.NU.S. SpA. mediante utilizzo di *Apis mellifera* e indagine sugli imenotteri apoidei”** stipulato tra questa Società cooperativa e la Sogenus SpA, le invio la prima relazione con i risultati del monitoraggio, prodotto come previsto, per l'anno 2013 nella discarica mediante l'utilizzo di *Apis mellifera*.

L'operazione è stata eseguita in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Nunzio Isidoro (Università Politecnica delle Marche) trattandosi di un progetto di ricerca di tipo sperimentale mentre le misure strumentali sono state eseguite nei laboratori dell'ASSAM.

Per l'esecuzione delle analisi è stato adottato pienamente quanto previsto nell'allegato tecnico, a cui si è fatto riferimento.

A sua disposizione per eventuali chiarimenti in merito.

Cordiali saluti,

Prof. Edoardo Biondi

Ancona, 17 gennaio 2014

A - Biomonitoraggio ambientale nel sito Sogenus mediante l'utilizzo di *Apis mellifera*

Lo scopo dello studio è stato quello di costituire una stazione per il biomonitoraggio mediante l'uso dell'*Apis mellifera* L. al fine di controllare la qualità ambientale nel sito SOGENUS, Moie – Maiolati Spontini (AN) (Foto 1, 2 e 3) per quanto riguarda i prodotti fitosanitari ed i metalli pesanti.

L'unità fondamentale di rilevamento è stata la stazione di biomonitoraggio, composta da due alveari con famiglie d'api omogenee per quanto riguarda lo stato di salute e la "forza". Gli alveari sono stati posizionati in data 01-04-2013 all'interno del sito Sogenus nel comune di Maiolati Spontini ed i campioni sono stati prelevati fino al 31-10-2013. Le arnie utilizzate sono arnie razionali, del tipo Dadant-Blatt standard, che sono state indicate come alveare A ed alveare B, in modo da avere dati disgiunti.

Subito dopo aver provveduto al posizionamento delle arnie è stato eseguito un apposito controllo delle colonie sia sanitario che della forza delle stesse. In particolare, la valutazione della forza della famiglia è stata effettuata mediante accurati controlli degli alveari, in cui è stata registrata l'attività delle bottinatrici di fronte all'alveare, l'età della regina, il numero dei telaini occupati dalle api, il numero di telaini di covata e la compattezza o discontinuità di quest'ultima.

Le arnie sono state poste sopra un apposito rialzo al fine di permettere il corretto utilizzo dell'underbasket (Foto 1).



Foto 1. Stazione di monitoraggio del sito SOGENUS.

E' stata redatta, inoltre, una mappa culturale del sito in relazione al raggio esplorato dalle api nella loro attività di bottinamento. Dato che le api bottinano un'area di circa 7 Km² è stata presa in considerazione un'area di raggio 1,5 km a partire dalla stazione di monitoraggio.

BIOMONITORAGGIO DEI PRODOTTI FITOSANITARI

Per rilevare la mortalità delle api, sono state posizionate, di fronte al predellino di volo dell'alveare, due speciali gabbie (di tipo underbasket) per la raccolta delle api morte. Queste ultime all'interno dell'alveare, o ancora moribonde, sono trasportate all'esterno da operaie specializzate nella pulizia dell'arnia (necrofore). L'uso delle underbasket, poste davanti all'alveare, permette quindi il conteggio ed il campionamento dei corpi delle api morte.

Gli alveari sono stati controllati settimanalmente sia per ciò che concerne l'aspetto sanitario che per il conteggio delle api morte.

Al superamento della soglia critica di mortalità (fissata in 200 api morte/settimana/stazione), le api morte, presenti nelle gabbie underbasket, sono state prelevate, conservate in freezer per poi essere liofilizzate e inviate al laboratorio Agrochimico dell'ASSAM di Jesi (AN). I campioni sono stati sottoposti ad analisi sia per individuare l'eventuale principio attivo responsabile dell'apicidiosi che per l'identificazione dei granuli pollinici presenti sul corpo delle api attraverso l'analisi melissopalinologica, in modo da poter localizzare le aree probabilmente inquinate.

BIOMONITORAGGIO DEI METALLI PESANTI

Per il monitoraggio dei metalli pesanti sono stati analizzati, mensilmente (dal 30/04 al 31/10), un campione di miele (circa 70 g) ed un campione di 200 api bottinatrici (campionate nel momento di ritorno all'alveare) (Foto 2). Il miele è stato prelevato e conservato in frigo fino al momento dell'invio al laboratorio Agrochimico dell'ASSAM, mentre le api sono state conservate in freezer e poi liofilizzate.



Foto 2. Prelievo delle bottinatrici per le analisi dei metalli pesanti.

PROTOCOLLO UTILIZZATO PER L'ANALISI DEI METALLI PESANTI, MATRICE API VIVE

Per migliorare la ripetitività delle analisi il campione è stato liofilizzato; in questo modo è stato possibile poi sminuzzarlo e omogeneizzarlo mediante un mortaio. Una

volta omogeneizzato il campione è stato mineralizzato in ambiente acido, secondo il protocollo che segue.

Si pesa 1 g di campione; successivamente si aggiungono 10 mL HNO₃ concentrato + 2 mL H₂O₂. Quindi si procede alla mineralizzazione su piastra con refrigerante a ricadere per 3 ore. Dopo raffreddamento si porta a volume di 25 ml senza filtrare, in quanto il campione si scioglie completamente, e si procede poi all'analisi con l'ICP-AES.

PROTOCOLLO UTILIZZATO PER L'ANALISI DEI METALLI PESANTI, MATRICE MIELE

Il campione viene sciolto a bagnomaria a 40 °C e successivamente mineralizzato per ricercare metalli da quantificare in ICP-AES. La diluizione con acqua è fatta con un rapporto 1:2, in questo modo il campione è omogeneizzato. Il prelievo del miele deve essere fatto sempre con bacchette di vetro o plastica, non si possono utilizzare spatole metalliche.

Si pesano esattamente circa 25 g di campione, ottenuto da entrambe le postazioni in matraccio da 50 ml; si posiziona poi a bagnomaria a 30-40 °C per 15 minuti, quindi in bagno ad ultrasuoni per 15 minuti; si porta a volume di 50 ml esatti in matracci tarati di classe A con acqua bidistillata; il campione diluito viene conservato in frigorifero oppure in congelatore.

La mineralizzazione viene eseguita su piastra riscaldante con refrigerante a ricadere. Si trasferiscono 5 ml di campione diluito 1:2 con acqua, si aggiungono 10 ml di HNO₃ concentrato e 2 ml di H₂O₂, quindi si procede con la mineralizzazione. Dopo il raffreddamento si porta a volume finale di 25 ml senza filtrare.

PROTOCOLLO UTILIZZATO PER L'ANALISI DI PRODOTTI FITOSANITARI SU APE E MIELE

La determinazione dei prodotti fitosanitari è stata effettuata mediante analisi in gascromatografia utilizzando rivelatori specifici (ECD, NPD e GC-MS). Una quota del campione omogeneizzato (miele o api) è stata mescolata con una bustina di Extrelut, contenente circa 10 g di fase solida (terre di diatomee) in un becker, utilizzando una bacchetta di vetro fino al completo inglobamento con la fase solida, che deve mantenere un aspetto polverulento. La miscela è stata trasferita su una cartuccia e l'estrazione effettuata in automatico con ASE (estrazione con solvente accelerato) eluendo con diclorometano. L'estratto è stato poi fatto evaporare, senza alcuna anidificazione, in evaporatore ruotante e ripreso con acetone. Di seguito viene riportato l'elenco dei principi attivi ricercati con i relativi gruppi (Tabella 1):

Tabella 1. Elenco dei principi attivi e relativi gruppi			
Gruppo di p.a.	Principio attivo	Gruppo di p.a.	Principio attivo
fosforati	Acephate	organoclorurati	HCH delta
fosforati	Azinphos-ethyl	organoclorurati	Heptachlor
fosforati	Azinphos-methyl	organoclorurati	Heptachlor A
fosforati	Chlorfenvinphos	organoclorurati	Heptachlor B
fosforati	Chlorpyriphos	organoclorurati	Hexachlorobenzene
fosforati	Chlorpyriphos-methyl	organoclorurati	Lindane
fosforati	Coumaphos	piretroidi	Acrinathrin
fosforati	Diazinon	piretroidi	Alphamethrin

fosforati	Dichlorvos	piretroidi	Bifenthrin
fosforati	Dimethoate	piretroidi	Cyfluthrin
fosforati	Fenamiphos	piretroidi	Cypermethrin
fosforati	Fenitrothion	piretroidi	Deltamethrin
fosforati	Fenthion	piretroidi	Esfenvalerate
fosforati	Fonofos	piretroidi	Fenpropathrin
Gruppo di p.a.	Principio attivo	Gruppo di p.a.	Principio attivo
fosforati	Forate	piretroidi	Fenvalerate
fosforati	Formothion	piretroidi	Flucythrinate
fosforati	Fosalone	piretroidi	Fluvalinate
fosforati	Fosfamidone	piretroidi	Lambda-Cialotrina
fosforati	Heptenophos	piretroidi	Permethrin
fosforati	Malathion	triazolici e pirimidine	Bitertanol
fosforati	Methamidophos	triazolici e pirimidine	Bromuconazolo
fosforati	Methidathion	triazolici e pirimidine	Bupirimate
fosforati	Omethoate	triazolici e pirimidine	Cyproconazole
fosforati	Parathion ethyl	triazolici e pirimidine	Cyprodinil
fosforati	Parathion methyl	triazolici e pirimidine	Diclobutrazol
fosforati	Pirimiphos-methyl	triazolici e pirimidine	Esaconazolo
fosforati	Pyrazophos	triazolici e pirimidine	Fenarimol
fosforati	Pyridaphenthion	triazolici e pirimidine	Fenbuconazolo
fosforati	Quinalphos	triazolici e pirimidine	Fludioxonil
fosforati	Tolclofos-methyl	triazolici e pirimidine	Flusilazole
fosforati	Trichlorphon	triazolici e pirimidine	Flutriafol
fosforati	Vamidothion	triazolici e pirimidine	Myclobutanil
organoclorurati	2,4 DDT	triazolici e pirimidine	Nuarimol
organoclorurati	4,4 DDE	triazolici e pirimidine	Penconazole
organoclorurati	4,4 DDT	triazolici e pirimidine	Prochloraz
organoclorurati	Aldrin	triazolici e pirimidine	Propiconazole
organoclorurati	Dieldrin	triazolici e pirimidine	Pyrimethanil
organoclorurati	Endosulfan (α e β)	triazolici e pirimidine	Tebuconazole
organoclorurati	Endosulfan sulphate	triazolici e pirimidine	Tetraconazole
organoclorurati	Endrin	triazolici e pirimidine	Triadimefon
organoclorurati	HCH alfa	triazolici e pirimidine	Triadimenol
organoclorurati	HCH beta		

VALORI DI RIFERIMENTO

I risultati ottenuti dalle analisi dei metalli pesanti di entrambe le matrici (api vive e miele) sono stati messi a confronto con valori di riferimento che derivano dall'elaborazione statistica di tutti i dati ottenuti dal gruppo di ricerca del DiSTA (Università degli Studi di Bologna) nel corso delle campagne di monitoraggio effettuate dal 1986. Al fine però di avere dei valori di riferimento sempre aggiornati, per la loro definizione sono stati presi in considerazione solo i dati degli ultimi 10 anni. In questo modo tali valori si adattano automaticamente ai cambiamenti socio-economico-ambientali (Porrini *et al.*, 2002).

I dati ottenuti nel corso della sperimentazione, tramite l'analisi chimica, sono stati confrontati con i valori di riferimento riportati in Tabella 2 e sono stati classificati come:

- basso, se inferiore al primo livello di riferimento;

- medio, se fra i due riferimenti;
- alto, se superiore al secondo livello di riferimento.

Tabella 2. Valori di riferimento minimo e massimo espressi in mg/kg		
Elemento	Matrice ape	Matrice miele
Cadmio (Cd)	0,050 – 0,100	0,004 – 0,010
Cromo (Cr)	0,040 – 0,120	0,010 – 0,020
Nichel (Ni)	0,100 – 0,300	0,020 – 0,200
Piombo (Pb)	0,300 – 0,700	0,010 – 0,050

RISULTATI

Risultati campionamento sulle api morte.

I controlli settimanali, condotti per rilevare la mortalità delle api nei due alveari della stazione del sito SOGENUS, durante la stagione 2013 (dall'3 maggio al 25 ottobre), non hanno mai evidenziato un superamento della soglia (200 api morte/settimana/stazione). Nella Figura 3 viene rappresentato l'andamento del numero di api morte prelevate nelle gabbie underbasket, divisa per alveari (A e B).

Considerando che le analisi per la ricerca dei prodotti fitosanitari sono previste soltanto in caso di superamento della soglia limite, in questa stagione non sono state eseguite tali tipologie di analisi.

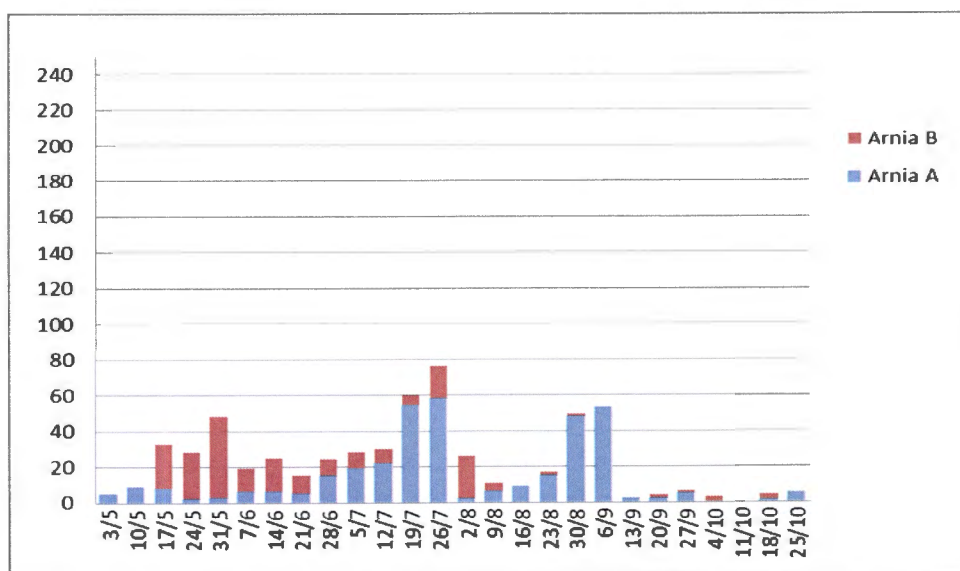


Figura 3. Andamento mortalità api prelevate nelle gabbie underbasket, divisa per alveari (A e B), SOGENUS 2013. Sull'asse delle ordinate vengono riportati il numero degli individui di api morte mentre sulle asse delle ascisse le date di campionamento.

Risultati analisi metalli pesanti matrice api vive.

Dalle analisi condotte in laboratorio per valutare la presenza di residui di metalli pesanti nella matrice api vive, raccolta mensilmente dal 30 aprile al 31 ottobre 2013, è stato possibile riscontrare i valori riportati in Tabella 3 e Figura 4.

Tabella 3. Risultati analisi metalli pesanti matrice api vive (unità di misura mg/kg).

Elemento	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Sett	Ott	media
Cd	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01
Cr	0.07	0.03	n.r.*	n.r.*	n.r.*	0.04	n.r.*	0.05
Ni	0.14	0.09	0.05	0.12	0.08	0.11	0.02	0.09
Pb	0.04	0.10	n.r.*	n.r.*	0.21	0.03	n.r.*	0.09

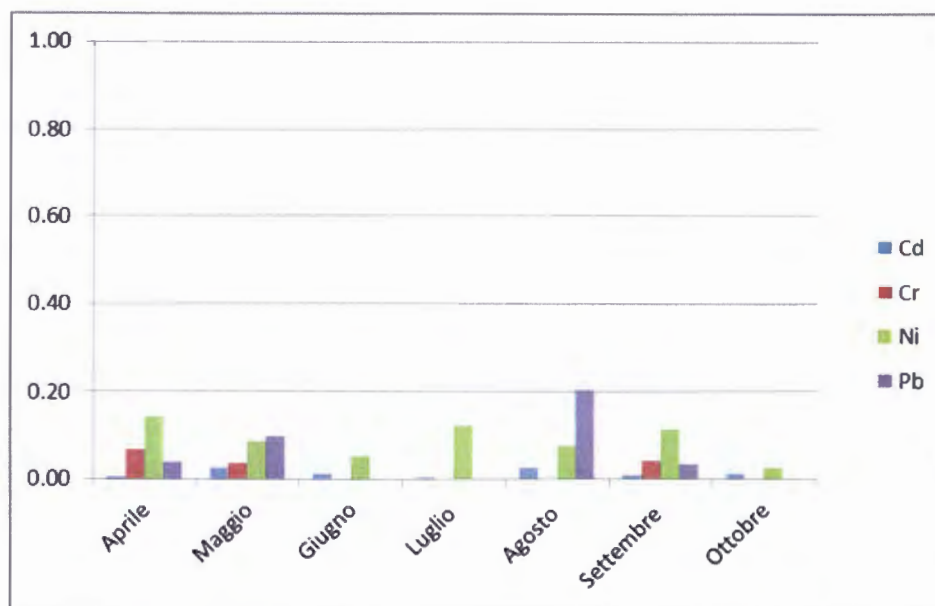


Figura 4. Risultati analisi metalli pesanti (Cd, Cr, Ni, Pb), matrice api vive, SOGENUS 2013. Sull'asse delle ordinate vengono riportati i valori dei metalli pesanti rilevati (mg/Kg) mentre sull'asse delle ascisse i mesi (date) di campionamento.

I risultati medi stagionali ottenuti dalle analisi dei metalli pesanti della matrice api vive, come da protocollo, sono stati messi a confronto con valori di riferimento. Si osserva dunque che cadmio, nichel e piombo presentano valori bassi (inferiori al primo livello di riferimento), mentre il cromo presenta valori bassi (rientrano nel range di riferimento) (Tabella 4).

Tabella 4. Medie dei valori dei metalli pesanti (matrice api vive) a confronto con i valori di riferimento

Elemento	Valori di riferimento	SOGENUS 2013	
	(mg/Kg)	(mg/Kg)	Classe
Cadmio (Cd)	0,05 - 0,10	0.01	Basso
Cromo (Cr)	0,04 - 0,12	0.05	Medio
Nichel (Ni)	0,10 - 0,30	0.09	Basso
Piombo (Pb)	0,30 - 0,70	0.09	Basso

Risultati analisi metalli pesanti, matrice miele

Dalle analisi condotte in laboratorio per valutare la presenza di residui di metalli pesanti nella matrice miele, raccolta mensilmente dal 30 aprile al 31 ottobre 2013, è stato possibile riscontrare i valori riportati in Tabella 5 e Figura 5.

Elemento	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Sett	Ott	media
Cd	n.r.*	n.r.*	n.r.*	n.r.*	n.r.*	n.r.*	n.r.*	<i>n.r.*</i>
Cr	0.03	n.r.*	n.r.*	n.r.*	n.r.*	n.r.*	n.r.*	<i>0.03</i>
Ni	0.01	0.03	0.05	0.01	0.00	0.04	0.03	<i>0.02</i>
Pb	n.r.*	0.04	n.r.*	n.r.*	0.03	n.r.*	n.r.*	<i>0.04</i>

*n.r.= inferiore al limite di rilevabilità dello strumento

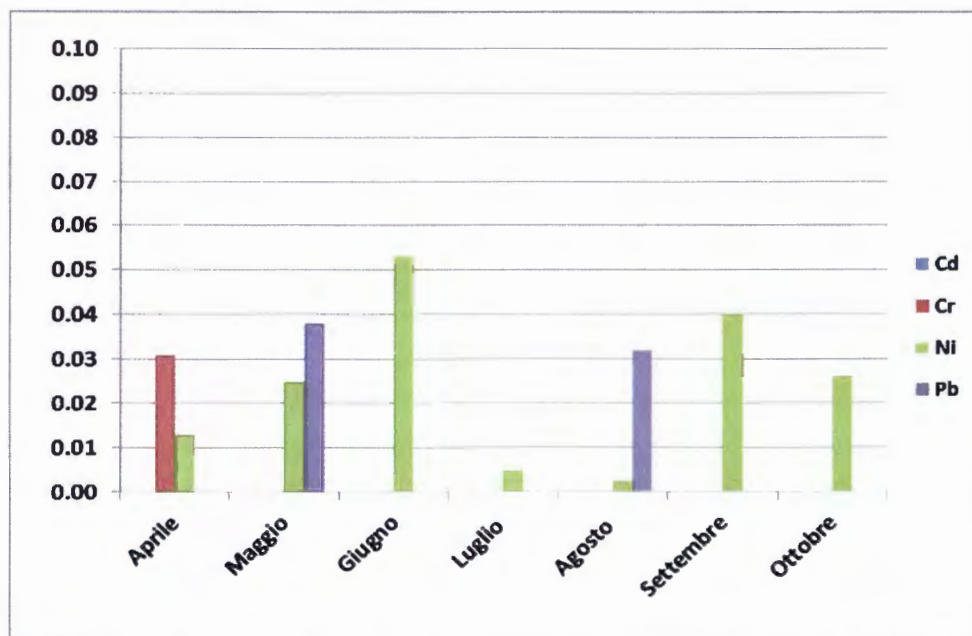


Figura 5. Risultati analisi metalli pesanti (Cd, Cr, Ni, Pb), matrice miele, SOGENUS 2013. Sull'asse delle ordinate vengono riportati i valori dei metalli pesanti rilevati (mg/kg), mentre sull'asse delle ascisse i mesi (date) di campionamento.

I risultati medi stagionali ottenuti dalle analisi dei metalli pesanti della matrice miele, come da protocollo, sono stati messi a confronto con valori di riferimento (Tabella 6). Si osserva dunque che il cadmio e il nichel presentano valori bassi (inferiori al primo livello di riferimento), il cromo e il piombo presentano valori medi (rientrano nel range di riferimento).

Elemento	Valori di riferimento	SOGENUS 2013	
	(mg/Kg)	(mg/Kg)	Classe
Cadmio (Cd)	0,00 – 0,01	<i>n.r.*</i>	Basso
Cromo (Cr)	0,01 – 0,03	<i>0.03</i>	Medio
Nichel (Ni)	0,02 – 0,20	<i>0.02</i>	Basso
Piombo (Pb)	0,01 – 0,05	<i>0.04</i>	Medio

*n.r.= inferiore al limite di rilevabilità dello strumento

Realizzazione mappa culturale

È stata realizzata la mappa culturale considerando un'area di raggio di 1,5 km quindi una superficie totale di 7 km². Dalla figura 6 possiamo notare gli appezzamenti di terreno con le relative colture circoscritte nell'areale presenti nella stagione 2013. Nell'area sono presenti estese macchie di *Hedysarum coronarium* che cresce su zone calanchifere argillose; lungo i fossi troviamo *Sambucus nigra*, *Quercus robur* e *Robinia*. Per quanto riguarda le colture agrarie sono presenti soprattutto Graminacee, Brassicacea, *Heliantus*, *Allium* e *Vitis*.

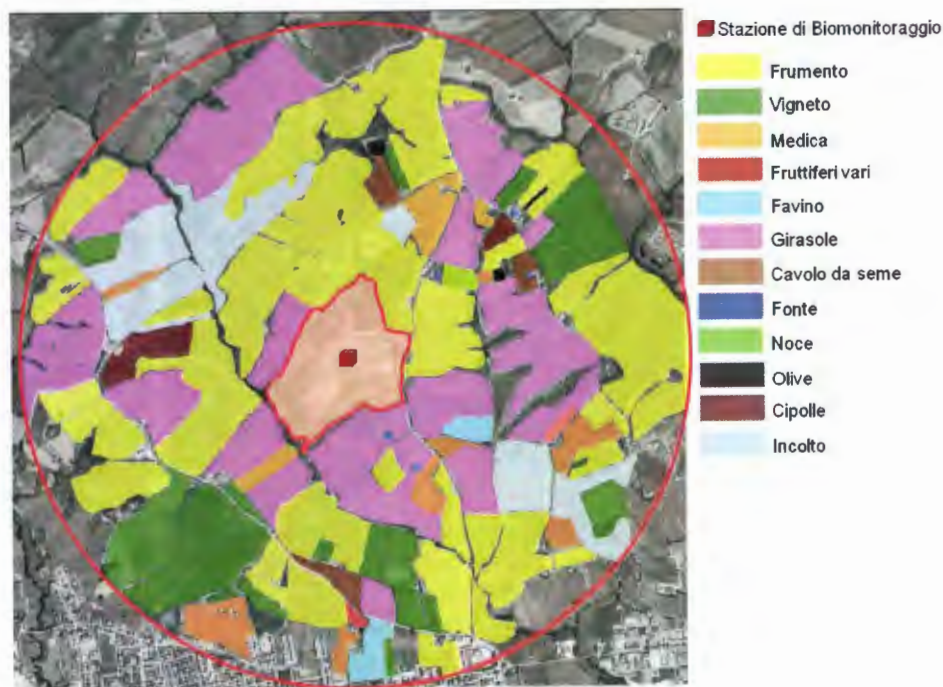


Figura 6. Mappa culturale del sito SOGENUS, Moie – Maiolati Spontini (AN), anno 2013.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- KUMP P., NECEMER M., SNAJDER J., 1996. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta, partB*, 51: 499-507.
- PORRINI C., GHINI S., GIROTTI S., SABATINI A.G., GATTAVECCHIA E., CELLI G., 2002. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: *Honey bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals* (Devillers J. and Pham – Delègue M.H. Eds). Taylor & Francis, London: 186-247.
- ROMAN A., 2005. The influence of environment on accumulation of toxic element in honey bees' body. *ISAH*, vol. 2: 423-426.
- STANCHER B., CALABRESE M., 2003. Studio sulla presenza di alcuni metalli pesanti nel miele prodotto nella provincia di Trieste. *Industrie alimentari*, XLIV: 1121-1126.
- SZYMANOWSKA-BIELAWSKA K., 1981. Zawartosc zwiaskow mineralnych w ciele pszczoly miodnej (*Apis mellifica* L.). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*: 25.
- ZANOLLI P., BARBATTINI R., FRILLI F., GAZZIOLA F., 2007. Analisi del miele della città di Udine: sorgenti mellifere e inquinamento ambientale. *Apoidea*, Vol. 4: 82-94.