



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**



**Facultad de Ciencias**  
Programa de Maestría en  
Ciencias Ambientales

Tesis

# **Evaluación de apiarios como herramienta ecotoxicológica**

Estudiante: Lic. BQ. Pilar Ojeda Ojeda

Tutor: PhD Leonidas Carrasco-Letelier

# Índice

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
AGRICULTURIZACIÓN.....	6
EL AGROECOSISTEMA Y LOS POLINIZADORES.....	7
LAS ABEJAS MELIFERAS (APIS MELLIFERA) COMO BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL.....	8
MIEL.....	9
MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS .....	10
EVALUACIÓN DE LA MORTALIDAD EN ENSAYOS DE CAMPO. TRAMPAS PARA ABEJAS MUERTAS .....	12
EVALUACIÓN DE MORTALIDAD EN ENSAYOS DE LABORATORIO. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA.....	14
EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LOS PLAGUICIDAS PARA LAS ABEJAS. NORMATIVAS VIGENTES.....	15
OBJETIVOS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
MATERIALES Y METODOS .....	21
ÁREA DE ESTUDIO .....	21
EFICIENCIA DE COLECTA DE ABEJAS MUERTAS CON DIFERENTES TIPOS DE TRAMPAS .....	24
EFICIENCIA DE COLECTA DE LA TRAMPA “UNDERBASKET” EN EL TIEMPO .....	27
DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD NATURAL DIARIA DE ABEJAS EN UN APIARIO EXPERIMENTAL .....	28
MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS UBICADOS EN LA REGIÓN LITORAL OESTE DEL PAÍS. ....	29
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y CONTENIDO DE SO <sub>2</sub> EN MIEL..	30
TOXICIDAD AGUDA EN ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS POR CONTACTO A INSECTICIDAS .....	31
ANÁLISIS DE DATOS .....	32
RESULTADOS.....	33
EFICIENCIA DE COLECTA DE ABEJAS MUERTAS CON DIFERENTES TIPOS DE TRAMPAS ..	33
EFICIENCIA DE COLECTA DE LA TRAMPA “UNDERBASKET” EN EL TIEMPO .....	38

DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD NATURAL DIARIA DE ABEJAS EN UN APIARIO EXPERIMENTAL .....	41
MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS UBICADOS EN LA REGIÓN LITORAL OESTE DEL PAÍS. ....	42
LA MIEL COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR SO <sub>2</sub> .....	44
TOXICIDAD AGUDA EN ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS POR CONTACTO A INSECTICIDAS .....	48
DISCUSIÓN .....	51
EFICIENCIA DE COLECTA DE ABEJAS MUERTAS CON DIFERENTES TIPOS DE TRAMPAS .	51
EFICIENCIA DE COLECTA DE LA TRAMPA “UNDERBASKET” EN EL TIEMPO .....	53
DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD NATURAL DIARIA DE ABEJAS EN UN APIARIO EXPERIMENTAL .....	53
MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS UBICADOS EN LA REGIÓN LITORAL OESTE DEL PAÍS. ....	54
LA MIEL COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR SO <sub>2</sub> .....	58
TOXICIDAD AGUDA EN ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS POR CONTACTO A INSECTICIDAS .....	62
BIBLIOGRAFIA.....	69
ANEXOS .....	82

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a toda mi familia, a mi esposo Enzo y a mi hijo Valentino. A Miriam Ojeda, mi madre, quien ha sido pilar fundamental en mi vida personal y profesional. A Daniel Inzaurrealde por su apoyo incondicional en todo momento. También quiero agradecer a mi amiga Msc Silvia Villar quien me ha acompañado en este largo viaje y ha contribuido en gran forma con este trabajo. A mi amigo Gustavo Ramallo, asistente de investigación en la Unidad de Apicultura - INIA La Estanzuela, quien me brindó sus conocimientos en el manejo de las colmenas. A los demás integrantes de la Unidad de Apicultura por su apoyo técnico. Por último, quiero agradecer al Programa de Maestría en Ciencias Ambientales y a los integrantes de su Comisión por el apoyo brindado en los momentos difíciles.

Esta tesis de maestría fue financiada por el proyecto INIA SA07 “Herramientas para la producción y sustentabilidad de cuencas de aptitud forestal”.

## RESUMEN

En los últimos años ha ocurrido en Uruguay un fuerte proceso de expansión de la actividad agrícola y forestal en la región litoral oeste. Ejemplo de ello, es el incremento de las áreas de cultivos de soja y de eucaliptus. A esto se agrega, el inicio de la industrialización de la madera con la incorporación de una fábrica de pulpa de celulosa blanqueada en Fray Bentos. Este aumento de la antropización del paisaje puede alterar la calidad ambiental en un sentido y magnitud desconocido. En el litoral, la actividad apícola es de gran importancia económica, con producción de mieles de alta calidad. El objetivo del presente trabajo de investigación, fue validar el empleo de abejas melíferas (*Apis mellifera*) como bioindicadores de la calidad ambiental en la región litoral oeste del país. Las abejas revelan el deterioro del ambiente donde viven a través de dos señales: la mortalidad y la presencia de residuos en su organismo o en los productos de la colmena (miel, cera, propóleos). El método de monitoreo estándar de la mortalidad en campo involucra el uso de trampas, por lo que se evaluó la eficiencia de colecta y retención de abejas muertas de diferentes tipos de trampas con el fin de seleccionar la más adecuada. La trampa “underbasket” resultó ser la más apropiada para determinar los niveles de mortalidad diaria y semanal. No obstante, los resultados preliminares muestran que el nivel de mortalidad semanal en colmenas ubicadas en las localidades de Juan Lacaze y Fray Bentos no sería un parámetro adecuado para evaluar la exposición local a dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en la región litoral oeste del país. Por otra parte, la miel demostró ser un bioindicador prometedor para estimar la calidad ambiental en torno a la colmena en esta región.

Por último, la evaluación de la mortalidad de abejas en laboratorio debido a la exposición aguda por contacto (ensayos de toxicidad aguda) a los principales insecticidas empleados en los cultivos de soja del litoral oeste mostró diferencias claras en cuanto a la sensibilidad toxicológica entre el biotipo de abeja nacional y los biotipos empleados en las evaluaciones internacionales del hemisferio norte. Esto deja en claro la necesidad de generar información básica local sobre la toxicidad de los insecticidas en uso actualmente en el país tanto en ensayos de laboratorio como en campo.

# INTRODUCCIÓN

## AGRICULTURIZACIÓN

El sector primario de la economía normalmente basa su rentabilidad en el uso y/o explotación de bienes y servicios ecosistémicos los cuales, en general, no tienen un precio asignado por el mercado (regulación de la composición atmosférica, reciclado de nutrientes, biodiversidad, polinización de cultivos, producción de agua potable, mantención de la fertilidad de los suelos, etc.). El balance costo-beneficio de las actividades del sector primario (madera, carne, producción de granos, leche, frutas, miel, etc.) permanecen positivas, hasta que la depreciación y destrucción de los bienes y servicios del sector pre-primario alcanza niveles demasiado altos (Sejenovich & Panario, 1998).

La conversión de los pastizales nativos o los bosques lluviosos (ejemplos, el Cerrado, los Llanos y la Pampa) en áreas de cultivo y ranchos ganaderos es una de las mayores amenazas a la biodiversidad terrestre y una de las claves de la crisis de extinción global. La conversión causa una disminución brusca de la biodiversidad, con la extinción de la mayoría de las especies que se encuentran en los pastizales y bosques naturales. También provoca una dramática liberación de dióxido de carbono que puede tomar décadas o siglos recuperar de la atmósfera. Otros problemas ambientales asociados a la conversión incluyen la producción de ozono a nivel del suelo en concentraciones que pueden amenazar la salud humana, erosión masiva del suelo, pérdida de recursos hídricos a través de la disminución de las lluvias, efectos de borde que perturban el clima dentro de los bloques de bosques remanentes y una exacerbación de los efectos del cambio climático global (Edwards & Laurance, 2012).

Los cultivos que se expanden más rápidamente en términos de área cultivada en la actualidad son la soja, la caña de azúcar, el cacao, la palma (*Elais guineensis*) y los cultivos de bosques para la producción de pulpa de papel (típicamente *Acacia*, *Albizia* y *Eucalyptus*) (Edwards & Laurance, 2012).

En Uruguay, de forma similar a lo ocurrido en la pampa húmeda Argentina, el proceso de agriculturización se está dando por el incremento de las áreas de cultivo de soja

(Manuel-Navarrete *et al.*, 2005). Las mismas, han alcanzado 862.100 há en el año agrícola 2010/11 principalmente en el litoral oeste del país (DIEA, 2011a). El proceso de agriculturización lo ha definido CEPAL como “...un uso creciente y continuo de las tierras para cultivos agrícolas en lugar de usos ganaderos o mixtos...” (Manuel-Navarrete *et al.*, 2005). Este proceso normalmente se asocia con una intensificación del paquete tecnológico de la revolución verde, es decir, incremento de la ganadería en encierro, expansión de la agricultura hacia tierras anteriormente consideradas marginales e incremento de la tecnificación en producciones orientadas a la rotación trigo-soja (Manuel-Navarrete *et al.*, 2005).

A este escenario se agrega un incremento de la demanda por la producción de madera, destinada a la fábrica de pulpa de celulosa blanqueada ubicada en Fray Bentos.

## EL AGROECOSISTEMA Y LOS POLINIZADORES

La destrucción del ambiente más allá de sus capacidades de recuperación y reposición se expresa en características patológicas del ecosistema, e indeseable para la población humana (Manuel-Navarrete *et al.*, 2005), ejemplo de esto son: la pérdida de calidad y cantidad de agua (Gordon *et al.*, 2010), la degradación del suelo y destrucción de la fauna benéfica (Bedano *et al.*, 2006; Bedano *et al.*, 2011), la reducción o pérdida del control sobre especies patógenas o dañinas (Sandermann, 2006; Binimelis *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009), la reducción de la biodiversidad florística (Rodríguez & Jacobo, 2010) y la pérdida de capacidades de polinización natural (Potts *et al.*, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

A pesar de que los agentes polinizadores no son el blanco de los diferentes plaguicidas usados en la protección de los cultivos, son ampliamente afectados por éstos (Devillers, 2002). Los insecticidas y herbicidas reducen las poblaciones de abejas melíferas (*Apis mellifera*) por dos vías: directa, muchos de los insecticidas empleados en los cultivos son altamente tóxicos para estos organismos; e indirecta, el uso de herbicidas puede reducir la oferta floral por unidad de área para el pecoreo de las abejas. La actividad tóxica de los plaguicidas puede darse por ingesta de néctar o polen contaminado, envenenamiento por contacto cuando vuelan a través de una nube de plaguicida o al caminar sobre partes tratadas de una planta (Devillers, 2002). Las colonias en las

colmenas pueden ser afectadas directamente por los plaguicidas, pero con mayor frecuencia sólo las abejas pecoreadoras mueren en campo o sus funciones fisiológicas se ven afectadas. Sin embargo, si las abejas pecoreadoras mueren son reemplazadas por abejas jóvenes lo cual conduce en forma continuada al despoblamiento de la colmena (Kevan *et al.*, 1990; Devillers, 2002).

La toxicidad de un insecticida específico es resultado de sus propiedades fisicoquímicas, de la formulación, el método de aplicación en campo y de la capacidad de detoxificación de las abejas. Así, los insecticidas organofosforados y carbámicos actúan sobre el sistema nervioso de las abejas provocando problemas de regurgitación, abdomen distendido, comportamientos agresivos, movimientos erráticos, inhabilidad para volar, desorientación, letargo, parálisis, morbilidad y muerte. Los piretroides, por su parte, inducen movimientos erráticos, inhabilidad para volar, estupefacción seguido muy a menudo, por parálisis, morbilidad y muerte. Los compuestos organoclorados, actúan como agentes neuroactivos sobre la transmisión de los impulsos nerviosos induciendo movimientos erráticos, actividad anormal y temblores (Devillers, 2002). Por su parte, los insecticidas reguladores del crecimiento (IGRs) del tipo benzoilurea (inhibidores de la síntesis de quitina) son considerados relativamente seguros para las abejas. Sin embargo, a altas dosis estos compuestos pueden ser también perjudiciales para las especies *A. cerana* y *A. mellifera* en etapa adulta (Gupta & Chandel, 1995).

#### LAS ABEJAS MELIFERAS (*APIS MELLIFERA*) COMO BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL

La idea de emplear abejas melíferas en el monitoreo ambiental no es nueva. J. Svoboda, en 1935, sugirió que estos insectos podían brindar datos valiosos sobre el impacto ambiental de ciertas industrias en determinadas áreas. Veinticinco años más tarde dicho autor reportó, vía monitoreo con abejas, un incremento en el ambiente del radionucleido estroncio 90. Desde 1970, se ha incrementado el empleo de abejas en el monitoreo de contaminación ambiental por metales pesados, plaguicidas, radionucleidos entre otros (Porrini *et al.*, 2002; Devillers *et al.*, 2002, Ponikvar *et al.*, 2005).

Además de su importancia ecológica, las abejas son organismos centinela que presentan una serie de características etológicas y morfológicas que los hacen buenos indicadores

biológicos. Son fáciles de producir en condiciones controladas y manipular, tienen una amplia distribución, son organismos ubicuos con bajos requerimientos alimenticios, su ciclo biológico es relativamente corto y particularmente, bien conocido (Devillers, 2002). Sumado a lo anterior, presentan una gran movilidad y alcance de vuelo, por lo que monitorean extensas áreas. Comúnmente pecorean en un radio de 1.5 km de distancia a partir de su colmena y excepcionalmente, a 10-12 km de distancia dependiendo de sus habilidades y las necesidades de alimento (Devillers, 2002a). Durante estos vuelos de pecoreo, muestrean al azar el ambiente recogiendo néctar, polen, mieladas, resinas y agua. Además, colectan partículas de polvo de diversos orígenes en los pelos de sus cuerpos (Devillers, 2002a). Es importante destacar que las abejas solo colectan los contaminantes biodisponibles, como consecuencia, revelan el deterioro químico del ambiente donde viven a través de diferentes señales como la alta mortalidad, cambios comportamentales y la presencia de residuos en sus cuerpos o en los productos de la colmena (miel, cera, propóleos) (Devillers, 2002; Porrini *et al.*, 2002; Ghini *et al.*, 2004; Decourtye *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008).

## MIEL

La miel es un producto natural elaborado por las abejas a partir de néctar (miel de néctar), secreciones de partes de la planta y excreciones de insectos chupadores (miel de mielada). Es un indicador ambiental válido, que cumple con varios de los requisitos exigidos y presenta ciertas ventajas como el fácil manejo y obtención, bajo costo y muestreo selectivo limitado a un área de varios kilómetros cuadrados. Las abejas pecorean en una gran diversidad de lugares interactuando fuertemente con el ambiente en torno a la colmena. Las concentraciones de los contaminantes en la miel reflejan exposición sobre las plantas que pecorean, la atmósfera, y el suelo del área en la cual se ubica la colmena (Rodríguez *et al.*, 2006).

La miel ha sido empleada para biomonitorrear la distribución y el impacto de diversos contaminantes incluyendo dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) (Porrini *et al.*, 2002; Ponikvar *et al.*, 2005).

Como fue mencionado anteriormente, en la región litoral oeste del país, se ha incrementado la silvicultura. Uruguay tiene una superficie total de bosque de 1.722 mil

hectáreas, de las cuales 676 mil hectáreas corresponden a plantaciones de eucaliptos (DIEA, 2010). La madera de eucalipto es usada para la producción de pulpa de papel y papel con muy buenas características en términos de fuerza y blancura (Bordado & Gomes, 1997). La producción de pulpa de papel por el proceso Kraft genera emisiones atmosféricas compuestas principalmente por polvos, sólidos particulados, vapor de agua, monóxido de carbono, dióxido de carbono, dióxido de azufre, óxido de nitrógeno, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos tales como metilmercaptano, dimetilmercaptano y dimetildisulfuro. El dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) es emitido como un producto de oxidación formado en la caldera de recuperación donde se quema el licor negro para generar vapor de alta presión utilizado para cubrir las necesidades de vapor de la planta o para la generación de energía eléctrica (Bordado & Gomes, 1997).

## MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS

La evaluación de la mortalidad es un parámetro fundamental para garantizar un monitoreo del ambiente confiable con las abejas como bioindicador (Porrini *et al.*, 2002; Celli & Maccagnani, 2003).

Para poder asegurar que un cierto nivel de mortalidad es alto se debe determinar, en primer lugar, el nivel de mortalidad natural. Sin embargo, existen ciertas dificultades en la determinación de la mortalidad natural debido a variaciones que responden a tres órdenes: 1- variaciones estacionales, 2- variaciones de un año a otro y 3- variaciones de una colmena a otra.

El ciclo de vida de las abejas parece estar relacionado con la estacionalidad. En términos generales, las abejas viven más tiempo durante los meses de invierno. Así, la mortalidad de abejas sería menor durante estos meses (Michener, 1974; Winston, 1987; Seeley, 1995). En promedio la duración de la vida de las obreras durante el invierno está entre 100-150 días mientras que, en verano puede variar entre 6 y 42 días (Winston & Fergusson, 1985). Las diferencias en cuanto a la duración de la vida de las obreras que se observa entre diferentes estudios, puede deberse en parte a la habilidad de las colonias para comprimir o expandir la duración de la actividad de las obreras para adecuarlas a las condiciones de la colonia o influencias externas (Winston & Fergusson, 1985).

Las variaciones ambientales de un año a otro también afectan la mortalidad natural. Dado que en un mismo año, la estación influye en la duración de la vida de las obreras, es esperable que de un año a otro las variaciones observadas reflejen las del clima (Michener, 1974; Winston, 1987; Seeley, 1995). Extensos periodos de bajas o altas temperaturas y de lluvias han constituido la causa de casos graves de mortalidad de colmenas en el pasado (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Los apicultores han identificado al clima invernal severo como el cuarto contribuyente más importante en la mortalidad de colmenas durante el invierno en los Estados Unidos. El clima puede tener un efecto directo sobre la productividad de la colonia. Por ejemplo, altas temperaturas ambientales tienden a incrementar la productividad de la colonia porque reducen las demandas metabólicas de las obreras, mientras que largos periodos de lluvia o bajas temperaturas tienen un efecto en detrimento de la productividad ya que las obreras permanecen en la colmena (vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

Los efectos más significativos de las condiciones climáticas sobre la productividad de la colonia, tanto positivos como negativos, son indirectos. Las altas temperaturas y las precipitaciones adecuadas se correlacionan con el incremento en la producción de néctar. A la inversa, lluvias insuficientes o bajas temperaturas, pueden tener efectos negativos sobre la producción de la colonia. En el noreste de los Estados Unidos, una prolongada sequía de verano o lluvias persistentes en otoño causan una menor sobrevivencia de las colmenas durante el invierno dado que impiden que la vegetación de otoño produzca las cantidades habituales de polen y néctar. La disminución de las reservas de polen en el otoño induce el cese temprano de cría del nido, lo que tiene como consecuencia el desarrollo prematuro de las obreras de invierno. Las colonias que contienen abejas obreras de invierno desarrolladas en forma temprana debido a la escasez de polen, es menos probable que sobrevivan al invierno que aquellas colonias que criaron las abejas obreras de invierno en forma más tardía (vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

Las condiciones climáticas también pueden tener efectos sobre la carga de patógenos dentro de las colonias. Por ejemplo, la temperatura y la humedad tienen un efecto directo sobre el crecimiento de las poblaciones del ectoparasito *Varroa destructor*, el microsporidio *Nosema ceranae* y del hongo *Ascosphaera apis* causante de la

enfermedad conocida como cría yesificada (Bailey & Ball, 1991; Fries, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

En cuanto a las variaciones en la mortalidad asociadas a las características propias de las colonias, se han llevado a cabo varios estudios comparativos entre abejas africanizadas y europeas para determinar la longitud de vida promedio de sus obreras. Se ha establecido en la literatura que las abejas africanizadas tienen una duración de vida más corta que las abejas europeas, sin embargo, no hay datos concluyentes que soporten tal afirmación (Winston *et al.*, 1981; Becerra-Guzmán *et al.*, 2005).

La evaluación de la mortalidad en colonias de abejas adquiere particular significado no sólo en ciertas áreas de estudio como la toxicología (determinación del riesgo de plaguicidas en ensayos de campo, semi-campo y laboratorio), sino también en estudios ecológicos basados en técnicas de investigación ambiental que utilizan a la abeja como bioindicador (Porrini *et al.*, 2000).

## EVALUACIÓN DE LA MORTALIDAD EN ENSAYOS DE CAMPO. TRAMPAS PARA ABEJAS MUERTAS

El método de monitoreo estándar de la mortalidad en colonia de abejas involucra el uso de trampas para capturar las abejas muertas. En la actualidad, se han desarrollado diferentes tipos de trampas para abejas muertas que permiten detectar eventos de mortalidad importantes y así, dar inicio a los análisis químicos necesarios para determinar el agente causante de dicho evento.

Las abejas necróforas son abejas obreras especializadas en remover los individuos muertos (necroforesis) del interior de la colmena (Mayer *et al.*, 1980; Pérez *et al.*, 2001; Illies *et al.*, 2002; Porrini *et al.*, 2003; Hendriksma & Hartel, 2010). El comportamiento necróforo es una adaptación esencial a la vida social en nidos cerrados. Para reconocer los cadáveres dentro del nido, las abejas obreras probablemente usen señales químicas que aparecen rápidamente después de la muerte de la abeja (Visscher, 1983). Se observa un comportamiento diferencial de las abejas necróforas con respecto al peso de los objetos. Primeramente, los objetos pesados tales como los cuerpos frescos de abejas muertas son abandonados a la salida de la colmena. Posteriormente, la actividad de

limpieza secundaria incluye la remoción de estas abejas muertas parcialmente secas, y por tanto mucho más livianas, a varios cientos de metros lejos de la colmena.

Las trampas deben tomar en cuenta ambos comportamientos de limpieza para coleccionar todos los cuerpos frescos y prevenir la posterior remoción de los cuerpos secos de la trampa (Pérez *et al.*, 2001). Así, los diferentes tipos de trampas deben cumplir con ciertos requisitos como ser: 1- coleccionar el cuerpo de la abeja muerta con eficiencia y mantenerlo en el tiempo, 2- ser resistente a los eventos meteorológicos, 3- no interferir con la actividad de las abejas, 4- ser fácilmente aplicable y ensamblable y 5- tener bajo costo de construcción (Porrini *et al.*, 2000).

Existe un gran número de trampas que se han usado en investigaciones prácticas como la estimación del riesgo de ciertos plaguicidas para las abejas. Entre las trampas más usadas están la trampa “Gary”, la trampa “Todd” y la trampa “underbasket” (Illies *et al.*, 2002). La trampa “underbasket” consiste básicamente en un marco de madera equipada con una red de diferente malla en la parte superior e inferior. Se ubica en el suelo frente a la piquera por lo que no forma un cuerpo único con la colmena. Las trampas “Gary” y “Todd” consisten básicamente en una caja ubicada a la entrada de la colmena que colecciona las abejas muertas retiradas por las necróforas y las protege de los predadores. Las abejas pueden salir o entrar en la trampa “Gary” a través de dos ranuras en la parte superior de la misma. Una de las ranuras está situada cerca de la entrada a la colmena y las abejas la utilizan durante las actividades regulares de vuelo. La otra ranura es usada principalmente como una trampa de salida. En la base de la trampa “Gary”, debajo de esta ranura se insertan dos jarras de vidrio para coleccionar las abejas muertas. Ambos tipos de trampas, perturban la actividad normal de la colonia (Pérez *et al.*, 2001; Illies *et al.*, 2002). Porrini *et al* (2000) diseñaron un tipo de trampa denominada “de barrera”, ya que las abejas necróforas son obligadas a salir por pequeños orificios en la parte anterior de la trampa, dejando caer los cuerpos de las abejas muertas en un compartimento ubicado en la parte inferior de la misma. Esta trampa se aplica directamente a la entrada de la colmena por lo que es percibida por las abejas como parte de la misma (Porrini *et al.*, 2000).

## EVALUACIÓN DE MORTALIDAD EN ENSAYOS DE LABORATORIO.

### ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

La agricultura intensiva se caracteriza por la alta productividad, alto aporte de plaguicidas y fertilizantes, baja proporción de praderas permanentes, incremento de la mecanización y el tamaño de chacras y simplificación de la rotación de cultivos (Tinker, 1997; Le Féon *et al.*, 2010). Estos cambios en el ambiente tienen efectos negativos sobre los insectos polinizadores (Dale & Polasky, 2007; Kuldna *et al.*, 2009; Brittain *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010).

En la agricultura moderna, los plaguicidas sintéticos continúan siendo la principal línea de defensa en la mayoría de los programas de manejo de plagas. El objetivo expreso de los insecticidas es “matar a las plagas”, sin embargo, pueden tener impactos letales o subletales sobre organismos no blancos (organismos que reciclan nutrientes en el suelo, polinizadores y predadores de especies blanco) y reducir y/o contaminar las fuentes de alimentos para organismos en niveles tróficos superiores (Devine & Furlong, 2007).

La producción global de plaguicidas se ha incrementado durante varias décadas y se pronostica más del doble para el 2050, alrededor de 10 millones de toneladas métricas (Brittain & Potts, 2011). El uso de plaguicidas junto con las prácticas de manejo del suelo han sido identificados como presiones clave sobre los polinizadores. Los insecticidas son el grupo de plaguicidas que poseen el mayor riesgo directo para los polinizadores. Numerosos estudios han demostrado los impactos negativos de los insecticidas sobre las abejas *A. mellifera* y varias abejas no-*Apis* (Brittain & Potts, 2011).

Para lograr la protección de los organismos no blanco de los efectos causados por el desarrollo y uso continuado de plaguicidas en la agricultura moderna, la EEC (por sus siglas en inglés, European Economic Community) y la U.S. EPA (por sus siglas en inglés, United States Environmental Protection Agency) establecen directivas (OECD N° 213 y 214, OEPP/EPPO guía N° 170, EPA/OPPTS N° 850.3020, 850.3030 y 850.3040) en las cuales se exige realizar bioensayos con abejas melíferas para el registro de plaguicidas (Devillers *et al.*, 2003). En primer lugar, deben realizarse ensayos de toxicidad aguda oral o por contacto en el laboratorio. Los valores de DL<sub>50</sub> obtenidos en estos ensayos corresponden a una única dosis de plaguicida administrada

por ingestión o contacto que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba a las 24 o 48 horas posteriores a la exposición. Si estos valores están por encima de un umbral establecido, deben realizarse diferentes tipos de bioensayos adicionales (ensayos en caja, en túnel y/o campo) para obtener la autorización para la comercialización del producto (Cluzeau, 2002).

## EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LOS PLAGUICIDAS PARA LAS ABEJAS. NORMATIVAS VIGENTES.

La normativa que reglamenta el registro, contralor y venta de plaguicidas de uso agrícola en el Uruguay es el Decreto 149/977 del 15 de marzo de 1977. Este decreto en su art. N° 3, establece que “*La solicitud de registro y de la autorización de venta .....deberá contener información sobre:*

*H) toxicidad del producto para el hombre, peces, animales domésticos y especialmente para abejas. A tales efectos las oficinas técnicas de la Dirección de Sanidad Vegetal, elaborarán una escala de toxicidad con el asesoramiento del Centro de Investigación y Asesoramiento Toxicológico CIAT, de la Facultad de Medicina”.* Sin embargo, no existen en el país directrices aprobadas para la realización de los ensayos de laboratorio cuyo objetivo sea determinar la toxicidad de estos productos sobre abejas.

La directiva europea N° 91/414/CEE de 1991, concerniente al registro de productos para la protección de cultivos, establece las condiciones que deben ser cumplidas para obtener la autorización de mercado. Esta aprobación se lleva a cabo en dos etapas. La aprobación de la sustancia activa es otorgada a nivel de la Comisión Europea; mientras que las autorizaciones para las formulaciones permanecen a nivel nacional. Para la autorización de la sustancia activa se realizan en primer lugar, bioensayos de toxicidad en laboratorio. Los valores de toxicidad aguda oral o por contacto (DL<sub>50</sub>) son indicadores del impacto potencial sobre las abejas. La determinación de los valores de DL<sub>50</sub> (48 hrs) para las formulaciones comerciales administradas por contacto o ingestión, pueden requerirse cuando la formulación contiene varias sustancias activas o cuando su toxicidad no puede ser establecida por comparación con aquellas de similar formulación (Cluzeau, 2002).

En los Estados Unidos, la autorización para los productos de protección de cultivos está gobernada en general por la U.S. EPA y más precisamente por la OPP (por sus siglas en inglés, Office of Pesticide Programs). El procedimiento para la aprobación de mercado es iniciado a nivel federal y luego a nivel de cada Estado. Al igual que la regulación europea, en un primer paso se determina la toxicidad aguda en laboratorio. Si las abejas pueden estar en contacto con los productos de protección se debe establecer la  $DL_{50}$  por contacto. De forma similar, en el caso de ingestión del producto por las abejas, debe establecerse la  $DL_{50}$  oral. El método usado está definido por la OPPTS (por sus siglas en inglés, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances) guía N° 850.3020. En base a los valores obtenidos para la  $DL_{50}$ , se requerirán o no bioensayos adicionales (ensayo de residuos en el follaje y/o de campo). La toxicidad del químico es medida en la escala de Atkins, si el valor de  $DL_{50}$  es igual o superior a  $11\mu\text{g}/\text{abeja}$ , el producto es considerado como no tóxico. Para los valores de  $DL_{50}$  entre 2 y  $11\mu\text{g}/\text{abeja}$ , el producto es considerado como moderadamente tóxico; y para valores inferiores a  $2\mu\text{g}/\text{abeja}$  el producto es altamente tóxico (Cluzeau, 2002).

Existen, sin embargo, una serie de desventajas relacionadas a los ensayos de toxicidad aguda que a menudo no son consideradas en las directrices establecidas por la EPPO (por sus siglas en inglés, European and Mediterranean Plant Protection Organization) (Cluzeau, 2002; Rortais *et al.*, 2005). Entre ellas, se destacan los efectos debidos a las exposiciones crónicas o sub-crónicas a concentraciones subletales de diversos compuestos de uso habitual en la protección de cultivos (Decourtye *et al.*, 2004; Decourtye *et al.*, 2005; Rortais *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011).

Existe una amplia variedad de efectos comportamentales y fisiológicos subletales reportados en abejas debidos a la exposición a plaguicidas, principalmente insecticidas. Estos van desde efectos en la discriminación de olores a la pérdida de las abejas pecoreadoras debido a una disrupción de su comportamiento de orientación de regresar a la colmena. Muchos de los efectos reportados ocurren a nivel de o por debajo del nivel que se estima que ocurran en un corto período de tiempo posterior a las aplicaciones en campo. Se debe prestar particular atención a la relevancia de los efectos subletales en los ensayos de laboratorio en aquellos compuesto que pueden, por lo demás, no someterse a ensayos posteriores dada su baja toxicidad aguda o bajo rango de aplicación pero que pueden causar efectos a nivel de la colonia (Thompson & Wilkins, 2003).

Muchos de los plaguicidas aplicados sobre la superficie de las plantas tienen una acción rápida y residual de pocas horas o días mientras que, los insecticidas sistémicos penetran dentro de la planta, incluyendo las plantas melíferas y poliníferas, protegiéndolas durante todo su desarrollo de invertebrados del suelo y en ciertos casos de insectos succionadores (Rortais *et al.*, 2005). Las guías de ensayos regulatorios no toman en cuenta la potencial persistencia de estas moléculas en las plantas, y no especifican cuales ensayos de laboratorio deberían ser usados para estimar el posible impacto letal o subletal sobre las abejas debido a las exposiciones crónicas que se dan después de varios días de ingesta o contacto repetitivo con insecticidas sistémicos (Rortais *et al.*, 2005). Yang *et al.* (2008) demostraron que dosis orales subletales de imidacloprid son capaces de afectar el comportamiento de pecoreo en abejas melíferas, aumentando el intervalo de tiempo entre dos visitas al mismo sitio de pecoreo. De igual forma, Decourtye *et al.* (2004) reportaron una disminución en la actividad de pecoreo sobre la fuente de alimento y en la actividad a la entrada de la colmena en abejas expuestas oralmente a jarabe contaminado con imidacloprid y deltametrina. Han sido observados efectos negativos sobre el aprendizaje olfativo en abejas expuestas a imidacloprid mediante el ensayo de respuesta condicionada de extensión de la proboscis (PER) (Decourtye *et al.*, 2004). El insecticida endosulfan mostró, mediante el ensayo PER, una reducción en el aprendizaje en abejas obreras expuestas a diferentes dosis orales (Abramson *et al.*, 1999; Decourtye *et al.*, 2005).

Varios estudios han demostrado también que los pesticidas pueden causar inestabilidad en el desarrollo de insectos no-blanco. Esta inestabilidad puede reflejarse en el incremento de los niveles de asimetría fluctuante (AF), en algunas características morfológicas en los organismos en estudio. Ondo Zue Abaga *et al.* (2011), estudiaron los efectos del endosulfan y profenofos presentes en muestras de suelo colectadas en áreas de cultivo de algodón tradicionales y recientes, sobre abejas melíferas. El índice de asimetría fluctuante (AF1) en la longitud del segundo tarso (LHW) se incremento en las abejas expuestas a muestras de suelo de áreas algodoneras, siendo sus niveles de AF significativamente mayores a los del control.

Wu *et al.* (2011) llevaron a cabo estudios para examinar los posibles efectos directos e indirectos de la exposición a plaguicidas a partir de cuadros de cría contaminados sobre el desarrollo y la duración de vida de las abejas obreras adultas. Los efectos subletales

reportados incluyen el retraso en el desarrollo larval y la emergencia de adultos y, acortamiento de la longevidad en adultos. Estos efectos directos pueden afectar indirectamente a la colonia debido al desplazamiento prematuro de los roles en la colmena y la actividad de pecoreo.

Otra desventaja de los bioensayos de toxicidad aguda estipulados en las regulaciones es que no se considera la exposición a mezclas o combinaciones de dos o más compuestos que pueden dar efectos aditivos, sinérgicos, potenciaciones, antagonismos o ser indiferentes, dependiendo de las características de las sustancias y de los organismos bajo evaluación. Ellis *et al.* (1997) comprobaron que las abejas tratadas con fluvalinato (Apistan Queen Tabs) usado para controlar el ectoparásito *V. destructor*, exhibían una mayor susceptibilidad al bifeltrin (plaguicida del género piretroide) que las abejas no tratadas en ensayos de laboratorio. Si el sinergismo existe entre el fluvalinato y los plaguicidas aplicados a los cultivos, las colonias tratadas contra la varroosis pueden ser más vulnerables a daños por plaguicidas que las colonias no tratadas. Existen varios estudios sobre interacciones potenciales cuando las abejas son expuestas a más de un plaguicida, encontrándose en varios casos sinergismos entre diferentes compuestos (Ellis *et al.*, 1997).

Por último, los ensayos de toxicidad pueden estar influenciados por otros factores como es el biotipo de abejas que se esté evaluando o las condiciones climáticas en los ensayos de campo (Tornier *et al.*, 2003). La guía OEPP/EPPO N° 170 para la evaluación de los efectos de los productos de protección sobre las abejas, se desarrolló principalmente en la región norte de Europa y está adaptada a las condiciones existentes en estos países (OEPP/EPPO, 2001). Dado que las condiciones climáticas dominantes en el resto de los países son muy diferentes, los ensayos con abejas especialmente influenciados por el diseño y los requerimientos para su ejecución deben ser modificados (Koch & Weiber, 1997; Tornier *et al.*, 2003).

De igual forma, las guías OEPP/EPPO N° 170 y EPA/OPPTS N°850, 3020 no especifican el biotipo de abeja en el cual se debe evaluar el producto de protección de cultivos (US EPA, 1996; OEPP/EPPO, 2001). En nuestro país, las abejas que predominan son, en gran parte resultado de la cruce de la subespecie europea (*A. m. mellifera*) con africana (*A. m. scutellata*) (Diniz *et al.*, 2003). Por otra parte, en los últimos años se ha dado una fuerte introducción de abejas italianas (*A. m. ligústica*),

especialmente en los departamentos del litoral oeste del país (Invernizzi, C.; com. per.). Esto podría causar variaciones en los valores de toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>) obtenidos en bioensayos que emplearon probablemente otra subespecie de *A. mellifera* para evaluar los plaguicidas.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Evaluación del biotipo de abeja melífera (*A. mellífera*) presente en apiarios del litoral oeste como bioindicador de la calidad ambiental.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la eficiencia de colecta de diferentes tipos de trampas para abejas muertas.
2. Estimar los niveles de mortalidad de abejas en apiarios ubicadas en el litoral oeste del país expuestos a contaminación industrial.
3. Evaluar la miel como indicador de contaminación ambiental por SO<sub>2</sub>.
4. Determinar la toxicidad aguda por contacto para abejas melíferas de insecticidas utilizados en los cultivos de soja.

## MATERIALES Y METODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

*INIA- La Estanzuela* –La Estación Experimental “Dr Alberto Boerger”, INIA-La Estanzuela se encuentra ubicada en el suroeste de la región agrícola ganadera del país, en el departamento de Colonia, sobre la ruta 50, km11 (figura 1).

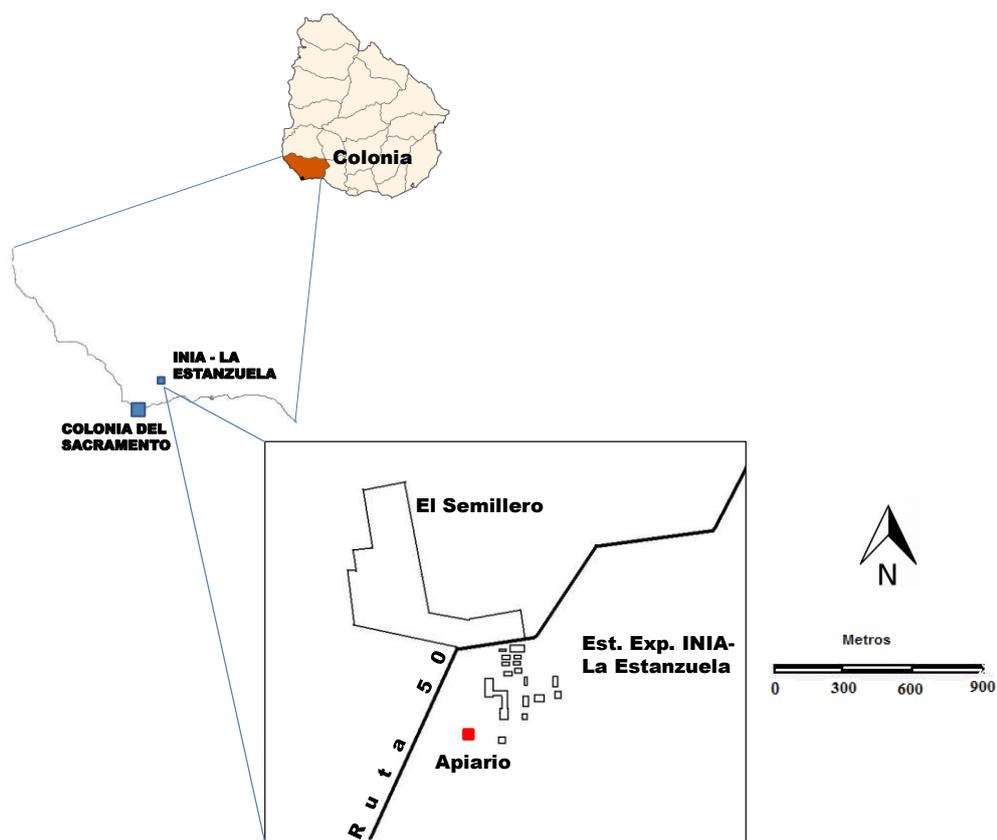


Figura 1. Estación Experimental “Alberto Boerger”, INIA-La Estanzuela, Departameto de Colonia. Uruguay. ■ Ubicación del apiario experimental.

Para determinar la eficiencia de captura y retención de diferentes tipos de trampas para abejas muertas se seleccionó una zona resguardada del parque de la Estación Experimental INIA-La Estanzuela. Allí se instaló un apiario conformado por 20 colonias de abejas melíferas. Estas colonias se emplearon también para determinar la mortalidad natural diaria en apiarios ubicados en el litoral oeste del país.

Posteriormente, con el objetivo de estimar los niveles de mortalidad en colonias de abejas melíferas y de evaluar la miel como indicador de contaminación ambiental por SO<sub>2</sub>, se instalaron redes de apiarios experimentales en dos localidades de la región litoral oeste: Juan Lacaze y Fray Bentos.

*Juan Lacaze* – La localidad de Juan Lacaze ubicada en el Departamento de Colonia, cuenta con una población de 13.015 habitantes y una importante actividad agroindustrial. Es de destacar la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A. (producción anual: 180.000 ton/año).

En esta zona se instaló una red de monitoreo formada por 5 apiarios experimentales (estaciones de muestreo) con 5 colmenas cada uno. Cada apiario fue situado a diferentes distancias de la planta de pulpa de celulosa. En función de los patrones de vientos dominantes, se situó una estación a 2 y 4 km aproximadamente de Juan Lacaze. Las tres estaciones restantes, se situaron a 8 km de distancia con respecto a Juan Lacaze y a 4 km entre ellas, aproximadamente (Figura 2).

*Fray Bentos* – La localidad de Fray Bentos se encuentra en el Departamento de Río Negro y cuenta con una población de 22.577 habitantes. En el área se desarrollan actividades agropecuarias así como industriales, destacándose la planta de pulpa de celulosa UPM (producción anual: 1.000.000 ton/año) y su terminal portuaria.

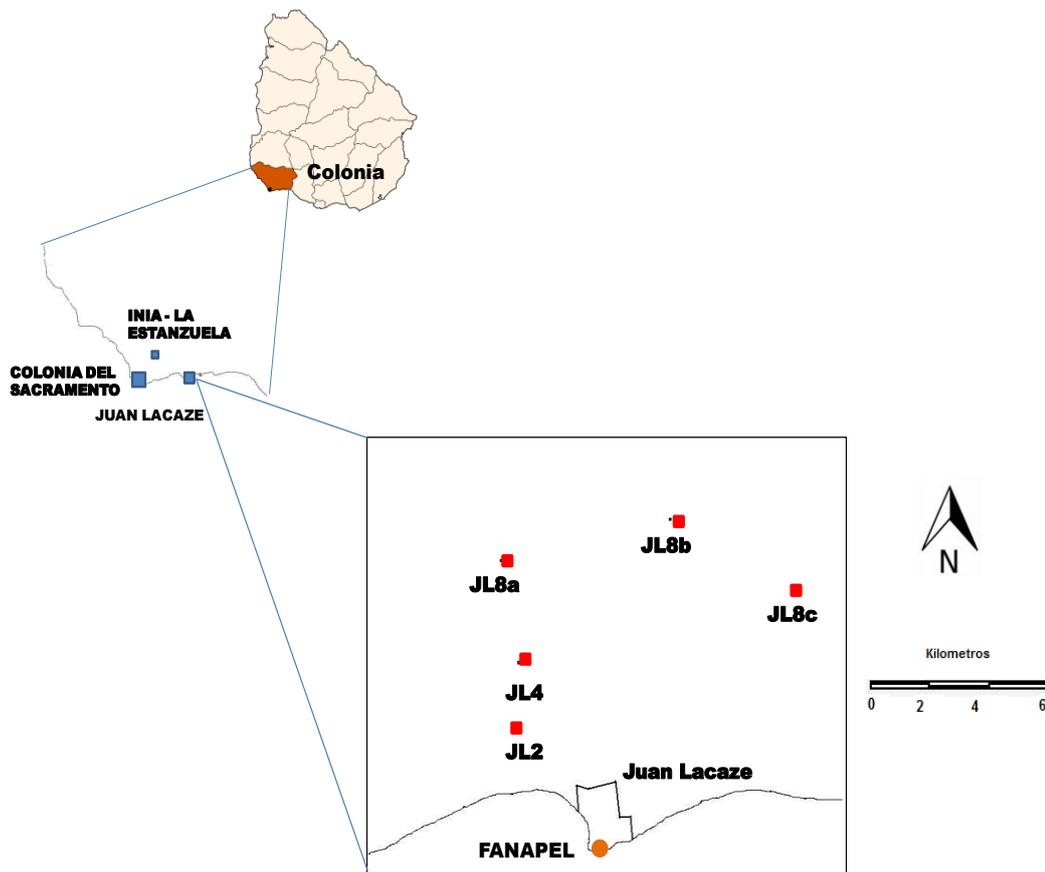


Figura 2. Red de monitoreo ambiental en Juan Lacaze. ■ Ubicación de los 5 apiarios experimentales que conformaban la red.

La red de monitoreo ambiental INIA PSA07 ubicados en localidad de Fray Bentos estuvo constituida por 12 estaciones de muestreo, de las cuales se escogieron 5 para formar parte del presente estudio. Los apiarios escogidos, compuestos por 5 colmenas cada uno, estaban ubicados a lo largo de una transecta en dirección sur correspondiente al patrón de vientos predominantes (Figura 3). Las estaciones mencionadas se encontraban a una distancia aproximada de 2, 4, 8 y 16 km con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM.

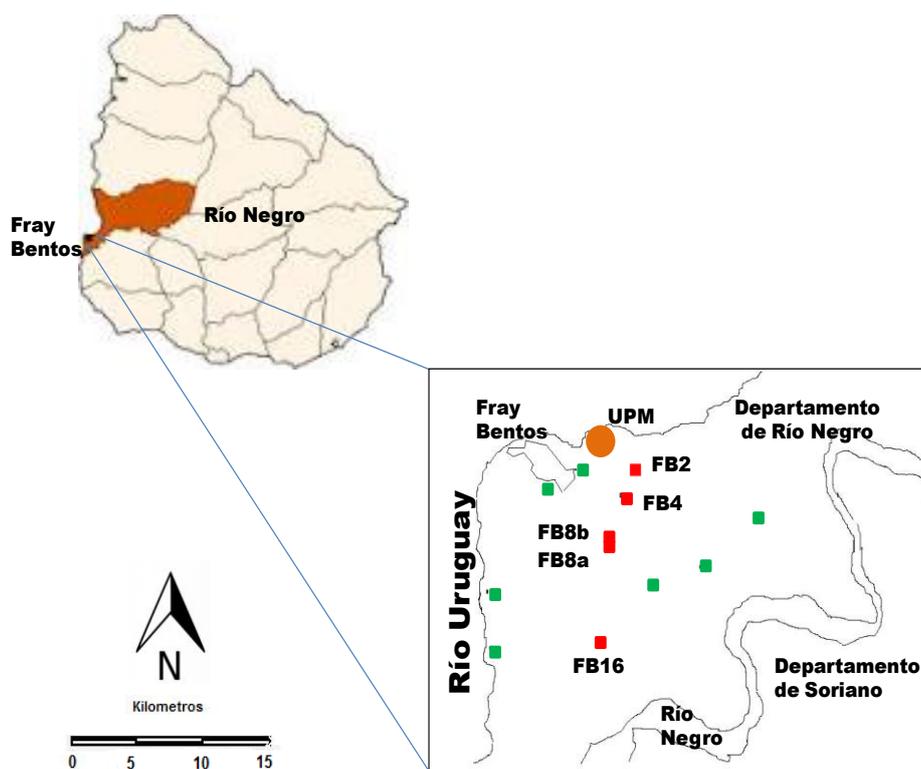


Figura 3. Red de monitoreo ambiental en Fray Bentos. ■ Ubicación de los apiarios experimentales seleccionados de la red de monitoreo ambiental INIA-La Estanzuela. ■ Ubicación de los demás apiarios de la red de monitoreo excluidos del estudio.

## EFICIENCIA DE COLECTA DE ABEJAS MUERTAS CON DIFERENTES TIPOS DE TRAMPAS

Se evaluó la eficacia de colecta de las trampas “underbasket”, “de barrera” y un prototipo diseñado en la Estación Experimental INIA-La Estanzuela denominado “INIA\_LE”.

Para ello, se emplearon 20 colonias de abejas melíferas en buenas condiciones sanitarias. Las colonias fueron evaluadas el día previo al inicio y dos días después de finalizado cada ensayo. El tamaño poblacional de cada colmena fue estimado contando el número de espacios entre marcos ocupados por abejas (Pérez *et al.*, 2001; Faucon *et*

*al.*, 2005; Chauzat *et al.*, 2009). Todas las colonias contaban con cría, reservas de miel y polen al momento de iniciar el ensayo.

Las colmenas se dividieron al azar en cuatro grupos de cinco colmenas, tres de ellos equipados con un tipo diferente de trampa: “underbasket”, “de barrera” e “INIA\_LE”. El cuarto grupo correspondió al grupo control. La trampa “underbasket” fue construida con las dimensiones descritas por Porrini *et al.* (2000): 50 cm (ancho) x 100 cm (largo) x 10 cm (altura). La parte inferior de la trampa se cubrió con una malla de plástico de 0.3 mm y en la parte superior se colocó una malla metálica de 1x1 cm de apertura. La trampa se ubicó en el suelo frente a la piquera por lo que no formó un cuerpo único con esta, figura 4A.

La trampa “de barrera” se construyó de acuerdo a lo estipulado por Porrini *et al.* (2000) (figura 4B). Esta trampa se colocó directamente en la entrada a la colmena, obligando a las abejas a pasar por un canal de 3 cm de largo y 0.8 cm de ancho para abandonar la colmena. En la base de la trampa se dispuso un recipiente para coleccionar las abejas muertas. De esta forma se protegió la muestra de la exposición a los agentes atmosféricos y de posibles predadores (avispa, hormigas, pájaros).

Por último, la trampa “INIA\_LE” se diseñó en base a resultados de ensayos previos desarrollados por la Unidad de Apicultura de INIA-La Estanzuela (datos no presentados). Al igual que la trampa “de barrera”, esta trampa se colocó sobre la entrada a la colmena obligando a las abejas a salir por una ranura a lo largo de la parte superior de la trampa de 1 cm de ancho. En la parte inferior de la trampa se dispuso una caja oscura para coleccionar las abejas muertas (figura 4C). Las trampas “de barrera” e “INIA\_LE” son percibidas por las abejas como parte integrante de la colmena.

Todas las trampas fueron equipadas, además, con una lámina plástica de color blanco (1,20 cm<sup>2</sup>) colocada en el suelo frente a la entrada de la colmena.

El control consistió en colmenas a las cuales se les colocó únicamente la lámina plástica de color blanco en frente a la entrada de la colmena. Esto permitió contar las abejas muertas retiradas del interior de la colmena por las necróforas (figura 4D).

Las trampas fueron instaladas cinco días antes del inicio del ensayo para que las abejas se adaptaran a la presencia de las mismas.



Figura 4. A- Trampa “Underbasket”; B- Trampa “de Barrera”; C- Trampa “INIA\_LE”; D- Control sin trampa.

Para evaluar la eficiencia de colecta y retención de las muestras de los diferentes tipos de trampas, se utilizaron abejas muertas marcadas. El día previo al inicio del ensayo se colectaron abejas obreras adultas a partir de colonias que no fueron incluidas en el ensayo y se sacrificaron por congelamiento. Posteriormente, se marcaron en la

superficie dorsal del tórax con pintura resistente al agua, brillante y sin olor (similar a UNI-POSCA PC-5M, Mitsubishi Pencil Co Ltd, Japón).

Se tomaron todas las precauciones necesarias para evitar que abejas muertas marcadas colocadas en una colmena equipada con un tipo de trampa fueran colectadas por otro tipo de trampa en otra colmena. Para cada tipo de trampa se coloreó las abejas muertas con un color diferente. También se tomaron precauciones para evitar perturbar el comportamiento normal de la colonia. Las operaciones de apertura, introducción de abejas muertas marcadas y cierre de las colmenas se realizó con la mayor rapidez posible. De igual forma, se utilizó la menor cantidad de humo posible durante la manipulación de las colmenas.

El ensayo se inició introduciendo 50 abejas muertas marcadas sobre la cámara de cría de cada colmena. El número de abejas muertas marcadas recuperadas por cada trampa se determinó a intervalos de 15 minutos durante la primera hora posterior a su introducción ( $t_1-t_4$ ). Los recuentos siguientes, se hicieron cada dos horas ( $t_5-t_{10}$ ) durante el primer día del ensayo según Illies *et al.* (2002). Por último, se contaron las abejas marcadas en cada trampa y el control cada 24 horas ( $t_{11}-t_{17}$ ) durante los siguientes siete días.

Las abejas muertas marcadas colectadas y retenidas por las trampas no fueron removidas hasta el final del ensayo.

Para evitar que los resultados se vieran influidos por las diferencias individuales entre las colonias de abejas el ensayo se repitió dos veces (diciembre 2008 y enero 2009) cambiando la trampa de cada colmena.

## EFICIENCIA DE COLECTA DE LA TRAMPA “UNDERBASKET” EN EL TIEMPO

La eficiencia de colecta y retención de la trampa “underbasket” se evaluó en las dos redes de apiarios ubicadas en Juan Lacaze y Fray Bentos durante los meses de marzo-mayo de 2009. Las trampas “underbasket” se colocaron en el suelo, a la salida de las colmenas sobre una lámina plástica de color blanco de  $1,20 \text{ cm}^2$ . La instalación de las trampas se realizó 5 días antes del inicio del ensayo para que las abejas se acostumbraran a su presencia. El día previo al inicio del ensayo se evaluaron las

colmenas que conformaban las redes de monitoreo. En ambos casos, las colonias de abejas melíferas tenían cría, reservas de polen y buenas condiciones sanitarias.

El día previo al inicio del ensayo se colectaron abejas obreras adultas a partir de colonias que no fueron incluidas en el ensayo y se sacrificaron por congelamiento. Posteriormente, se marcaron en la superficie dorsal del tórax con pintura resistente al agua, brillante y sin olor (similar a UNI-POSCA PC-5M, Mitsubishi Pencil Co Ltd, Japón).

El ensayo se inició introduciendo 50 abejas muertas marcadas sobre la cámara de cría de cada colmena en horas de la mañana. Al día siguiente (día 1), en horas de la mañana se contó el número de abejas colectadas y retenidas por las trampas. Las abejas muertas marcadas fueron removidas de las trampas y de la lámina plástica del control luego de ser contadas. Transcurrido 7 días del inicio del ensayo, se limpiaron todas las trampas y se agregaron nuevamente 50 abejas muertas marcadas sobre la cámara de cría de cada colmena. Al día siguiente (día 8) se contó el número de abejas colectadas y retenidas en las trampas. Nuevamente, al terminar el recuento se retiraron las abejas muertas marcadas de las trampas. Este procedimiento se volvió a repetir el día 15 posterior al inicio del ensayo.

#### DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD NATURAL DIARIA DE ABEJAS EN UN APIARIO EXPERIMENTAL

El ensayo se llevo a cabo en el mes de enero de 2009. Se emplearon 10 colonias de *A. mellifera* pertenecientes al apiario instalado en una zona resguardada del parque de la Estación Experimental INIA-La Estanzuela. Las colonias de abejas fueron evaluadas el día previo al inicio del ensayo y dos días después de finalizado el mismo. El tamaño de la población de la colonia se estimó contando el número de espacios entre cuadros ocupados por abejas (Pérez *et al.*, 2001; Faucon *et al.*, 2005; Chauzat *et al.*, 2009). Todas las colmenas contaban con un buen estado sanitario, cuadros con cría, reservas de miel y polen.

Las colmenas estaban divididas en dos grupos. En uno de los grupos se las equipo con una trampa “underbasket” para colectar las abejas muertas retiradas por las necróforas del interior de la colmena. El otro grupo de cinco colmenas constituyó el grupo control y se les colocó una lámina plástica de color blanco (1,20 cm<sup>2</sup>) en frente a la entrada de la

colmena. Las trampas se instalaron 5 días antes del inicio del ensayo para que las abejas se acostumbraran a su presencia. Los recuentos del número de abejas muertas en las trampas y en el control se realizaron durante 7 días consecutivos en horas de la tarde.

Para determinar la tasa de mortalidad diaria natural, se sacrificaron las cinco colmenas que fueron equipadas con trampas “underbasket” al finalizar el ensayo. A primera hora de la mañana se sellaron las piqueras de las cinco colmenas y se colocaron almohadillas embebidas en un disolvente orgánico en su interior. Las colmenas se cubrieron con una lámina plástica para evitar pérdidas de muestra. Luego de varias horas se colectaron las muestras de cada colmena por separado en bolsas plásticas para realizar un censo de la población. El cálculo de la tasa de mortalidad diaria se realizó de la siguiente forma:

$$m = F/P * 1000$$

Donde m es la mortalidad media, F número de abejas muertas colectadas en un día y P población total.

## MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS UBICADOS EN LA REGIÓN LITORAL OESTE DEL PAÍS.

Los niveles de mortalidad diaria y semanal se determinaron en las redes de monitoreo ubicadas en Juan Lacaze y Fray Bentos. Las colmenas que conformaban los apiarios de las redes estaban equipadas con trampas “underbasket” (figura 5).

El día previo al comienzo del ensayo, en horas de la mañana, se evaluó el estado general de cada colmena (cría, población, estado sanitario, reservas de polen). Conjuntamente, se retiraron los cuadros con miel de cada colmena. El día de inicio del ensayo, a primera hora de la mañana, se eliminó los restos vegetales y abejas muertas o moribundas de todas las trampas.

En la red de monitoreo de Juan Lacaze, se determinó la mortalidad diaria y semanal en las colmenas. El ensayo se llevó a cabo durante los meses de marzo y abril de 2009. Durante la primera semana del ensayo, en horas de la mañana, se realizaron recuentos diarios del número de abejas muertas colectadas en las trampas (mortalidad diaria). Al finalizar cada recuento, se eliminaron las abejas muertas de la trampa.

Para determinar la mortalidad semanal se contó el número de abejas muertas colectadas y retenidas por las trampas cada 7 días. Luego del recuento, las abejas muertas fueron removidas de las trampas. Este procedimiento se repitió durante tres semanas consecutivas.

En el caso de la red de monitoreo instalada en Fray Bentos, se determinó únicamente la mortalidad semanal durante los meses de abril y mayo de 2009.



Figura 5. Estación de muestreo ubicada en Fray Bentos (8FB). Las cinco colmenas que conformaban la estación fueron equipadas con trampas “underbasket”.

## DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y CONTENIDO DE $\text{SO}_2$ EN MIEL

Las muestras de miel fueron colectadas al finalizar el ensayo correspondiente a la determinación de la mortalidad semanal. En el caso de la red de apiarios de Juan Lacaze, la colecta de cuadros con miel se hizo en abril de 2009. Se extrajeron todos los cuadros con miel de todas las colmenas en los distintos apiarios que conformaban la red. En la red de apiarios de Fray Bentos la colecta se realizó en el mes de mayo de 2009.

Los cuadros con miel se conservaron en heladera hasta su procesamiento. Cada muestra de miel de cada colmena se colocó por separado en frascos de plástico para los análisis fisicoquímicos. Posteriormente, se prepararon homogeneizados a partir de las muestras de miel pertenecientes a colmenas de un mismo apiario para la determinación del contenido de SO<sub>2</sub>. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de bromatológica de la Intendencia Municipal de Montevideo para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y al laboratorio de la UNCIEP (Facultad de Ciencias, UdelaR) para determinar el contenido de SO<sub>2</sub>.

La cuantificación de SO<sub>2</sub> se realizó de acuerdo con la norma mexicana NMX-F-188-1970. Básicamente, el método consiste en efectuar una destilación por arrastre de vapor para separar el SO<sub>2</sub> presente en la muestra, el cual es recibido en un matraz conteniendo peróxido de hidrógeno. El ácido sulfúrico formado, se titula con solución valorada de hidróxido de sodio. La cantidad de SO<sub>2</sub> presente en la muestra se expresa en partes por millón (ppm).

## TOXICIDAD AGUDA EN ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS POR CONTACTO A INSECTICIDAS

Las abejas empleadas en los bioensayos se obtuvieron de colmenas bajo manejo protocolizado en la Estación Experimental “Dr. Alberto Boerger”, INIA-La Estanzuela. Las abejas de 1-5 días de edad se extrajeron de cuadros con cría sellada recubiertos con una malla plástica (0,3 x 0,3 mm) y ubicados en la cámara de cría. Los ensayos se desarrollaron durante los meses de agosto-noviembre de 2008.

Se investigó la toxicidad aguda por contacto de seis formulaciones comerciales de insecticidas utilizados comúnmente en cultivos de soja. Los insecticidas ensayados fueron:

- Thionex 35 (principio activo: endosulfan, 33% p/v, Lanafil S.A), un insecticida organoclorado moderadamente tóxico (Grupo II) para las abejas.
- Lorsban 48E (principio activo: clorpirifos, 44.9% p/v, Dow AgroSciences), insecticida organofosforado altamente tóxico para las abejas (Grupo I).
- Intrepid SC (principio activo: metoxifenocide, 22.4% p/v, Dow AgroSciences), perteneciente al grupo químico diacilhidracina. Este insecticida pertenece al

Grupo III, considerándose no tóxico para las abejas.

- Karate con tecnología Zeón™ (principio activo: lambda-cialotrina, 4.9% p/v, Syngenta), un piretroide perteneciente al Grupo I de toxicidad para abejas.
- Cipermetrina Agrin (principio activo: cipermetrina, 27% p/v, Agro Internacional) es un piretroide altamente tóxico para las abejas (Grupo I).
- Gaucho 600 FS (principio activo: imidacloprid, 48% p/v, Bayer), insecticida neonicotinoide considerado no tóxico para las abejas (Grupo III).

Los bioensayos fueron realizados siguiendo los criterios sugeridos por las guías de US-EPA (US-EPA, 1996) y la EPPO (OEPP/EPPO, 2001). Para cada ensayo se utilizaron abejas de 1-5 días provenientes de una única colmena. Las abejas fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub> (g), divididas al azar en grupos de 10 individuos y colocadas en placas de Petri (altura 1,5 cm; diámetro 10 cm). Cada placa de Petri contenía un alimentador con una solución de azúcar (50 % p/v) y un disco de papel de filtro en la base. Para cada producto comercial se probaron 5 concentraciones, con cuatro réplicas por concentración. La solución de insecticida se aplicó en una única dosis en forma tópica en el tórax de cada individuo anestesiado empleando una micropipeta de 0,5-20 µl. Las soluciones fueron preparadas disolviendo el insecticida comercial en acetona (endosulfan, clorpirifos, lambda-cialotrina, metoxifenocide) o agua destilada (imidacloprid). El volumen de dosificación máximo no excedió los 5 µl por abeja permitiendo así, una adecuada volatilización del solvente. Se emplearon soluciones frescas en todos los ensayos. A los controles de solvente se les dosificó con un volumen de solvente igual al mayor volumen suministrado a las abejas en cada bioensayo. Las placas se colocaron en incubadora a 25°C, humedad controlada y en oscuridad (US-EPA, 1996; Tasei *et al.*, 2003).

## ANÁLISIS DE DATOS

Para probar normalidad en los datos, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Mediante la prueba de Levene se evaluó si los datos cumplían con la homocedasticidad requerida en el ANOVA. Para evaluar si existen diferencias entre los distintos tipos de trampas se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Posteriormente, se empleó la prueba de Mann-Whitney U para identificar los tipos de trampa que diferían entre sí cuando se

obtuvieron diferencias estadísticamente significativa en la prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ) (Sokal & Rohlf, 1995).

De igual forma, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias entre las estaciones que componían cada red de monitoreo dado que los datos no cumplían con los supuestos requeridos por el ANOVA. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para analizar que estaciones se diferenciaban entre sí dentro de cada red de monitoreo.

Para estudiar el efecto del tiempo sobre la eficiencia de captura de la trampa “underbasket” se aplicó un análisis de varianza factorial (ANOVA factorial) (Snedecor & Cochran, 1980).

Estos análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA 7 (Statsoft, 2004) con el sistema operativo Windows Vista™ Home Premium (Microsoft Corporation, 2007).

En cuanto a la toxicidad aguda por contacto ( $DL_{50}$ ), fue determinada mediante la prueba no paramétrica Sperman-Karber ajustado (TSK versión 1.5). El software US-EPA fue ejecutado en un ambiente DOS (DOSEMU software 1.4.0.0) con el sistema operativo Ubuntu 8.04 (Linux, 2008).

## **RESULTADOS**

### **EFICIENCIA DE COLECTA DE ABEJAS MUERTAS CON DIFERENTES TIPOS DE TRAMPAS**

#### **ENSAYO N°1**

Durante el primer ensayo llevado a cabo en el mes de diciembre de 2008 se evaluó el número de abejas muertas marcadas recuperadas por los diferentes tipos de trampas.

Los tiempos de mayor recuperación de abejas muertas marcadas para las diferentes trampas se ubicaron dentro de las primeras horas de iniciado el ensayo (ver ANEXOS, tabla 1). La recuperación fue mayor en las colmenas equipadas con trampas con respecto a las colmenas control. El mayor número de abejas muertas marcadas

recuperadas fue para la trampa “underbasket”, seguido por la trampa “de barrera” y finalmente, la trampa “INIA\_LE”.

Para la trampa “de barrera” el tiempo de mayor recuperación fue  $t = 15$  min con un valor promedio de  $28 \pm 10,7$  abejas muertas marcadas/colmena. Para las trampas “underbasket” e “INIA\_LE” el tiempo fue  $t = 30$  min con valores promedios de  $34 \pm 4,1$  y  $22,2 \pm 6,4$  abejas muertas marcadas/colmena, respectivamente. En el caso del control el tiempo de mayor recuperación fue de  $t = 15$  min, con un valor promedio de  $17,8 \pm 7,8$  abejas muertas marcadas/colmena.

Al tiempo  $t = 15$  min, sin embargo, los diferentes tipos de trampa no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la recuperación de abejas muertas marcadas (Kruskal-Wallis  $p = 0,084$ ) entre ellas y con respecto al control. Por otra parte, la trampa “underbasket” mostró el promedio de recuperación más alto ( $32,2 \pm 6,1$  abejas muertas marcadas/colmena) a tiempo  $t = 15$  min (figura 6).

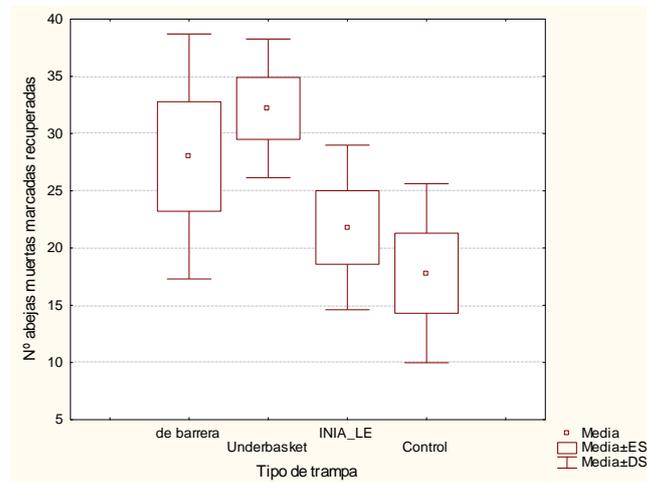


Figura 6. Número de abejas muertas marcadas recuperadas por los distintos tipos de trampas y el control a  $t = 15$  min de iniciado el ensayo N°1.

Para  $t = 30$  min la trampa “underbasket” mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la trampa “INIA\_LE” (Mann-Whitney  $p = 0,016$ ) y al control (Mann-Whitney  $p = 0,021$ ), pero no así con la trampa “de barrera”. El mayor promedio de recuperación a  $t = 30$  min fue para esta trampa ( $34 \pm 4,1$  abejas muertas marcada/colmena) (figura 7).

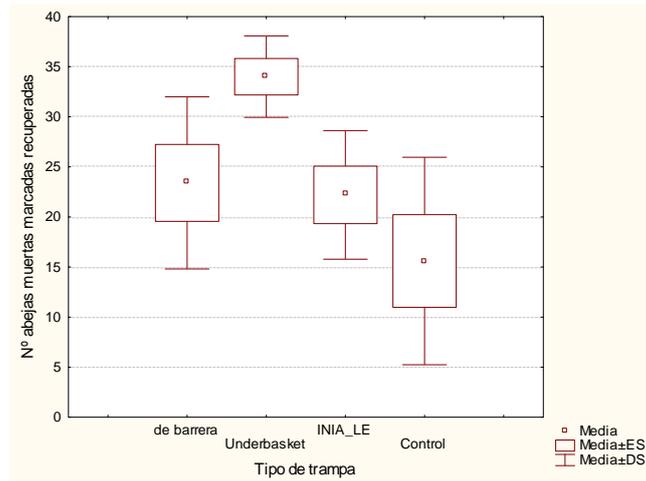


Figura 7. Número de abejas muertas marcadas recuperadas por los distintos tipos de trampas y el control a  $t = 30$  min de iniciado el ensayo N°1.

Al finalizar el ensayo ( $t = 168$  h), la trampa más eficiente en la captura y retención de la muestra de abejas muertas marcadas colocadas al inicio del ensayo fue el tipo “underbasket” con un valor promedio de  $6 \pm 8,9$  abejas muertas marcadas/colmena.

Sin embargo, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas con respecto al control y los otros dos tipos de trampas (Kruskal-Wallis  $p = 0,222$ ).

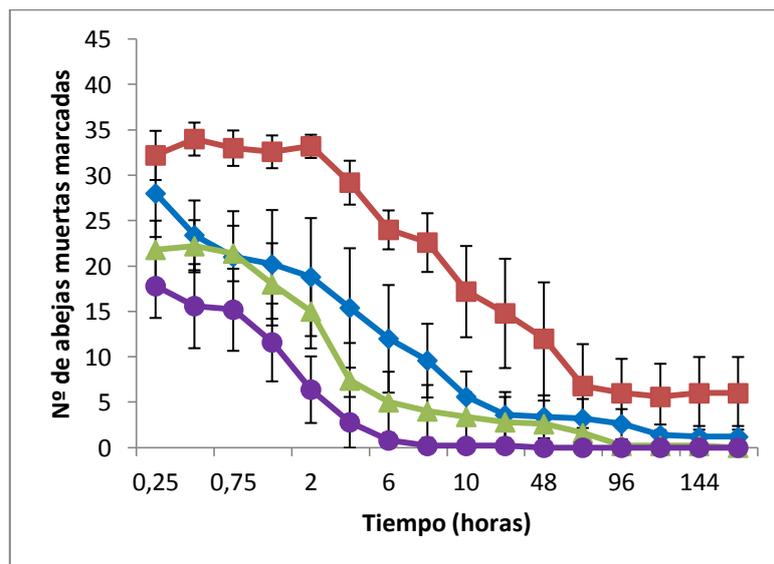


Figura 8. Número de abejas muertas marcadas en las trampas y el control en el ensayo N°1. Se presentan los valores de medias con el correspondiente error estándar (E.S). —●— de barrera, —■— Underbasket, —▲— INIA\_LE, —●— Control.

En la figura 8 se observa la evolución temporal de media de recuperación de abejas marcadas muertas para las diferentes trampas. La recuperación fue cambiando durante el curso del ensayo. El número máximo de abejas marcadas se recuperó dentro de la primera hora de iniciado el ensayo, seguido por un continuo descenso (figura 8).

### **Ensayo N°2**

El segundo ensayo fue llevado a cabo durante el mes de enero de 2009. En dicho ensayo se cambiaron las trampas de cada colmena para evitar que las características individuales de estas afectaran los resultados obtenidos con cada trampa.

Al igual que en el ensayo N°1 los tiempos de mayor recuperación de abejas muertas marcadas se ubicaron dentro de las primeras horas para todas las trampas (ver ANEXOS, tabla 2). De igual forma, el mayor número de abejas marcadas recuperadas fue para la trampa “underbasket”, seguido por la trampa “de barrera” y finalmente, la trampa “INIA\_LE”.

Las trampas “de barrera” y “underbasket” obtuvieron el mayor valor de recuperación a  $t = 1h$  con valores promedios de  $28,4 \pm 4,0$  y  $40,8 \pm 3,8$  abejas muertas marcadas/colmena, respectivamente. El mayor valor de recuperación para la trampa “INIA\_LE” fue a  $t = 30$  min, con un valor promedio de  $23,6 \pm 11,5$  abejas muertas marcadas/colmena, mientras que el control obtuvo el mayor valor promedio de recuperación ( $23,0 \pm 6,5$  abejas muertas marcadas/colmena) a  $t = 45$  min.

A  $t = 30$  min, no se observó diferencias estadísticamente significativas entre las trampas y de estas con el control (Kruskal-Wallis  $p = 0,097$ ) (figura 9).

A  $t = 1$  h la trampa “underbasket” mostró diferencias estadísticamente significativa con respecto a la trampa “INIA\_LE” (Mann-Whitney  $p = 0,009$ ), “de barrera” (Mann-Whitney  $p = 0,009$ ) y al control (Mann-Whitney  $p = 0,028$ ) (figura 10).

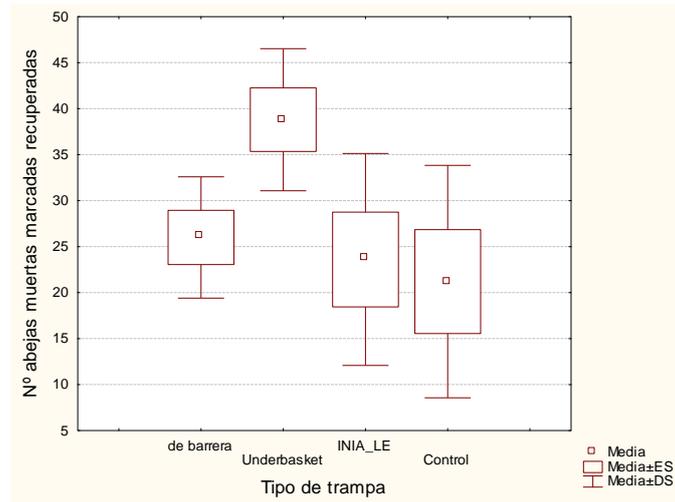


Figura 9. Número de abejas muertas marcadas recuperadas por los distintos tipos de trampas y el control a t = 30 min de iniciado el ensayo N°2.

Al finalizar el ensayo (t = 168 h), la trampa más eficiente en la retención de la muestra de abejas muertas marcadas colocadas al inicio del mismo fue el tipo “underbasket” con un valor promedio de  $0,4 \pm 0,9$  abejas muertas marcadas/colmena. Sin embargo, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas con respecto al control y con los otros dos tipos de trampas (Kruskal-Wallis p = 0,392).

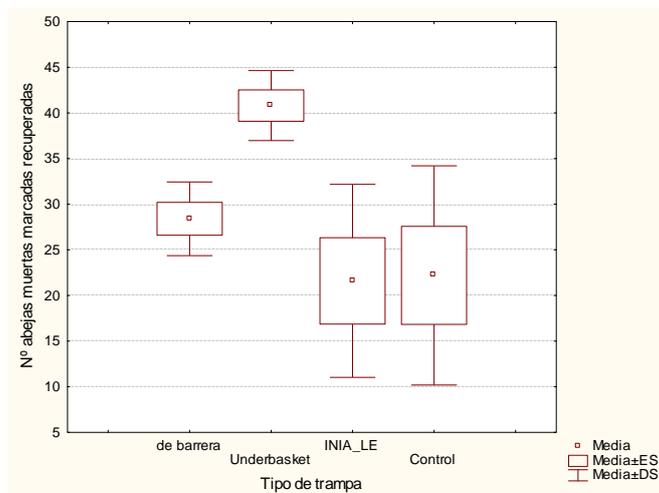


Figura 10. Número de abejas muertas marcadas recuperadas por los distintos tipos de trampas y el control a t = 1 hora de iniciado el ensayo N° 2.

En la figura 11 se observa la evolución temporal del valor medio de recuperación de abejas muertas marcadas para las diferentes trampas y el control.

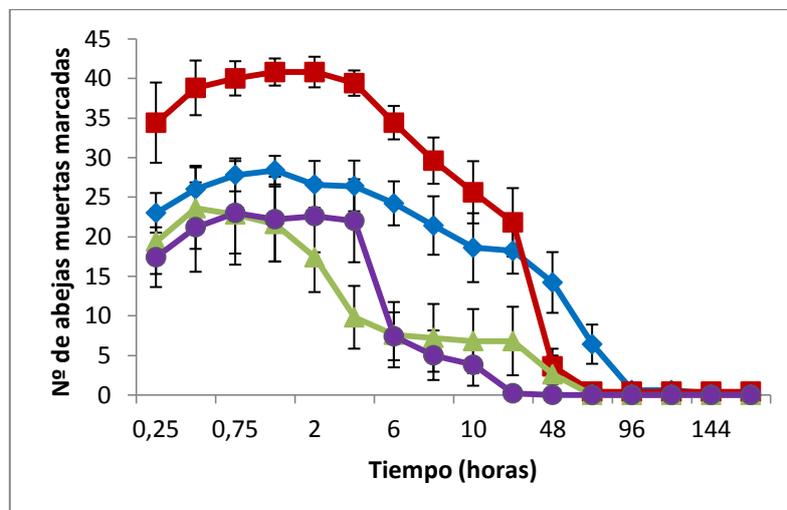


Figura 11. Numero de abejas muertas marcadas en las trampas y el control en el ensayo N°2. Se presentan las medias calculadas con su correspondiente E.S. — de barrera, — Underbasket, — INIA-LE, — Control.

## EFICIENCIA DE COLECTA DE LA TRAMPA “UNDERBASKET” EN EL TIEMPO

En la red de monitoreo ubicada en Juan Lacaze el ensayo se desarrollo durante los meses de marzo y abril de 2009, mientras que en la red de apiarios en Fray Bentos durante los meses de abril y mayo de 2009.

Los valores promedio de recuperación de la trampa “underbasket” para la red de monitoreo de Juan Lacaze y Fray Bentos se muestran en la tabla 1.

La eficiencia de recuperación de las trampas “underbasket” no fue homogénea a lo largo del experimento. En el caso de la red de monitoreo en Juan Lacaze, el número máximo de abejas marcadas recuperadas se obtuvo a los 8 días de iniciado el ensayo (tabla 1). La red de monitoreo en Fray Bentos mostró un comportamiento diferente, con un máximo de recuperación a los 15 días posteriores al inicio del ensayo (tabla 1).

Tabla 1. Valores medios de captura de abejas muertas marcadas a las 24 horas posteriores a su introducción por la trampa “underbasket” ( $\pm E.S$ ) (n = 5)

Tiempo (días)	Juan Lacaze					Fray Bentos				
	JL8a	JL8b	JL8c	JL4	JL2	FB16	FB8a	FB8b	FB4	FB2
1	14,6 (3,9)	11,2 (6,2)	5,2 (3,0)	2,2 (1,6)	1,8 (0,9)	22 (4,1)	21 (7,8)	29,2 (3,9)	21,8 (4,4)	15,2 (4,6)
8	27,6 (3,0)	28,6 (5,0)	23,8 (3,9)	19,2 (4,5)	28,4 (3,8)	20 (6,3)	20,4 (5,9)	22 (3,1)	23,6 (6,5)	18 (7,1)
15	17,2 (3,8)	11,4 (4,6)	17,8 (6,0)	7,4 (3,2)	6,8 (2,8)	38,2 (3,2)	27,4 (4,6)	37,2 (2,2)	29,2 (3,3)	28,8 (4,1)

JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A., Juan Lacaze. FB2, estación de monitoreo ubicada a 2 km; FB4, estación de monitoreo a 4 km; FB8 estaciones de monitoreo a 8km y FB16 estación de monitoreo a 16 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM, Fray Bentos.

La eficiencia de recuperación de la trampa “underbasket” es afectada de forma significativa por el tiempo transcurrido desde su instalación en la colmena (ANOVA factorial  $p = 0,001$ ) hasta el momento de la evaluación como se puede observar en la figura 12.

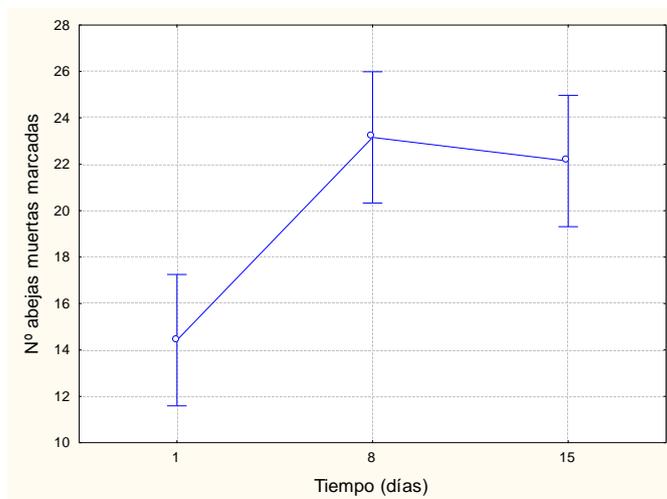


Figura 12. Número de abejas muertas marcadas colectadas por la trampa “underbasket” a las 24 horas posteriores a su incorporación en las colmenas. Se muestra la media de recuperación a diferentes tiempos a partir del inicio del ensayo (media  $\pm 0,95$  I.C.).

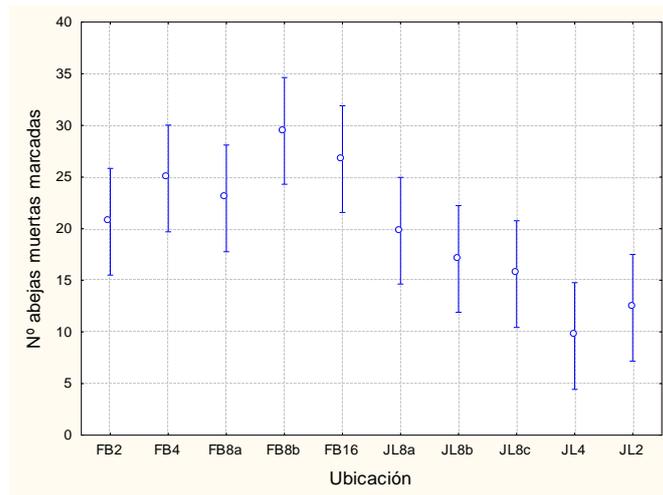


Figura 13. Número de abejas muertas marcadas colectadas por la trampa “underbasket” a las 24 horas posteriores a su incorporación en las colmenas. Se muestra la media de recuperación para cada estación de muestreo (media  $\pm$  0,95 I.C). JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A., Juan Lacaze. FB2, estación de monitoreo ubicada a 2 km; FB4, estación de monitoreo a 4 km; FB8 estaciones de monitoreo a 8km y FB16 estación de monitoreo a 16 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM, Fray Bentos.

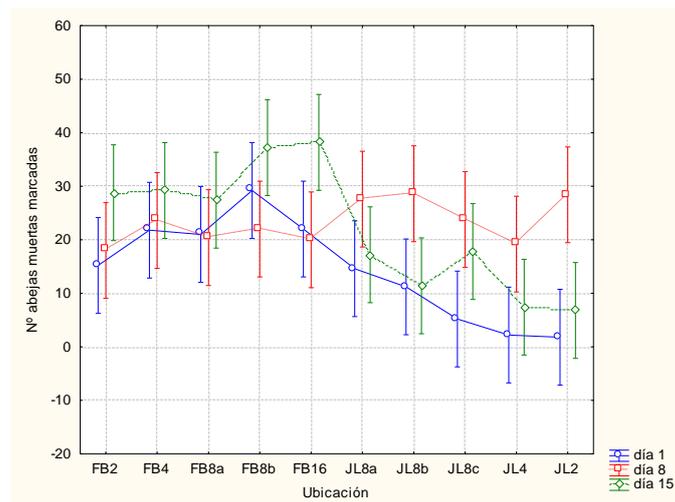


Figura 14. Número de abejas muertas marcadas colectadas por la trampa “underbasket” a las 24 horas posteriores a su incorporación en las colmenas. Se muestra la media de recuperación a diferentes tiempos para las diferentes estaciones de muestreo (media  $\pm$  0,95 I.C). JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A., Juan Lacaze. FB2, estación de monitoreo ubicada a 2 km; FB4, estación de monitoreo a 4 km; FB8 estaciones de monitoreo a 8km y FB16 estación de monitoreo a 16 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM, Fray Bentos.

Otro de los factores que afecta la eficiencia de recuperación de la trampa es la ubicación del apiario (ANOVA factorial  $p = 0,001$ ) (figura 13) así como la interacción de ambos factores (ANOVA factorial  $p = 0,001$ ) (figura 14).

## DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD NATURAL DIARIA DE ABEJAS EN UN APIARIO EXPERIMENTAL

La determinación de la mortalidad natural diaria se llevo a cabo durante el mes de enero de 2009. Las colmenas empleadas formaban parte del apiario experimental ubicada en una zona resguardada del parque de la Estación Experimental de INIA-La Estanzuela. El número de abejas muertas colectadas diariamente por las trampas “underbasket” y el control se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Número de abejas muertas colectadas a diferentes tiempos para las colmenas control ( $n = 5$ ) y las equipadas con la trampa “underbasket” ( $n = 5$ ).

Tipo de Trampa	Tiempo (horas)						
	24	48	72	96	120	144	168
Control	1	7	7	1	3	8	2
Control	0	1	6	0	1	2	4
Control	5	0	4	0	8	10	6
Control	5	2	5	1	3	1	6
Control	2	2	2	1	1	1	7
Underbasket	7	22	4	8	9	4	9
Underbasket	8	3	13	9	14	18	2
Underbasket	16	19	12	23	8	14	19
Underbasket	14	9	12	2	4	6	9
Underbasket	18	16	7	6	15	6	6

El valor promedio de abejas muertas colectadas por las trampas “underbasket” fue de  $10,6 \pm 5,8$  abeja muertas/colmena/día en tanto que, para el control fue de  $3,3 \pm 2,8$  abeja muertas/colmena/día.

Los valores obtenidos en el censo de población se muestran en la tabla 3. Las tasas de mortalidad se calcularon a partir de los valores obtenidos en los censos de población para cada colmena.

Tabla 3. Valores de Población total obtenidos a partir de los censos realizados para cada colmena.

	<b>Población estimada<sup>†</sup></b>	<b>Población total (P)<sup>‡</sup></b>	<b>Nº abejas muertas/ (F)<sup>‡</sup> día</b>	<b>T. mortalidad (m)*</b>
	7	24629	10	0,4‰
	5	15512	16	1,0‰
	10	27531	8	0,3‰
	9	23476	9	0,4‰
	10	25531	11	0,4‰

<sup>†</sup> tamaño de la población determinada contando el número de espacio entre marcos completamente ocupado por abejas.

<sup>‡</sup> Número total de individuos que componen cada colonia de abejas obtenido a partir de un censo de población.

<sup>‡</sup> valor promedio del número de abejas muertas colectadas para cada colmena (n = 7).

•  $m = F/P * 1000$  , Nº de abejas muertas colectadas por cada 1000 individuos

## MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS UBICADOS EN LA REGIÓN LITORAL OESTE DEL PAÍS.

Los ensayos para la determinación de la mortalidad diaria y semanal de abejas en la red de monitoreo ubicada en Juan Lacaze, departamento de Colonia, se llevaron a cabo durante los meses de marzo y abril de 2009. Los valores promedio para las estaciones de dicha red se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Mortalidad diaria media de abejas para la red de monitoreo Juan Lacaze, Colonia.

Estación*	N	Media mortalidad diaria (abejas muertas/colmena /día)(±D.S)
JL8a	34	5,2 (3,9) <sup>a</sup>
JL8b	34	5,7 (3,5) <sup>a</sup>
JL8c	34	9,7 (7,7) <sup>a</sup>
JL4	34	1,9 (3,0) <sup>b</sup>
JL2	34	2,7 (2,7) <sup>c</sup>

\*JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A. Las letras denotan diferencias significativas entre estaciones de monitoreo para Mann-Whitney U test (p < 0,05).

En la red de monitoreo instalada en Fray Bentos, departamento de Río Negro, el ensayo para la determinación de la mortalidad semanal se desarrolló en los meses de abril y mayo de 2009. El valor promedio para las estaciones de la red se muestran en la tabla 6.

La mortalidad diaria media para la red de monitoreo instalada en la localidad de Juan Lacaze fue de  $5,0 \pm 5,3$  abejas muertas/colmena/día. Las estaciones de muestreo ubicadas a diferentes distancias de la chimenea de FANAPEL mostraron valores de mortalidad diaria estadísticamente diferentes (Kruskal-Wallis  $p = 0,001$ ). Por el contrario, las estaciones que se encontraban a 8 km (JL8a, JL8b y JL8c) no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Mann-Whitney, JL8a – JL8b  $p = 0,448$ ; JL8b – JL8c  $p = 0,054$ ).

Tabla 5. Mortalidad semanal media de abejas determinada en la red de monitoreo Juan Lacaze, Colonia.

Estación*	N	Media mortalidad semanal (abejas muertas/colmena/semana) ( $\pm$ D.S)
JL8a	15	67,0 (75,3) <sup>a</sup>
JL8b	15	26,9 (23,3) <sup>b</sup>
JL8c	15	76,7 (61,1) <sup>a</sup>
JL4	15	13,8 (14,6) <sup>bc</sup>
JL2	15	22,9 (17,0) <sup>bc</sup>

\*JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A., Juan Lacaze. Las letras denotan diferencias significativas entre estaciones de monitoreo para Mann-Whitney U test ( $p < 0,05$ ).

La mortalidad semanal registrada para la red de monitoreo de Juan Lacaze mostró un comportamiento diferente. El valor medio de mortalidad semanal para la red fue de  $41,5 \pm 51,3$  abejas/colmena/semana. La estación de monitoreo JL8a fue estadísticamente diferente a las estaciones JL2 y JL4 (Mann-Whitney JL8a – JL4  $p = 0,001$ ; JL8a – JL2  $p = 0,011$ ), al igual que la estación de monitoreo JL8c (Mann-Whitney JL8c – JL4  $p = 0,001$ ; JL8c – JL2  $p = 0,002$ ). Sin embargo, estas dos últimas estaciones no mostraron una diferencia significativa entre ambas en cuanto a la mortalidad semanal registrada.

Con respecto a las tres estaciones situadas a 8 km se observó que, las estaciones JL8a y JL8c se comportaron de forma similar (Mann-Whitney  $p = 0,395$ ), mientras que la estación JL8b lo hizo de forma diferente (Mann-Whitney JL8b – JL8a  $p = 0,034$ ; JL8b – JL8c  $p = 0,008$ ). Además, la estación JL8b no mostró una diferencia estadísticamente significativa con las estaciones ubicadas a 2 y 4 km de la fábrica (tabla 5).

En la red de monitoreo ubicada en la localidad de Fray Bentos, departamento de Río Negro, el valor medio de mortalidad semanal fue de 27,4 abejas/colmena/semana. Las diferentes estaciones de muestreo que conformaban la red no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Los valores de mortalidad semanal obtenidos para cada estación se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Mortalidad semanal media de abejas para la red de monitoreo Fray Bentos, Río Negro.

Estación*	N	Media mortalidad semanal (abejas muertas/colmena/semana) ( $\pm$ D.S)
FB2	15	19,6 (14,2)
FB4	13	27,8 (32,0)
FB8a	15	32,5 (27,5)
FB8b	12	39,1 (22,2)
FB16	15	20,6 (14,8)

\*FB2, estación de monitoreo ubicada a 2 km; FB4, estación de monitoreo a 4 km; FB8 estaciones de monitoreo a 8km y FB16 estación de monitoreo a 16 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM, Fray Bentos.

## LA MIEL COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR SO<sub>2</sub>

Los valores promedio junto a la desviación estándar obtenidos para los diferentes parámetros fisicoquímicos analizados (humedad, acidez, HMF, azúcares reductores, sacarosa, cenizas y color) en las muestras de miel provenientes de las estaciones de monitoreo de la red de Juan Lacaze y Fray Bentos se muestran en las tablas 7 y 8.

La humedad, un parámetro relacionado con el grado de maduración de la miel, estuvo entre 14,6 y 20,4%. Los valores de acidez variaron ampliamente ubicándose entre 18,3 y 64,4 meq/Kg. Todas las mieles fueron ácidas, con un pH en el rango de 3,49 – 4,43.

Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos de muestras de miel provenientes de apiarios pertenecientes a la red de monitoreo en Fray Bentos, Río Negro.

Ubicación_Nº colmena	Humedad (%)	Acidez (meq/kg)	HMF (mg/kg)	Az Reductores (%)	Sacarosa (%)	Cenizas (%)	Color (mm)
FB2_1	15,4	22,4	5,1	69,7	1,7	0,3	79
FB2_2	16,8	42,1	27,1	66,3	1,2	0,4	124
FB2_3	14,6	19,6	3,7	66,5	6	0,3	103
FB2_4	15	20,3	sd	62,5	4,7	0,3	108
FB2_5	15,6	18,3	3,4	65,8	6,4	0,3	96
FB4_1	18,2	37,1	17,6	71,1	1,6	0,3	108
FB4_2	14,6	26,3	8,8	66,8	4,2	0,5	95
FB4_3	14,6	31,1	17,4	61,6	1,2	0,2	120
FB4_4	15,8	30,4	24,5	67,5	5,1	0,2	98
FB4_5	15,6	26,4	4,8	65	2,8	0,3	108
FB8a_1	20,4	57,8	3,8	65	4,2	0,1	96
FB8a_2	16,8	39,6	22,4	62,4	4,7	0,2	93
FB8a_3	19,6	54,5	3,2	63	4,8	0,2	77
FB8a_4	16,8	40,4	27	72,6	1,6	0,2	91
FB8a_5	17	31,8	8	66,6	2,3	0,2	81
FB8b_1	16,5	63,3	2,5	70,7	5,3	0,1	41
FB8b_3	16,4	34,2	33,7	65	6,6	0,2	135
FB16_1	16,8	42,7	1,3	66,8	3,7	0,3	82
FB16_3	15,6	25,4	4,1	65	1,4	0,3	103
FB16_5	18	35,4	sd	65	1,9	0,5	81
<b>Media</b>	16,51	34,96	10,92	66,25	3,57	0,27	
<b>D.S</b>	1,59	12,66	10,75	2,96	1,86	0,11	
<b>Regl. Bromat.</b>							
<b>Nacional</b>	máx 20	máx 40	máx 40	mín 65	máx 5	máx 0,6	

JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A., Juan Lacaze. FB2, estación de monitoreo ubicada a 2 km; FB4, estación de monitoreo a 4 km; FB8 estaciones de monitoreo a 8km y FB16 estación de monitoreo a 16 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM, Fray Bentos

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos de muestras de miel provenientes de apiarios pertenecientes a la red de monitoreo en Juan Lacaze, Colonia.

Ubicación_Nº colmena	Humedad (%)	Acidez (meq/kg)	HMF (mg/kg)	Az Reductores (%)	Sacarosa (%)	Cenizas (%)	Color (mm)
JL2_3	17,4	54,4	1,2	68,2	2	0,6	80
JL2_4	15,2	57,3	sd	67,8	2	0,8	86
JL4_1	16,2	58,8	sd	65	4,5	1,1	110
JL4_4	15,6	55,3	sd	65,8	6,5	1,1	108
JL4_5	14,6	56,7	2	66,3	4,8	1,1	108
JL8a_3	16,9	58,9	sd	66,1	5,4	0,9	101
JL8a_5	18,4	45,8	sd	65	4,6	0,4	sd
JL8c_1	18,4	60,2	sd	65	4,8	0,7	85
JL8c_2	16,6	29,3	6,6	62,1	3,1	0,2	52
JL8c_5	16,6	64,4	sd	66,1	11,1	0,8	100
<b>Media</b>	16,59	54,11	0,98	65,74	4,88	0,77	
<b>D.S</b>	1,26	9,95	2,09	1,69	2,62	0,31	
<b>Regl. Bromat. Nacional</b>	máx. 20	máx. 40	máx. 40	mín. 65	máx. 5	máx. 0,6	

JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A., Juan Lacaze. FB2, estación de monitoreo ubicada a 2 km; FB4, estación de monitoreo a 4 km; FB8 estaciones de monitoreo a 8km y FB16 estación de monitoreo a 16 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM, Fray Bentos

El contenido de cenizas de las muestras analizadas estuvo en el rango de 0,1 – 1,1%. Las muestras de miel provenientes de Juan Lacaze mostraron, en términos generales, valores mayores en el contenido de cenizas que las muestras de Fray Bentos.

Los azúcares mayoritarios presentes en la miel son fructosa y glucosa. La cantidad de azúcares reductores estuvo entre 61,6 y 72,6% para las muestras de miel analizadas. El menor porcentaje de sacarosa registrado correspondió a colmenas de dos apiarios instalados en Fray Bentos (1,2%), mientras que el mayor valor correspondió a una colmena de Juan Lacaze (11,1%).

El contenido de hidroximetilfurfural (HMF) estuvo comprendido en el rango de 1,2 a 33,7 mg/kg. Para las mieles provenientes de los apiarios en Juan Lacaze el valor medio de HMF fue de 0,98 mg/kg, mientras que para las mieles de los apiarios en Fray Bentos el valor medio fue de 10,92 mg/kg.

Las mieles muestran colores muy diferentes que varían desde blanco o amarillo pálido a rojo oscuro o incluso negro. Como se observa en las Tablas 7 y 8, predominan las mieles oscuras tanto en Juan Lacaze como en Fray Bentos.

La cantidad y variedad de minerales presentes en la miel dependen de los nutrientes que hayan sido absorbidos por las plantas, su disponibilidad en el suelo y de la contaminación ambiental (Gonzalez-Miret *et al.*, 2005). Los valores de SO<sub>2</sub> presentes en las muestras de miel provenientes de los diferentes apiarios de Juan Lacaze y Fray Bentos se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Contenido de SO<sub>2</sub> en muestras de miel provenientes de las redes de monitoreo en Juan Lacaze y Fray Bentos.

<b>Red de monitoreo</b>	<b>Estación</b>	<b>SO<sub>2</sub> (ppm)</b>
<b>Juan Lacaze</b>	JL2	65
	JL4	119
	JL8a	72
	JL8c	64
<b>Fray Bentos</b>	FB2	64
	FB4	60
	FB8a	45
	FB8b	54
	FB16	45

JL8, estación de monitoreo a 8 km; JL4, estación de monitoreo a 4 km; JL2, estación de monitoreo a 2 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa FANAPEL S.A., Juan Lacaze. FB2, estación de monitoreo ubicada a 2 km; FB4, estación de monitoreo a 4 km; FB8 estaciones de monitoreo a 8km y FB16 estación de monitoreo a 16 km de distancia con respecto a la planta de pulpa de celulosa UPM, Fray Bentos.

## TOXICIDAD AGUDA EN ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS POR CONTACTO A INSECTICIDAS

En una primera instancia se realizaron ensayos preliminares para determinar el rango de prueba para cada formulación comercial con los que se trabajaría en los ensayos definitivos. Para dichos ensayos se tomaron como referencia los valores de  $DL_{50}$  por contacto disponibles en la literatura (tabla 11). En los ensayos definitivos se usó un mínimo de cinco concentraciones para cada principio activo. Las concentraciones fueron espaciadas de forma tal que la mortalidad registrada estuviera comprendida entre 0 y 100%. Los valores promedios de mortalidad a las 48 horas posteriores a la exposición a las diferentes concentraciones de insecticida se muestran en las Figuras 15-19.

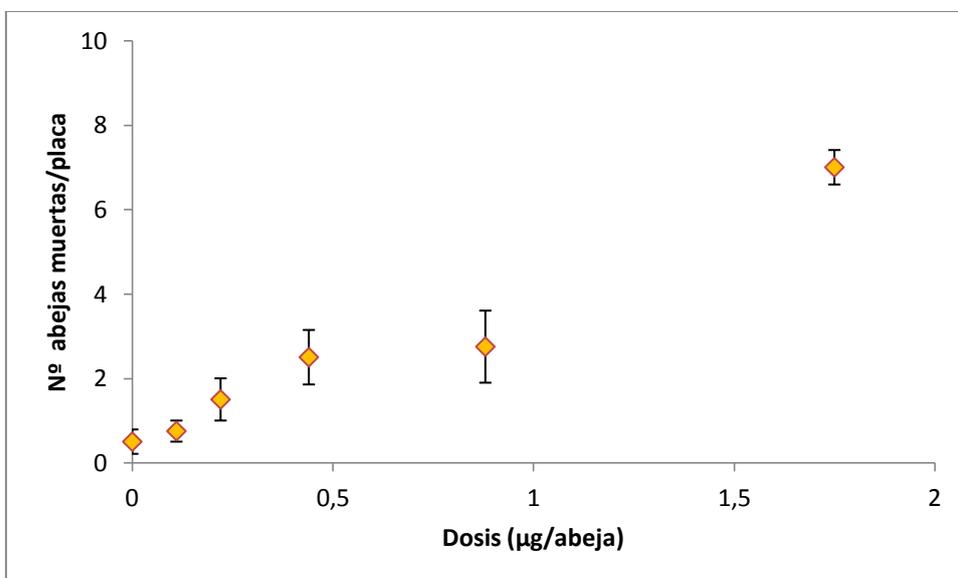


Figura 15. Número de abejas muertas por placa a las 48 horas posteriores a la exposición a diferentes dosis de la formulación comercial Thionex 35 (principio activo: endosulfan). En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  E.S ( $n_{\text{dosis}} = 40$ ;  $n_{\text{total}} = 240$ ).

Tanto los ensayos de prueba como definitivos que presentaron una mortalidad superior al 20% en el control, fueron desechados.

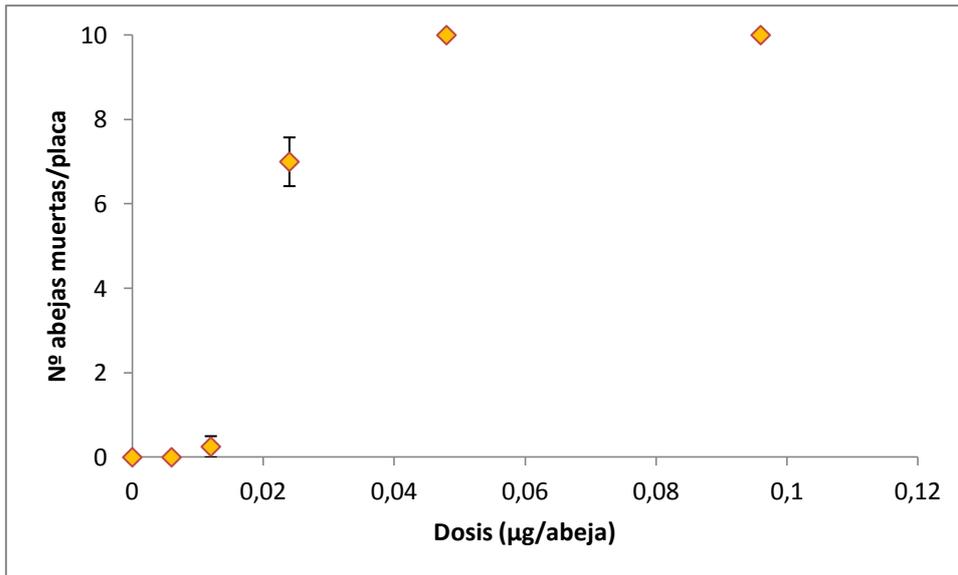


Figura 16. Número de abejas muertas por placa a las 48 horas posteriores a la exposición a diferentes dosis de la formulación comercial Lorsban 48E (principio activo: clorpirifos). En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  E.S ( $n_{\text{dosis}} = 40$ ;  $n_{\text{total}} = 240$ ).

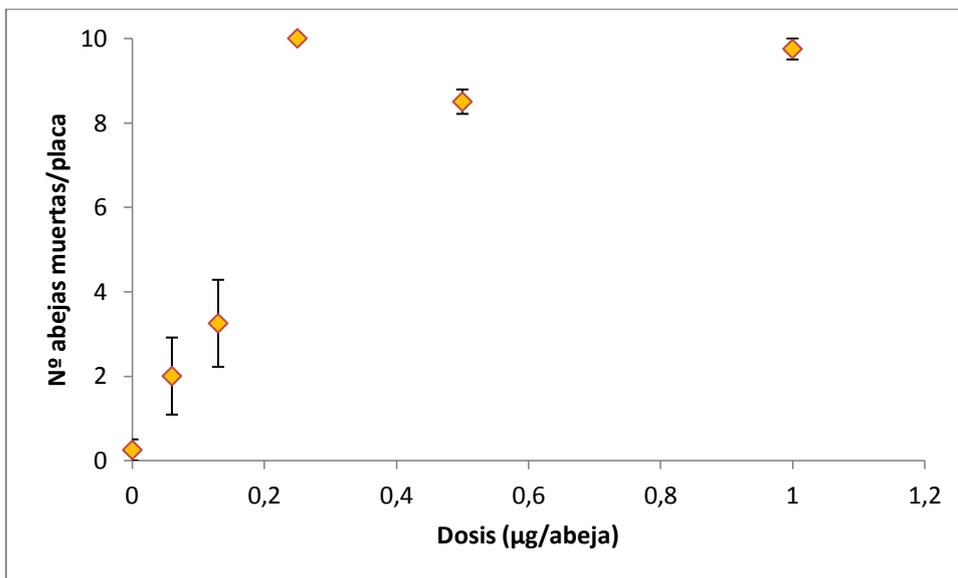


Figura 17. Número de abejas muertas por placa a las 48 horas posteriores a la exposición a diferentes dosis de la formulación comercial Karate <sup>TM</sup> (principio activo: lambda-cialotrina). En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  E.S ( $n_{\text{dosis}} = 40$ ;  $n_{\text{total}} = 240$ ).

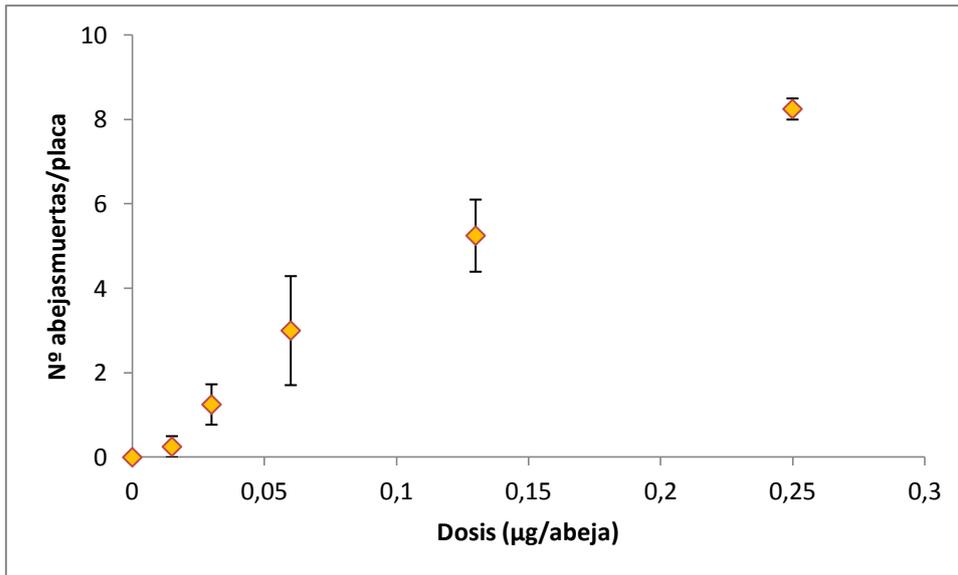


Figura 18. Número de abejas muertas por placa a las 48 horas posteriores a la exposición a diferentes dosis de la formulación comercial Cipermetrina Agrin (principio activo: alfa-cipermetrina). En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  E.S ( $n_{\text{dosis}} = 40$ ;  $n_{\text{total}} = 240$ ).

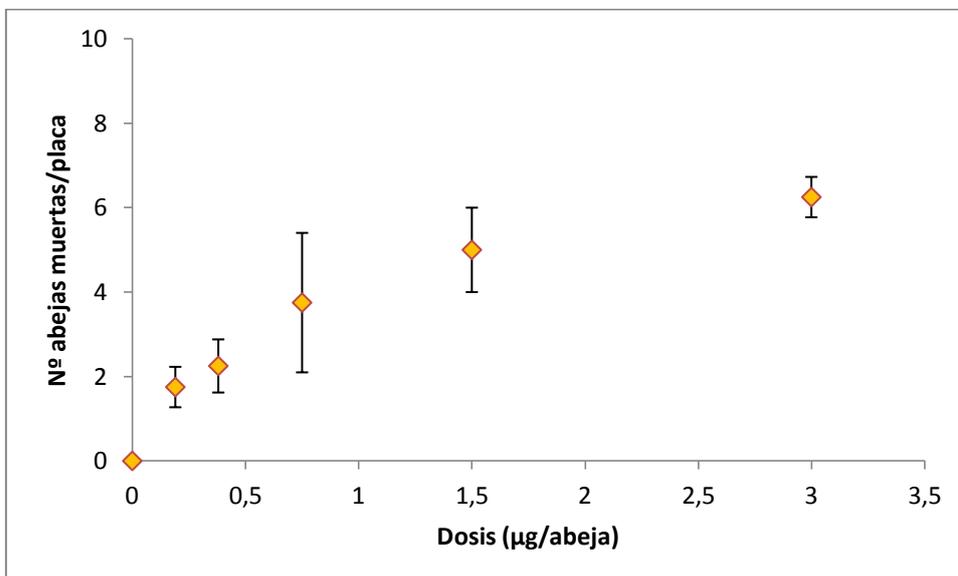


Figura 19. Número de abejas muertas por placa a las 48 horas posteriores a la exposición a diferentes dosis de la formulación comercial Gaucho 600 FS (principio activo: Imidacloprid). En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  E.S ( $n_{\text{dosis}} = 40$ ;  $n_{\text{total}} = 240$ ).

En el caso de la formulación comercial Intrepid SC (principio activo: metoxifenocide), los valores de mortalidad obtenidos para la dosis mayor empleada (1200 µg/abeja) fue inferior al 20%. Dado que las formulaciones con un  $DL_{50}$  mayor a 11 µg/abeja se

consideran no tóxicas para las abejas, el valor de DL<sub>50</sub> se informa como mayor a la concentración más alta ensayada.

Los valores de DL<sub>50</sub> por contacto a las 48 h obtenidos para los diferentes insecticidas se muestran en la tabla 10. El insecticida que mostró la mayor toxicidad por contacto para las abejas fue la formulación comercial Lorsban 48E (principio activo: clorpirifos) y el menos tóxico fue la formulación comercial Intrepid SC (principio activo: metoxifenocida). Los insecticidas alfa-cepermetrina y lambda-cialotrina no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a sus valores de DL<sub>50</sub> por contacto (Mann-Whitney p = 0.309). De igual forma, las formulaciones comerciales Thionex 35 y Gaucho 600 FS, no mostraron diferencias significativas (Mann-Whitney p = 1).

Tabla 10. Valores de toxicidad aguda por contacto (DL<sub>50</sub>, I.C ± 95%) obtenidos a partir de los datos de mortalidad a las 48 horas para abejas de la región litoral oeste del país.

<b>Principio activo</b>	<b>Producto comercial</b>	<b>DL<sub>50</sub> (µg/abeja)*</b>	<b>I.C sup 95%</b>	<b>I.C inf 95%</b>
Endosulfan	Thionex 35	1,27	1,55	0,99
Clorpirifos	Lorsban 48E	0,02	0	0
Metoxifenocida	Intrepid SC	> 1200		
Lambda-Cialotrina	Karate	0,15	0,21	0,11
Alfa-Cipermetrina	Cipermetrina Agrin	0,11	0,15	0,06
Imidacloprid	Gaucho 600 FS	1,30	2,43	0,17

El valor de LD<sub>50</sub> es una media aritmética (n=4)

## DISCUSIÓN

### EFICIENCIA DE COLECTA DE ABEJAS MUERTAS CON DIFERENTES TIPOS DE TRAMPAS

Las abejas necróforas fueron capaces de remover las abejas adultas muertas marcadas casi inmediatamente luego de ser introducidas en las colmenas. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Greatti *et al.* (1994), quienes recuperaron aproximadamente el 80% de las abejas muertas marcadas introducidas dentro de la media hora posterior al inicio del ensayo. El porcentaje de recuperación para la trampa

“underbasket” fue de 68% en el primer ensayo y de 81,6% de las abejas introducidas durante el segundo ensayo. En ambos ensayos la eficiencia de colecta y retención de la trampa “underbasket” fue la más alta.

Los resultados obtenidos en los ensayos muestran que el uso de diferentes tipos de trampas conduce a diferentes resultados cuando se evalúa la mortalidad en las colmenas. Pérez *et al.* (2001) obtuvieron resultados diferentes dependiendo del tipo de trampa. Las trampas utilizadas en dicho estudio fueron tipo “caja” (box trap) y tipo “colector” (collector trap). De igual forma, Illies *et al.* (2002) compararon las trampas “Gary” original, “Gary modificada”, trampa “IPSAB” y trampa “Muenster” obteniendo valores medios de recuperación de abejas marcadas diferentes para cada trampa. Por tanto, no se puede comparar los resultados obtenidos de la evaluación de la mortalidad en las colmenas ya que se utilizaron diferentes tipos de trampas para abejas muertas.

Las diferencias observadas en la evaluación de la mortalidad probablemente se deban al diseño de las trampas. El motivo radicaría en que la trampa “underbasket” es básicamente un marco de madera colocado en el piso al frente de la colmena, la cual colecta las abejas muertas retiradas por las necróforas y las protege de los predadores. Por tal motivo, las abejas no consideran dicha trampa como parte de la colmena y ésta, no interfiere considerablemente con la actividad de la colonia. Las trampas “de barrera” e “INIA\_LE”, por el contrario, pasan a formar parte de la colmena por lo que las necróforas retiran las abejas muertas marcadas de su interior.

El número de abejas muertas marcadas recuperadas a las 24 horas varía con el tipo de trampa. La trampa “underbasket” muestra la mayor eficiencia de recuperación, entre 30-44% del total de la muestra introducida al inicio del ensayo. Las restantes trampas muestran porcentajes de recuperación menores. Illies *et al.* (2002) obtuvieron porcentajes de recuperación inferiores al 50% para las trampas “Gary original”, “Gary modificada” e “IPSAB” y en torno al 60% del total de la muestra introducida a las 24 horas posteriores al inicio del ensayo para la trampa “Muenster” (Illies *et al.*, 2002). Esto demuestra que cuando se usa trampas para abejas muertas, sólo una parte de la mortalidad total en la colonia es muestreada.

## EFICIENCIA DE COLECTA DE LA TRAMPA “UNDERBASKET” EN EL TIEMPO

La uniformidad en cuanto a la eficiencia de colecta y retención en trampas para abejas muertas durante un periodo prolongado de tiempo, es un factor importante a la hora de seleccionar el tipo de trampa más adecuado para un programa de monitoreo ambiental (Greatti *et al.*, 1994). En el presente estudio, los resultados indican que la trampa “underbasket” muestra una eficiencia de recuperación que es afectada por la ubicación de la colmena y el tiempo transcurrido desde su instalación en la colmena. Este resultado es opuesto a los obtenidos en los trabajos de Greatti *et al.* (1994) y Accorti *et al.* (1991). Estos investigadores, observaron que la eficiencia de recuperación de la trampa “underbasket” permanecía invariable luego de 3 meses de instalada en las colmenas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que la interacción entre el tiempo y la eficiencia de colecta es positivo ya que, hay un aumento en la eficiencia de recuperación con el tiempo. En términos generales, este aumento puede atribuirse a un descenso en el tamaño poblacional de las colonias en Juan Lacaze (ver ANEXOS, tabla 4). Las obreras necróforas retirarían las abejas muertas marcadas de la colmena pero no removerían posteriormente de la trampa a las abejas muertas particularmente secas y por tanto, más livianas. Sin embargo, no se ha podido establecer una relación entre el porcentaje total de abejas colectadas y el tamaño poblacional de cada colmena (Pérez *et al.*, 2001).

En cuanto a la interacción de la ubicación de la colmena con la eficiencia de recuperación de la trampa “underbasket” se observa que a medida que hay un alejamiento de la fuente puntual de emisión aumenta la eficiencia de recuperación durante la primera y tercera semana del de ensayo (día 1 y 15). En la segunda semana de ensayo se observa una eficiencia de recuperación similar entre las trampas ubicadas en Juan Lacaze y las pertenecientes a la red de monitoreo en Fray Bentos.

## DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD NATURAL DIARIA DE ABEJAS EN UN APIARIO EXPERIMENTAL

La mortalidad diaria natural depende de muchos factores (estación del año, tamaño de la

colonia, ambiente que la rodea, etc.) (Michener, 1974; Winston & Fergusson, 1985; Seeley, 1995; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Tremolada *et al.* (2010), reportaron una mortalidad diaria media natural de 21 abejas/colmena/día empleando la trampa “underbasket” durante un ensayo realizado en un establecimiento agrícola al sureste de Milán, Italia. Por su parte, Van der Steen & Dinter (2007) reportaron una mortalidad diaria media de 8 abejas/colmena/día para apiarios ubicados en quintas de manzanos en Holanda empleando la trampa “Muenster”. En tanto, Zhong *et al.* (2003) obtuvieron una mortalidad diaria de 0 a 39 abejas/colmena/día en apiarios ubicados en Palmetto (Florida, EEUU) empleando trampas “Gary” modificadas.

Tomando en consideración el número de huevos depositados por la reina durante la estación, el número de celdas ocupadas por cría y el número de abejas adultas, se postula que alrededor de 1000 abejas mueren naturalmente en cualquier día dado, durante el periodo de mayor crecimiento poblacional (Porrini *et al.*, 2002). Valores de mortalidad diaria menores se registran tanto antes como después de este período.

De acuerdo con el valor de mortalidad diaria natural reportado por Porrini *et al.* (2002), tan sólo un 1% de las abejas que mueren en una colmena estarían siendo colectadas por la trampa “underbasket” ( $10,6 \pm 5,8$  abeja muertas/colmena/día) en el presente ensayo.

En cuanto a la tasa de mortalidad diaria, se obtuvieron valores entre 0,3 y 1,0 % para las diferentes colonias. La tasa de mortalidad diaria para una colonia con una población de tamaño promedio de 20.000 individuos y una mortalidad diaria de 1000 abejas (Porrini *et al.*, 2002), es de 50 %. Existe una clara diferencia entre los datos obtenidos en el presente estudio y los valores publicados por Porrini *et al.* (2002).

## MORTALIDAD DE ABEJAS EN APIARIOS UBICADOS EN LA REGIÓN LITORAL OESTE DEL PAÍS.

Los datos de mortalidad diaria registrados en la red de monitoreo en Juan Lacaze, variaron de acuerdo a la ubicación de la estación con respecto a la fuente puntual de emisión de SO<sub>2</sub>. Los valores promedio más altos se registraron en las estaciones ubicadas a 8 km (JL8a, b y c) y el menor valor en la estación a 4 km (JL4). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los datos de mortalidad diaria de las estaciones instaladas a 8 km.

Por otra parte, los valores de mortalidad diaria registrados para las estaciones de la red de monitoreo en Juan Lacaze difieren en forma estadísticamente significativa con el valor de mortalidad diaria obtenido para INIA-La Estanzuela (Mann-Whitney  $p = 0.001$ ). En términos generales, los valores de mortalidad diaria obtenidos en Juan Lacaze son menores al valor promedio registrado para INIA-La Estanzuela ( $10,6 \pm 5,8$  abeja muertas/colmena/día). Este resultado podría deberse a diferencias en la eficiencia de captura y retención de las muestras de la trampa “underbasket” asociada a la complejidad del paisaje, estación del año, presencia de saprofitos, etc. Porrini *et al.* (2000) observaron una mayor eficiencia de captura de la trampa “underbasket” en apiarios ubicados en ambientes simplificados y durante los meses de primavera con respecto a trampas en ambientes complejos y en los meses de verano. Dado que los ensayos para determinar la mortalidad diaria se llevaron a cabo durante el mes de enero en INIA-La Estanzuela y marzo en Juan Lacaze la estacionalidad podría explicar las diferencias observadas.

La mortalidad semanal registrada en la red de monitoreo de Juan Lacaze, presenta el mismo comportamiento que la mortalidad diaria con los valores medios más altos en las estaciones ubicadas a 8 km y el valor medio menor en la estación a 4 km de distancia de la fuente puntual de contaminación. Porrini *et al.* (2002), tomando en cuenta observaciones hechas en áreas no contaminadas, reportaron una mortalidad semanal de 175 abejas por colmena utilizando trampas “underbasket”, lo que correspondería a un 2,5% de la mortalidad semanal máxima (7000 abejas muertas/colmena/semana). En base a sus resultados, estos investigadores postulan un umbral crítico de mortalidad semanal por estación de muestreo (2 colmenas por estación) de 300-350 abejas muertas/semana (Porrini *et al.*, 2002; Celli & Maccagnani, 2003). Cuando los valores de mortalidad semanal sobrepasan dicho valor, se considera un evento de mortalidad anormal y se llevan a cabo análisis químicos de abejas y productos de la colmena en busca del compuesto o compuestos causantes del evento (Porrini *et al.*, 2002). En el presente trabajo se propone, de acuerdo con los resultados de mortalidad semanal obtenidos para la red de monitoreo de Juan Lacaze y Fray Bentos, un umbral crítico de 35 abejas/colmena/semana, es decir, 175 abejas muertas/semana por estación de muestreo (5 colmenas por estación).

De acuerdo a los datos preliminares obtenidos, la mortalidad semanal en colmenas ubicadas en Juan Lacaze y Fray Bentos no se comportaría de igual forma que los niveles de SO<sub>2</sub> cuantificados en miel. En el caso de la red de monitoreo ubicada en Juan Lacaze la mayor concentración de SO<sub>2</sub> en miel se registra en la estación a 4 km (JL4) a la que corresponde el menor valor de mortalidad semanal. Atkins (1979) afirma que tanto la temperatura como la dosis ejercen efectos directos en la toxicidad del SO<sub>2</sub> sobre las abejas. Durante los meses de abril y mayo de 2009 la temperatura media registrada por la estación meteorológica de INIA-La Estanzuela no superó los 18°C y 15°C, respectivamente. Por tanto, la temperatura probablemente sea un factor importante para explicar la falta de respuesta a la exposición a SO<sub>2</sub> en ambas redes de monitoreo ambiental.

Por otra parte, Ponikvar *et al.* (2005) encontraron que ciertos parámetros poblacionales (área total de cría, cantidad de abejas nacidas y pecoreadoras) no eran apropiados para evaluar la contaminación ambiental por emisiones de SO<sub>2</sub>. Ginevan *et al.* (1980), no observaron efectos sobre la mortalidad en abejas del sudor (*Lasioglossum zephyrum*) debido a la exposición a bajas concentraciones de SO<sub>2</sub> durante un período prolongado de tiempo. Sin embargo, otros autores han reportado cambios fisiológicos y comportamentales asociados a la exposición de abejas melíferas a SO<sub>2</sub>. Xiaobo & Rencai (1996) observaron una reducción en la duración de la vida de abejas obreras expuestas en laboratorio a diferentes concentraciones de SO<sub>2</sub> y temperatura. La actividad de pecoreo y la ganancia de peso total de la colonia de abejas, también se ven disminuidas debido a la fumigación de colmenas con SO<sub>2</sub> a bajas concentraciones durante varias semanas (Warrington, 1987). Los cambios en el peso de la colmena nos dan indicios sobre la productividad y la salud de la colonia (Mc Mullan, 2000). En relación con la actividad de pecoreo, las emisiones de SO<sub>2</sub>, trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>) y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) redujeron la producción de frutas en plantaciones cercanas a una fuente industrial en Polonia, debido a la reducción en la eficiencia de polinización de las abejas (Alstad *et al.*, 1982).

Las comunidades de insectos pueden mostrar patrones de respuesta diferentes (positiva o negativa) frente a la exposición a un gradiente de contaminación atmosférica. Freitag & Hastings (1973) observó que el tamaño de las poblaciones de escarabajos terrestre se incrementaba a medida que aumentaba la distancia a una fábrica de papel kraft cerca de

Thunder Bay, Ontario, Canadá. El agente tóxico causante de dicha respuesta negativa pudo ser el  $\text{SO}_4^{2-}$  o algún otro compuesto particulado liberado al aire a partir de la chimenea de la fábrica. Por otra parte, Holopainen *et al.* (1993) estudiaron la dinámica poblacional de áfidos a lo largo de un gradiente de emisión de  $\text{SO}_2$  a partir de una planta de celulosa en Kuopio (Finlandia). Estos investigadores observaron que los áfidos de coníferas tienen una respuesta positiva a la contaminación atmosférica especialmente al  $\text{SO}_2$ , con un incremento en la densidad poblacional en sitios próximos a la fuente puntual de contaminación.

Por otra parte, Banin-Fenske & Anand (2011) examinaron la diversidad, riqueza estimada y abundancia de las comunidades de insectos terrestres a lo largo de un gradiente de contaminación en Sudbury, Ontario, Canadá. Las comunidades de insectos estuvieron significativamente alteradas a lo largo del gradiente de estrés. Las hormigas y diecisiete grupos taxonómicos superiores (familia y orden) mostraron la mayor abundancia en los sitios con estrés intermedio. Ocho familias aumentaron su abundancia mientras que once familias disminuyeron su abundancia con la distancia respecto de la fuente de contaminación reflejando así, una respuesta compleja de la diversidad a la contaminación.

Los bosques en las montañas de San Bernardino (California) en torno a las áreas urbanas en la cuenca de Los Ángeles son afectados por el ozono y los compuestos nitrogenados provenientes de estas áreas. Las comunidades de insectos herbívoros de tres especies de plantas prominentes mostraron patrones de cambio que seguían el gradiente de contaminación atmosférica, siendo los insectos masticadores más dominantes en los sitios con alta contaminación (Eatough Jones & Paine, 2006).

Se debe destacar que la producción de pulpa de celulosa mediante el proceso Kraft emite a la atmósfera, además de  $\text{SO}_2$ , muchos otros compuestos entre los que se encuentran el dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano, óxidos de nitrógeno, compuestos orgánicos volátiles, compuestos de azufre reducidos (TRS, total reduced sulfur) y material particulado principalmente como sulfato de sodio (Pinkerton & Blosser, 1981; Jawjit *et al.*, 2006). Cada uno de estos compuestos tiene efectos tóxicos diferenciales en la biota y sus efectos conjuntos, si es que se diferencian a los del compuesto solo, son en muchos casos desconocidos (Alstad *et al.*, 1982).

Por tanto, habría indicios de una respuesta positiva de las abejas frente a un gradiente de contaminación atmosférica disminuyendo los niveles de mortalidad a concentraciones superiores de SO<sub>2</sub> de acuerdo a los resultados obtenidos para la red de monitoreo ubicada en Juan Lacaze, Colonia.

## LA MIEL COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR SO<sub>2</sub>

La miel ha demostrado ser un bioindicador de alta sensibilidad para la estimación de la contaminación ambiental con SO<sub>2</sub>. El valor medio de SO<sub>2</sub> en muestras de miel provenientes de la red de monitoreo en Juan Lacaze fue de 80 ppm mientras que, para la red de monitoreo en Fray Bentos fue de 54 ppm. Ponikvar *et al.* (2005) observaron que la cantidad de sulfato determinada en muestras de miel provenientes del área entorno a una central térmica de carbón en Slovenia, se correlacionaban con la emisión total anual de SO<sub>2</sub> obtenida por monitoreo electrónico. En 1994, durante el primer año de monitoreo del contenido de SO<sub>2</sub> en miel utilizando una red de apiarios, la concentración media en las muestras fue de 355 µg SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/g. Los niveles de sulfato en muestras de miel en ausencia de emisiones de SO<sub>2</sub> estuvo en torno a los 25 µg SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/g (Ponikvar *et al.*, 2005). Con posterioridad a este muestreo, la central instaló purificadores de gases por lo que los niveles de sulfato en miel se redujeron a 182µg SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/g y 117 µg SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/g en los años 2000 y 2001, respectivamente.

Devillers *et al.* (2002), llevaron a cabo el análisis elemental de 150 muestras de miel de acacia francesa colectadas directamente por apicultores a partir de colmenas ubicadas en ambientes contaminados y no contaminados. Los resultados destacaron la falta de contaminación importante, excepto en algunas muestras obtenida en zonas cercanas a áreas industriales en las cuales el Ag, Cu, Zn y S fueron encontrados en altas concentraciones. El valor medio para el azufre en dichas muestras fue de 15,39 ppm (Devillers *et al.*, 2002). Por su parte, González Paramás *et al.* (2000) reportaron una concentración de azufre media de 53,8 mg/kg para muestras de miel obtenidas en la región de Sierra de Francia, España. Rodríguez-Otero *et al.* (1994), reportaron una concentración de azufre media de 68 mg/kg en mieles provenientes de la región de Galicia, España. Mieles de tomillo colectadas en 17 provincias de España mostraron,

por su parte, una concentración media de azufre de 29 ppm, representando menos del 3% del contenido total de minerales de las muestras (Terrab *et al.*, 2004).

La composición mineral de la miel varía dependiendo del suelo y la vegetación entorno a la colmena, sin embargo, es difícil comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios debido a las diferencias en la metodología, método analítico, etc (Devillers *et al.*, 2002).

En cuanto a la toxicidad del SO<sub>2</sub> para el hombre, el codex alimentarius autoriza su uso como aditivo alimentario de acción conservadora y antioxidante en una amplia variedad de alimentos. Las dosis máximas permitidas dependen del alimento y comprenden un amplio rango de concentraciones entre 10 y 2000 µg SO<sub>2</sub>/kg de alimento. La norma general del codex alimentarius para los aditivos alimentarios (CODEX STAN 192-1995, 2011) no incluye a la miel dentro de los alimentos en los que se permite el uso de aditivos. A pesar de su amplio uso y de su eficacia como conservadores, al SO<sub>2</sub> se le atribuyen diversos efectos adversos en humanos, relacionados con su ingestión, particularmente en personas sensibles o vulnerables a los mismos. Al respecto, la directiva 2003/89/CE del parlamento Europeo y el Consejo (2003) establece que en el etiquetado de los productos alimenticios debe aparecer la descripción de los alérgenos alimentarios dentro de los que se incluye el anhídrido sulfuroso y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro expresado como SO<sub>2</sub>. Cabe mencionar que en Uruguay no existe reglamentación al respecto. Sin embargo, las concentraciones de SO<sub>2</sub> reportadas en el presente trabajo superan ampliamente los valores establecidos para los productos alimenticios en la Unión Europea.

La caracterización fisicoquímica de las mieles es también de fundamental importancia ya que es reflejo de la calidad del ambiente que rodea a la colmena.

El contenido de humedad de las muestras de miel es afectado por el clima, la estación y el contenido de humedad de la planta original. Los valores obtenidos estuvieron por debajo de 20%, salvo una única colmena en una estación de Fray Bentos. El Reglamento Bromatológico Nacional (2008) exige un máximo de 20% de humedad para mieles de néctar. Un valor elevado de humedad tiene una relación directa con la probabilidad de fermentación durante el almacenaje (Bogdanov, 2002). Malacalza *et al.* (2007) y Baroni *et al.* (2009) registraron valores similares de humedad en muestras de miel provenientes de las provincias de Córdoba y Buenos Aires, Argentina. De igual

forma, Welke *et al.* (2008) reportaron valores de humedad de aproximadamente 16-18% para muestras de miel de la región noroeste del Estado de Rio Grande del Sur, Brasil.

Para la sacarosa se observó que un 25 y 30% de las muestras de Fray Bentos y Juan Lacaze, respectivamente, superaban el límite máximo (5%) establecido por el Reglamento Bromatológico Nacional (2008). El alto contenido de sacarosa aparente en las mieles puede indicar una miel “verde”, esto es, cuando el producto todavía no fue totalmente transformado en glucosa y fructosa por la acción de la enzima invertasa segregada por las abejas, además de poder indicar una adulteración del producto (Sodré *et al.*, 2007).

La evaluación de la frescura de la miel involucra la determinación del contenido de hidroximetilfurfural (HMF). El HMF es producido por la descomposición de las hexosas catalizado por calentamiento. Debido a que este compuesto es tóxico, las mieles que tienen una concentración mayor a 40 mg/Kg no son apropiadas para consumo directo (Moreira *et al.*, 2007). Valores altos de HMF son indicadores de calentamiento, almacenamiento inadecuado y adulteración con azúcar invertida de la miel. Sin embargo, las mieles de países subtropicales, debido a las altas temperaturas, pueden tener un contenido alto de HMF sin que la miel haya sido calentada o adulterada (Sodré *et al.*, 2007). El codex alimentarius establece un límite de 80 mg/Kg mientras que, en la Comunidad Europea al igual que en nuestro país el límite es de 40 mg/Kg. Las muestras de miel analizadas cumplen con ambos límites. El valor medio obtenido para la red de Juan Lacaze es considerablemente menor a los reportados en la literatura (Malacalza *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2008; Welke *et al.*, 2008; Baroni *et al.*, 2009); sin embargo, no sucede lo mismo con la red de Fray Bentos.

La acidez de las mieles se debe a la presencia de ácidos orgánicos, particularmente ácido glucónico y algunos iones inorgánicos tales como fosfatos, cloruros y sulfatos (Moreira *et al.*, 2007; Ouchemoukh *et al.*, 2007). Para la acidez libre el Reglamento Bromatológico Nacional (2008) exige un límite máximo de 40 meq/g. Un 90% de las muestras de miel de la red de monitoreo en Juan Lacaze superaron este límite establecido, mientras que, solo un 30% de las muestras de Fray Bentos tuvieron valores superiores a las 40 meq/g. Valores de acidez libre superiores al establecido por la normativa suponen indicios de fermentación. Sin embargo, existen trabajos en los que

se han analizado mieles de calidad que, sin presentar ningún indicio de contaminación microbiana, poseen valores de acidez libre superiores a 40 meq/g (González *et al.*, 2000; Díez *et al.*, 2004; Meda *et al.*, 2005). Las mieles de mielada se caracterizan por altos valores de pH, acidez libre, contenido de ceniza y conductividad eléctrica (Kirkwood *et al.*, 1960; Soria *et al.*, 2005). La clasificación de las muestras en miel de néctar o de mielada se confirma mediante análisis melisopalinológico y fisicoquímicos. El análisis melisopalinológico está basado en la búsqueda de lo que se llama elementos de miel de mielada (principalmente esporas de hongos, micelio y algas). Estos se encuentran en el sedimento junto con granos de polen e impurezas microscópicas (tejido vegetal, pelos de plantas, hollín, cristales de oxalato, pelos de abejas y células de levadura) (Gómez-Baréz *et al.*, 2000; Díez *et al.*, 2004). El codex alimentarius define a la miel de mielada como aquella miel procedente de excreciones que los insectos succionadores (*Hemiptera*) (áfidos, cochinillas, etc.) dejan sobre las partes vivas de las plantas, o de secreciones de partes vivas de las plantas. Holopainen *et al.* (1993), estudiaron la dinámica poblacional de áfidos sobre plantas de pino y abeto a lo largo de un gradiente de emisión de SO<sub>2</sub> a partir de una planta de celulosa en Kuopio, Finlandia. Los resultados obtenidos por estos investigadores sugirieron que los áfidos de coníferas tienen una respuesta positiva a la contaminación atmosférica especialmente al SO<sub>2</sub>. Esto se debe probablemente a la promoción del crecimiento ninfal de los áfidos sobre plantas huéspedes dañadas por la contaminación. Existen observaciones sobre el incremento en el rango de crecimiento de áfidos o densidades de población en ambientes con niveles elevados de contaminación atmosférica. Estos ambientes a menudo están próximos a fuentes industriales de contaminación, áreas densamente pobladas o carreteras (Holopainen *et al.*, 1993).

Las diferencias en el contenido de cenizas podrían deberse a las características del suelo, condiciones climáticas y origen botánico de las mieles (Baroni *et al.*, 2009). El contenido de cenizas es también un parámetro útil en la determinación del origen botánico de la miel, permitiendo diferenciar entre miel de néctar y de mielada (Felsner *et al.*, 2004; Ouchemoukh *et al.*, 2007). Las mieles de néctar tienen un contenido de ceniza más bajo (0,6%) con respecto a las mieles de mielada (1,2%) (Feás *et al.*, 2010). La reglamentación nacional vigente exige un contenido de cenizas máximo de 0,6%. En el presente estudio, un 70% de las muestras de miel de la red de monitoreo en Juan

Lacaze superaron el valor máximo permitido por el Reglamento Bromatológico Nacional (2008), llegando en algunos casos casi a duplicar este valor (1,1%, JL4). Por otra parte, los valores obtenidos para la red de Fray Bentos fueron similares a los reportados por Welke *et al.* (2008) y Baroni *et al.* (2009).

La apariencia de los alimentos es otro de los factores que definen su calidad y es la primera impresión que el consumidor tiene directamente del alimento. El color, como parte de su apariencia, debe estar dentro del rango esperado para su aceptación por el consumidor y el grado de aceptabilidad es juzgado dentro de este rango (González-Miret *et al.*, 2005). Varios estudios revisados por González-Miret *et al.* (2005) analizan la relación del color de la miel con el origen floral, los métodos de procesamiento y la temperatura y/o el tiempo de almacenamiento. Otros autores han considerado la influencia que los granos de polen (su morfología y color) pueden tener sobre el color de la miel. El color de las muestras es afectado también por el contenido mineral (González-Miret *et al.*, 2005). En los apiarios de Juan Lacaze y Fray Bentos predominan las mieles de color ámbar claro (41,4%) y ámbar (41,4%). La predominancia del color ámbar también fue observada para mieles argentinas, italianas y brasileñas de los estados de Sao Pablo, Ceará y Piauí (Mendonça *et al.*, 2008). La reglamentación bromatológica uruguaya establece que el color de la miel puede ser variable desde casi incolora hasta pardo oscuro.

Un 16,7% de las muestras de miel presentaron valores de azúcares reductores menores al valor establecido por la reglamentación nacional (mínimo 65%). Sin embargo, los valores promedio para ambas redes estuvo por encima de dicho mínimo, en acuerdo con lo reportado por Mendonça *et al.* (2008) y Welke *et al.* (2008) para mieles del Brasil.

## TOXICIDAD AGUDA EN ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS POR CONTACTO A INSECTICIDAS

Los valores de DL<sub>50</sub> obtenidos para las formulaciones comerciales Thionex 35, Lorsban 48E, Karate y Cipermetrina Agrin difieren de los valores reportados en la literatura. Sin embargo, no sucede lo mismo con las formulaciones de metoxifenocida e imidacloprid (tabla 10 y 11).

Para el principio activo endosulfan, el valor de DL<sub>50</sub> obtenido en trabajos previos es 6 veces mayor al valor hallado (Atkins *et al.*, 1981). El endosulfan es un insecticida

organoclorado que actúa como veneno de contacto para una amplia variedad de insectos y ácaros. Posee dos isómeros,  $\beta$ -endosulfan y  $\alpha$ -endosulfan, que difieren en la orientación espacial del anillo con el grupo sulfato. En almacenamiento, el  $\beta$ -endosulfan se convierte lentamente en  $\alpha$ -endosulfan aun más tóxico ( $DL_{50}$   $\alpha$ -endosulfan 76 mg/kg en ratas,  $DL_{50}$   $\beta$ -endosulfan 240 mg/kg en ratas) (Kaushik & Kaushik, 2007). En la mayoría de los países desarrollados el endosulfan ha sido prohibido; sin embargo, en muchos países en desarrollo es de uso común (Devine & Furlong, 2007). En nuestro país, el uso de endosulfan se encontraba restringido a una única aplicación anual según resolución del MGAP (2007) y en el año 2011 se ha prohibido su uso por decreto del poder Ejecutivo.

Tabla 11. Valores de toxicidad aguda por contacto ( $DL_{50}$ ) para *Apis mellifera* reportados en la literatura.

Insecticidas	$DL_{50}$ ( $\mu$ g/abeja)	Referencia
Endosulfan	7,811	Atkins et al, 1981
Clorpirifos	0,11	Atkins et al, 1981
Metoxifenocide	>100	California Department of Pesticide Regulation, 2003
Lambda-cialotrina	0,913	EXTOXNET
Cipermetrina	0,023-0,56	US EPA
Imidacloprid	0,018	Iwasa et al, 2004

Los insecticidas organoclorados interfieren con los canales de cloro en la membrana de las células nerviosas bloqueando, de esta forma, la transmisión de impulsos nerviosos.

Para el insecticida organofosforado clorpirifos, por otra parte, se obtuvo un valor de  $DL_{50}$  por contacto de 0,02  $\mu$ g/abeja, 6 veces menor al reportado en la literatura (Atkins *et al.*, 1981). Los compuestos organofosforados son ampliamente usados como insecticidas, nematicidas y defoliantes. Los insecticidas que pertenecen a este grupo químico son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. El bloqueo de la acción de esta enzima interrumpe la transmisión de los impulsos nerviosos.

Los valores de  $DL_{50}$  por contacto obtenidos para los piretroides lambda-cialotrina (0,16  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ) y alfa-cipermetrina (0,11  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ) fueron 6 y 5 veces menores a los valores reportados (0,91 y 0,56  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ , respectivamente). Los piretroides son derivados sintéticos de las piretrinas y tienen un amplio uso en la agricultura para el control de insectos plaga debido a sus altas potencias insecticidas (actúan principalmente por contacto), baja toxicidad para los mamíferos y biodegradabilidad.

La naturaleza repelente de los piretroides es importante para limitar la exposición de las abejas a este grupo de insecticidas altamente tóxico. Sin embargo, Thompson & Wilkins (2003) encontraron que ciertas combinaciones de alfa-cipermetrina y lambda-cialotrina con fungicidas, *in vitro*, reducían el efecto repelente de los piretroides aumentando el riesgo asociado a la exposición en abejas melíferas.

Los piretroides son neurotóxicos que alteran el normal funcionamiento del sistema nervioso de los insectos. Ejercen sus efectos tóxicos primeramente alterando las propiedades de conducción de los canales de sodio, lo cual es esencial para la generación y propagación de los potenciales de acción de las células excitables. Zhou *et al.* (2011) encontraron que los piretroides suprimen de forma importante la excitabilidad neuronal en células del cerebro de las abejas melíferas y los canales de sodio de la membrana nerviosa.

Finalmente, las formulaciones comerciales de metoxifenocid e imidacloprid mostraron un comportamiento diferente. Para el caso del metoxifenocid, la formulación comercial ensayada mostró un valor de  $DL_{50}$  similar al reportado en la literatura ( $>100 \mu\text{g}/\text{abeja}$ ). Este insecticida es un agonista no-esteroideo de la ecdisona, que se une al complejo EcR/USP interfiriendo con el proceso de muda en los insectos. El metoxifenocid pertenece al grupo de insecticidas reguladores del crecimiento en insectos (IGRs, insect growth regulators). En los países desarrollados, un alto porcentaje de los tratamientos fitosanitarios emplean estos nuevos compuestos llamados insecticidas de “riesgo bajo” por la Environmental Protection Agency (EPA) (Devine & Furlong, 2007).

Para el caso de la formulación comercial de imidacloprid, Gaucho 600 FS, el valor de  $DL_{50}$  (1,30  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ) es 72 veces mayor al reportado por Iwasa *et al.* (2004). Debe destacarse que estos investigadores trabajaron con el insecticida neonicotinoide técnico, de igual forma que Suchail *et al.* (2000), quienes reportaron valores de  $DL_{50}$  por

contacto en el rango de 14-24 ng/abeja.

El imidacloprid muestra una toxicidad selectiva para los insectos, la que se atribuye en parte a la alta afinidad por los receptores de acetilcolina tipo nicotínicos (nAChRs) de insectos en comparación con sus contrapartes en vertebrados (Matsuda *et al.*, 2001). El modo de acción de los neonicotinoides consiste en mimetizar la acción del neurotransmisor acetilcolina bloqueando así, los receptores e interrumpiendo la transmisión de los impulsos nerviosos entre las células nerviosas.

El imidacloprid es considerado un insecticida sistémico debido a que penetra dentro de las plantas tratadas a través del sistema vascular o la cutícula de las hojas y mata a los insectos perforadores y chupadores los cuales se alimentan de la savia o el contenido celular. Este insecticida puede ser usado como tratamiento para semillas, suelo o como espray foliar de acuerdo con el cultivo y la plaga blanco (Tasei *et al.*, 2003, Johnson *et al.*, 2010).

El incremento en el uso de neonicotinoides significa que hay un mayor potencial de los polinizadores a estar expuestos durante largos periodos ya que, los insecticidas sistémicos pueden encontrarse en el polen y néctar de las plantas durante todo su periodo de floración. La exposición a estos insecticidas puede tener efectos letales o subletales comportamentales y fisiológicos en las abejas (Brittain *et al.*, 2011).

De esta forma, los ensayos de toxicidad aguda con abejas obreras parecen ser poco adecuados para los insecticidas sistémicos dadas las diferentes rutas de exposición. Los ensayos crónicos de exposición oral usando una colonia entera pueden proveer una ruta mejor para cuantificar los efectos de los insecticidas sistémicos sobre las abejas (Johnson *et al.*, 2010). Pareja *et al.* (2011), investigaron el despoblamiento de colmenas en el Uruguay relacionada al uso de insecticidas en la zona litoral oeste del país. En muestras de panales y propóleos de colmenas despobladas detectaron la presencia de imidacloprid y fipronil en concentración de 377 µg/kg y 60 µg/kg, respectivamente. En tanto, en muestras de miel y propóleos provenientes de colmenas activas encontraron endosulfan, coumafos, cipermetrina, ethion y clorpirifos.

La presencia de imidacloprid en los panales de la colmena, significa que las abejas son capaces de adaptarse a niveles limitados de este insecticida en sus cuerpos, los cuales son excretados con la cera posteriormente (Pareja *et al.*, 2011). Por otra parte, la detección de imidacloprid en muestras de propóleo es una señal de que el insecticida es

incluido en la colmena luego de una serie de eventos donde no solo la ruta sistémica está involucrada sino también la ruta por contacto (Pareja *et al.*, 2011).

En cuanto a la clasificación de los insecticidas en grupos de toxicidad vemos que, la formulación comercial Thionex 35 mostró una  $DL_{50}$  inferior (1,27  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ) a la reportada en la literatura ( $DL_{50}$  7,81  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ), colocándolo dentro del Grupo I ( $DL_{50}$  = 0,001 a 1,99  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ). Por tal motivo, la formulación Thionex 35 sería considerada altamente tóxica para las abejas, en lugar de ser moderadamente tóxico (Grupo II,  $DL_{50}$  = 2,0 a 10,99  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ) como lo sugiere la literatura.

Por el contrario, el resto de las formulaciones comerciales ensayadas (Lorsban 48E, Karate, Intrepid SC, Cipermetrina Agrin, Gaucho 600 FS) continuaron perteneciendo a los grupos de toxicidad previamente establecidos. Las formulaciones de clorpirifos, alfa-cipermetrina y lambda-cialotrina están incluidas dentro del Grupo I formado por los pesticidas altamente tóxicos. De igual forma, las formulaciones de metoxifenocida e imidacloprid permanecieron dentro del Grupo III de toxicidad (pesticidas relativamente no tóxico), con valores de  $DL_{50}$  mayores a 11  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ .

Los diferentes insecticidas se ordenaron, según su toxicidad, de la siguiente forma: clorpirifos > alfa-cipermetrina = lambda-cialotrina > endosulfan = imidacloprid > metoxifenocida.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos decir que las diferencias observadas entre los valores de  $DL_{50}$  obtenidos y los reportados en la literatura pueden deberse a: 1- variaciones en la composición o proporciones de las formulaciones de los productos comerciales según el fabricante y 2- características genotípicas y fenotípicas de los organismos empleados en el ensayo.

El tipo de formulación es importante porque afectan la toxicidad del plaguicida. Los datos sobre los adyuvantes o los ingredientes “inertes” en las formulaciones son propiedad del fabricante y no son sometidas al escrutinio regulatorio a menos que los mismos sean clasificados como tóxicos. Sin embargo, los adyuvantes pueden afectar la potencia del pesticida alterando el patrón de dispersión, cambiando el grado de incorporación por los organismos, la duración del período de actividad o retrasando la degradación del ingrediente activo (Levitan *et al.*, 1995). Needham & Stevenson (1973) trabajaron con una formulación concentrada emulsionable y un polvo mojable de endosulfan que se aplicaron a un cultivo de colza en floración para evaluar su toxicidad

relativa sobre las abejas pecoreadoras. Sus resultados muestran que el endosulfan aplicado en emulsión puede ser más seguro para las abejas que el polvo mojable.

En segundo lugar, en los estudios mencionados no se especifica la subespecie con la que se realizaron los ensayos en laboratorio. Las subespecies, tanto europea como africana, varían en cuanto a su comportamiento y reproducción, reflejando su adaptación a diferentes climas y condiciones ecológicas (Sheppard *et al.*, 1999).

Suchail *et al.* (2000) encontró diferencias en los valores de DL<sub>50</sub> por contacto entre las subespecies de abejas, *A. m. mellifera* y *A. m. caucásica*. Luego de la aplicación por contacto de imidacloprid, los valores de DL<sub>50</sub> a las 48hrs fueron aproximadamente 24 ng/abeja para *A. m. mellifera* y de 14 ng/abeja para *A. m. caucásica*. Por otra parte, Tornier *et al.* (2003) llevaron a cabo ensayos estandarizados de laboratorio para determinar los valores de DL<sub>50</sub> oral y por contacto usando dos razas de abejas, *A. m. mellifera* y *A. m. cárnica*. La primera raza es la llamada “abeja negra”, distribuida principalmente en el sur de Europa (ejemplo España); mientras que la *A. m. cárnica* conocida como “abeja gris”, es común en el norte de Europa (ejemplo Alemania). Se concluyó en dicho trabajo que no existían diferencias significativas con respecto a la sensibilidad al tóxico (dimetoato) entre las dos razas de abejas evaluadas.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo queda demostrado que, dada la mayor eficiencia de colecta y retención de abejas muertas de la trampa “underbasket”, este es el modelo más adecuado para estimar la mortalidad diaria y semanal en colmenas del país. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos muestran que, los niveles de mortalidad semanal en colmenas ubicadas en las localidades de Juan Lacaze y Fray Bentos no sería un parámetro adecuado para evaluar la exposición local a SO<sub>2</sub>.

Por otra parte, la miel parecería ser un bioindicador prometedor para estimar la carga ambiental de SO<sub>2</sub> en la región litoral oeste del país. Además, las características fisicoquímicas de las mieles de esta región están, en su mayor parte, en conformidad con la normativa vigente en el país.

Con respecto a los valores de toxicidad aguda por contacto (DL<sub>50</sub>) obtenidos en el presente trabajo, muestran claras discrepancias con los reportados en la literatura internacional. Estas diferencias pueden deberse a diversos factores como se mencionó

anteriormente, sin embargo, dejan en claro la necesidad de generar información básica local sobre la toxicidad de los insecticidas en uso actualmente en el país y la determinación de sus efectos sobre el biotipo de abeja nacional.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos plantean la necesidad de realizar nuevos ensayos para profundizar las tendencias que se observaron en este trabajo. En tal sentido, es necesario un mayor número de ensayos para determinar la eficiencia de colecta de los diferentes tipos de trampa donde cada trampa sea evaluada en todas las colmenas que forman parte del estudio para eliminar la influencia de las diferencias individuales sobre los resultados. De igual forma, es necesario prolongar la duración de los ensayos para determinar la eficiencia de colecta en el tiempo de la trampa seleccionada, así como también evaluar los efectos del tamaño poblacional sobre dicha eficiencia.

En cuanto a la mortalidad semanal, el umbral crítico de 35 abejas/colmena/semana propuesto en el presente trabajo, debería ser corroborado en nuevos ensayos de mayor duración y en apiarios ubicados en otras regiones del país debido a la influencia de la estacionalidad y la ubicación de la colmena sobre la eficiencia de colecta de la trampa “underbasket”.

La miel demostró ser un bioindicador de exposición a  $\text{SO}_2$  prometedor, sin embargo, los resultados obtenidos necesitan ser corroborados en ensayos posteriores donde se analice el contenido de  $\text{SO}_2$  en un mayor número de muestras. Finalmente, sería necesario realizar análisis microbiológicos y melisopalínológicos complementarios para poder establecer el origen y calidad de las mieles.

## BIBLIOGRAFIA

- Abramson, C.; Aquino, I.; Ramalho, F.; Price, M.. 1999. The Effect of Insecticides on Learning in the Africanized Honey Bee (*Apis mellifera* L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 37, 529-535.
- Accorti, M.; Luti, F.; Tardicci, F.. 1991. Methods for collecting data on natural mortality in bee. Ethology, Ecology & Evolution. Special Issue 1, 123-126.
- Alstad, D.; Edmunds, G.; Weinstein, L.. 1982. Effects of air pollutants on insect populations. Annual Reviews of Entomology 27, 369-384.
- Atkins, E.L.; Kellum D.; Atkins, K.W.. 1981. Reducing pesticide hazards to honey bee: mortality prediction techniques and integrated management strategies. University of California, Division of Agricultural Sciences, Leaflet 2883, 23.
- Atkins, E.L.; Tood, F.E.; Anderson, L.D.. 1970. Honey bee field research aided by Todd dead hive entrance trap. California Agriculture 24, 12-13.
- Atkins, L.. 1979. Analysis of the apicultural industry in relation to geothermal development and agriculture in the Imperial Valley, Imperial Country, California. University of California Lawrence Livermore Laboratory (LLL) in the University of California, Riverside (UCR).
- Bailey, L; Ball, B. V.. 1991. Honey bee pathology. Ed. Academic Press, London.
- Banin-Fenske, J.; Anand, M.. 2011. Patterns of insect communities along a stress gradient following decommissioning of a Cu-Ni smelter. Environmental Pollution 159, 3036-3043.
- Baroni, M.; Arrua, C.; Nores, M.; Fayé, P.; Díaz, M.. Chiabrande, G.; Wunderlin, D.. 2009. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. Food Chemistry 114, 727-733.
- Becerra-Guzmán, F.; Guzmán-Novoa, E.; Correa-Benitez, A.; Zozaya-Rubio, A.. 2005. Length of life, age at first foraging and foraging life of Africanized and European honey bee (*Apis mellifera*) workers, during conditions of resource abundance. Journal of Apicultural Research 44 (4), 151-156.

- Bedano, J.; Cantu, M.; Doucet, M.. 2006. Influence of three different land management practices on soil mite (Arachnida: Acari) densities in relation to a natural soil. *Applied Soil Ecology* 32, 293–304.
- Bedano, J.; Domínguez, A.; Arolfo, R.. 2011. Assessment of soil biological degradation using mesofauna. *Soil and Tillage Research* 117, 55-60.
- Binimelis, R.; Pengue, W.; Monterroso, I.. 2009. “Transgenic treadmill”: Responses to the emergence and spread of glyphosate-resistant johnsongrass in Argentina. *Geoforum* 40, 623-633.
- Bogdanov, S.. 2002. Harmonised methods of International Honey Commission. Introduction and general comments on the methods. Swiss Bee Research Center, FAM, Liebefeld, Bern, Switzerland.
- Bordado, J.; Gomes, J.. 1997. Pollutant atmospheric emissions from Portuguese Kraft pulp mills. *The Science of the Total Environment* 208, 139-143.
- Brittain, C.; Potts, S.. 2011. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology* 12, 321-331.
- Brittain, C.; Vighi, M.; Bommarco, R.; Settele, J.; Potts, S.. 2010. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology* 11, 106-115.
- Burgett, M.; Shorney, S.; Cordara, J.; Gardiol, G.; Sheppard, W. S.. 1995. The present status of africanized honey bee in Uruguay. *American Bee Journal* 135, 328-330.
- California Department of Pesticide Regulation. 2003. Public Report. Methoxyfenozide
- Celli, G.; Maccagnani, B.. 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56, pp 137-139.
- Chauzat, M.P.; Carpentier, P.; Martel, A.C.; Bougeard, S.; Cougoule, N.; Porta, P.; Lachaize, J.; Madec, F.; Aubert, M.; Faucon, J.P.. 2009. Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. *Environmental Entomology* 38 (3), 514-523.

- Cluzeau, S.. 2002. Risk assessment of plant protection products on honey bee. Regulatory aspects. En: Devillers, J.; Pham-Delegue, M.H. (Eds), Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Ed. Taylor and Francis, London, UK, pp 42-54.
- CODEX STAN 192-1995. 2011. Norma general del Codex para los aditivos alimentarios. Disponible en la web: [http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS\\_192s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf)
- Dale, V.; Polasky, S.. 2007. Measures of the effects of agricultural practices on ecosystem services. *Ecological Economics* 64, 286-296.
- Decourtye, A.; Devillers, J.; Genecque, E.; Le Menach, K.; Budzinski, H.; Cluzeau, S.; Pham-Delègue, M.. 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.
- Decourtye, A.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; Charreton, M.; Pham-Delègue, M.. 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 410–419.
- Devillers, J.. 2002. Acute toxicity of pesticides to honey bees. En: Devillers, J.; Pham-Delegue, M.H. (Eds), Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Ed. Taylor and Francis, London, UK, pp 56-64.
- Devillers, J.. 2002a. The ecological importance of honey bee and their relevance to ecotoxicology. En: Devillers, J.; Pham-Delegue, M.H. (Eds), Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Ed. Taylor and Francis, London, UK, pp 1-10.
- Devillers, J.; Ben Ghouma-Tomasella, N.; Dore, J.C.. 2002. Cesium-134 and Cesium-137 in French honeys collected after the Chernobyl accident. En: Devillers, J.; Pham-Delegue, M.H. (Eds), Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Ed. Taylor and Francis, London, UK, pp 151-159.

- Devillers, J.; Pham-Delegue, M.; Decourtye, A.; Budzinski, H.; Cluzeau, S.; Maurin, G.. 2003. Modeling the acute toxicity of pesticides to *Apis mellifera*. *Bulletin of Insectology* 56, 103-109.
- Devine, G.J.; Furlong, M.J.. 2007. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values* 24, 281-306.
- DIEA. 2010. Series históricas de Datos. Dirección de Información y Estadísticas Agropecuarias, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay. 2010. Disponible en la web: <http://www.mgap.gub.uy>
- DIEA. 2011a. Encuesta agrícola “invierno 2011”. MGAP. Disponible en la web: <http://www.mgap.gub.uy/portal/>
- DIEA. 2011b. Anuario Estadístico Agropecuario 2010. MGAP. Disponible en la web: <http://www.mgap.gub.uy/portal/>
- Díez, M.J.; Andrés, C.; Terrab, A.. 2004. Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 167–176.
- Diniz, N.; Egea, A.; Sheppard, W.; Del Lama, M.. 2003. Genetic structure of honey bee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* 26, 47-52.
- DIRECTIVA 2003/89/CE Del Parlamento Europeo y del Consejo. 2003. Indicación de los ingredientes presente en los productos alimenticios. Disponible en la web: [http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/fl\\_com2003-89\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/fl_com2003-89_es.pdf)
- Eatough Jones, M.; Paine, T.. 2006. Detecting changes in insect herbivore communities along a pollution gradient. *Environmental Pollution* 143, 377-387.
- Edwards, D.P.; Laurance, S.G.. 2012. Green labelling, sustainability and the expansion of tropical agriculture: Critical issues for certification schemes. *Biological Conservation*. doi:10.1016/j.biocon.2012.01.017

- Ellis, M.; Siegfried, B.; Spawn, B.. 1997. The effect of Apistan® on honey bee (*Apis mellifera* L). Responses to Methyl parathion, carbaryl and bifenthrin exposure. *Apidologie* 28,123-127.
- Faucon, J.P.; Aurières, C.; Drajnudel, P.; Mathieu, L.; Ribière, M.; Martel, A.C.; Zeggane, Chauzat, M.P.; Aubert, M.. 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Management Science* 61, 111-125.
- Feás, X.; Pires, J.; Estevinho, M.; Iglesias, A.; Pinto de Araujo, P.. 2010. Palynological and physicochemical data characterization of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. *International Journal of Food Science and Technology* 45, 1255–1262.
- Felsner, M.; Cano, C.; Bruns, R.; Watanabe, H.; Almeida-Muradian, L.; Matos, J.. 2004. Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. *Journal of Food Composition and Analysis* 17, 737–747.
- Freitag, R.; Hastings, L.. 1973. Kraft mill fallout and ground beetle populations. *Short Communication. Atmospheric Environment* 7, 587-588.
- Fries, I.. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S73–S79.
- Ghini, S.; Fernández, M.; Picó, Y.; Marín, R.; Fini, F.; Mañes, J.; Girotti, S.. 2004. Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybee as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 479-488.
- Ginevan, M.E.; Lane, D.D.; Greenberg, L.. 1980. Ambient air concentration of sulfur dioxide affects flight activity in bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (10), 5631-5633.
- Gómez Bárez, J.; Garcia-Villanova, R.; Elvira García, S.; Rivas Palá, T.; González Paramás, A.; Sánchez Sánchez, J.. 2000. Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *European Food Research and Technology* 210, 437-444.

- González Paramás, A.; Gómez Bárez, A.; Garcia-Villanova, R.; Rivas Palá, T.; Ardanuy Albajar, R.; Sánchez Sánchez, J.. 2000. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 157-165.
- González-Miret, M.; Terrab, A.; Hernanz, D.; Fernandez-Recamales, M.; Heredia, F.. 2005. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2574-2580.
- Gordon, L.; Finlayson, C.; Falkenmark, M.. 2010. Managing water in agriculture for food production and other ecosystem services. *Agricultural Water Management* 97, 512-519.
- Greatti, M.; Barbattini, R.; D'Agaro, M.; Nazzi, F.. 1994. Effect of time on the efficiency of different traps for collecting dead honey bees. *Apicoltura* 9, 67-72.
- Gupta, P.; Chandel, R.. 1995. Effects of diflubenzuron and penfluron on workers of *Apis cerana indica* F y *Apis mellifera* L. *Apidologie* 26, 3-10.
- Hendriksma, H.; Hartel, S.. 2010. A simple trap to measure worker bee mortality in small test colonies. *Journal of Apicultural Research Bee World* 49, 215-217.
- Holopainen, J.K.; Mustaniemi, A.; Kainulainen, P.; Satka, H.; Oksanen, J.. 1993. Conifer aphids in an air-polluted environment. I. Aphid density, growth and accumulation of sulphur and nitrogen by Scots pine and Norway spruce seedlings. *Environmental Pollution* 80, 185-191.
- Illies, I.; Muhlen, W.; Ducker, G.; Sachser, N.. 2002. The influence of different bee traps on undertaking behaviour of the honey bee (*Apis mellifera*) and development of a new trap. *Apidologie* 33, 315-326.
- Iwasa, T.; Motoyama, N.; Ambrose, J.; Roe, R.. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23, 371-378.
- Jawjit, W.; Kroeze, C.; Soontaranun, W.; Hordijk, L.. 2006. An analysis of the environmental pressure exerted by the eucalyptus based kraft pulp industry in Thailand. *Environment, Development and Sustainability* 8, 289-311.

- Johnson, R.; Ellis, M.; Mullin, C.; Frazier, M.. 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. Review. *Apidologie* 41, 312-331.
- Johnson, W.; Davis, V.; Kruger, G.; Weller, S.. 2009. Influence of glyphosate-resistant cropping systems on weed species shifts and glyphosate-resistant weed populations. *European Journal of Agronomy* 31, 162-172.
- Kaushik, P.; Kaushik, G.. 2007. An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides. *Journal of Hazardous Materials* 143, 102-111.
- Kerr, W.E.; De Leon, S.; Dardo, M.. 1982. The southern limits of the distribution of the africanized honeybee in South America. *American Bee Journal* 122, 196-198.
- Kevan, P.. 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74, 373-393.
- Kevan, P.; Clark, A.; Thomas, V.. 1990. Insect pollinators and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 5, 13-22.
- Kirk Visscher, P.. 1983. The honey bee way of death: Necrophoric behaviour in *Apis mellifera* colonies. *Animal Behaviour* 31, 1070-1076.
- Kirkwood, K.; Mitchell, T.; Smith, D.. 1960. An examination of the occurrence of honeydew in honey. *Analyst* 85, 412-416.
- Klein, A.; Vaissière, B.; Cane, J.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.; Kremen, C.; Tschamntke, T.. 2007. Review. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B* 274, 303-313.
- Koch, H.; Weiber, P.. 1997. Exposure of honey bees during pesticide application under field conditions. *Apidologie* 28, 439-447.
- Kuldna, P.; Peterson, K.; Poltimäe, H.; Luig, J.. 2009. An application of DPSIR framework to identify issues of pollinator loss. *Ecological Economics* 69, 32-42.
- Le Féon, V.; Schermann-Legionnet, A.; Delettre, Y.; Aviron, S.; Billeter, R.; Bugter, R.; Hendrickx, F.; Burel, F.. 2010. Intensification of agriculture, landscape composition and wild bee communities: a large scale study in four European countries. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 137, 143-150.

- Levitan, L.; Merwin, I.; Kovach, J.. 1995. Assessing the relative environmental impacts of agricultural pesticides: the quest for a holistic method. Review. *Agriculture, Ecosystems and Environmental* 55, 153-168.
- Malacalza, N.; Mouteira, M.; Baldi, B.; Lupano, C.. 2007. Characterisation of honey from different regions of the province of Buenos Aires, Argentina. *Journal of Apicultural Research* 46, 8-14.
- Manuel-Navarrete, D; Gallopín, G.; Blanco, M.; Díaz-Zorita, M.; Ferraro, D.; Herzer, H.; Laterra, P.; Morello, J.; Murmis, M.R.; Pengue, W.; Piñeiro, M.; Podestá, G.; Satorre, E.H.; Torrent, E.M.; Torres, F.; Viglizzo, E.; Caputo, M.G. Celis . 2005. Análisis sistémico de la agriculturización en la pampa húmeda argentina y sus consecuencias en regiones extra- pampeanas: sostenibilidad, brechas de conocimiento e integración de políticas. División de Desarrollo Sostenible y Asentamientos Humanos, CEPAL, Santiago, Chile, 65 pp. Disponible en la web: <http://www.cepal.org/publicaciones/xml/7/23937/S118MA-L2446e-P.pdf>
- Matsuda, K.; Buckingham, S.D.; Kleier, D.; Rauh, J.; Grauso, M.; Sattelle, D.. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. Review. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 573-580.
- Mayer, D; Johansen, C.; Eves, D.; Britt, R.; Bergin, D.. 1980. Monitoring of honey bee mortality from pesticides. *American Bee Journal* 120, 352-355.
- Mc Mullan, J.. 2000. Weighing beehives: a simple lever method. *Bee World* 81(1), 11-19.
- Meda, A.; Lamien, C.; Millogo, J.; Romito, M.; Nacoulma, O.. 2005. Physicochemical Analyses of Burkina Fasan Honey. *Acta Veterinaria Brno* 74, 147-152.
- Mendonça, K.; Marchini, L.; De Almeida Souza, B.; De Almeida-Anacleto, D.; De Camargo Carmello Moreti, A. 2008. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellifera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. *Ciência Rural* 38, 1748-1753.
- Michener, C. D.. 1974. The social behavior of the bees: a comparative study. Ed. Harvard University Press, Cambridge.

- Moreira, R.; De María, C.; Pietroluongo, M.; Trugo, L.. 2007. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chemistry* 104, 1236-1241.
- Needham, P.H.; Stevenson, J.H.. 1973. The toxicity to foraging honeybees, *Apis mellifera*, of endosulfan, malathion and azimphos-methyl applied to flowering oil seed rape, *Brassica napus*. *Annals of Applied Biology* 75, 235-240.
- Nin Cirión, R.. 2003. Miel: situación actual y perspectivas. OPYPA-Anuario 2003.
- OEPP/EPPO. 2001. EPPO Standards PP1/170(3) Test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 31, 323–330.
- Ondo Zue Abaga, N.; Alibert, P.; Dousset, S.; Savadogo, P.; Savadogo, M.; Sedogo, M.. 2011. Insecticide residues in cotton soils of Burkina Faso and effects of insecticides on fluctuating asymmetry in honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Chemosphere* 83, 585-592.
- Ouchemoukh, S.; Louaileche, H.; Schweitzer, P.. 2007. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control* 18, 52-58.
- Pareja, L.; Colazzo, M.; Perez-Parada, A.; Niell, S.; Carrasco-Letelier, L.; Besil, N.; Cesio, M.; Heinzen, H.. 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8, 3844-3858.
- Pérez, J.J.; Higes, M.; Suarez, M.; Llorente, J.; Meana, A.. 2001. Easy ways to determine honey bee mortality using dead-bee traps. *Journal of Apicultural Research* 40, 25-28.
- Pinkerton, J. E.; Blosser, R. O.. 1981. Characterization of kraft pulp mill particulate emissions – A summary of existing measurements and observations. *Atmospheric Environment* 15, 2071-2078.
- Ponikvar, M.; Šnajder, J.; Sedej, B.. 2005. Honey bee as a bioindicator for environmental pollution with SO<sub>2</sub>. *Apidologie* 36, 403-409.

- Porrini, C.; Ghini, S.; Girotti, S.; Sabatini, A.; Gattavecchia, E.; Celli, G.. 2002. Use of honey bees as biondicators of environmental pollution in Italy. En: Devillers, J.; Pham-Delegue, M.H. (Eds), Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Ed. Taylor and Francis, London, UK, pp 186-247.
- Porrini, C.; Monaco, L.; Medrzycki, P.. 2000. Rilevamento della mortalità di *Apis mellifera* L. (Hymenoptera Apidae) nel biomonitoraggio dei pesticidi: strutture a confronto e prospettive. Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna 54, 101-112.
- Porrini, C.; Sabatini, A.; Girotti, S.; Ghini, S.; Medrzycki, P.; Grillenzoni, F.; Bortolotti, L.; Gattavecchia, E.; Celli, G.. 2003. Honey Bee and Bee Products as Monitors of the Environmental Contamination. *Apiacta* 38, 63-70.
- Porrini, C.; Sabatini, A.G.; Girotti, S.; Fini, F.; Monaco, L.; Celli, G.; Bortolotti, L.; Ghini, S.. 2003a. The death of honeybees and enviromental pollution by pesticides: the honeybees as biological indicators. *Bulletin of Insectology* 56, 147-52.
- Potts, S.; Biesmeijer, J.; Kremen, C.; Neumann, P.; Schweiger, O.; Kunin, W.. 2010. Review. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25, 345-353.
- Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994 de fecha 05/07/1994. 2008. 3ª Edición. Ed. IM.P.O., Montevideo, Uruguay.
- Rodríguez, A.; Jacobo, E.. 2010. Glyphosate effects on floristic composition and species diversity in the Flooding Pampa grassland (Argentina). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 138, 222-231.
- Rodríguez, J.; Iglesias, R.; Peña, R.; Barciela, J.; Garcia, S.; Herrero, C.. 2006. Preliminary chemometric study on the use of honey as an environmental marker in Galicia (Northwestern Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7206-7212.
- Rodríguez-Otero, J.; Paseiro, P.; Simal, J.; Cepeda, A.. 1994. Mineral content of the honey produced in Galicia (North-west Spain). *Food Chemistry* 49, 169-171.

- Rortais, A.; Arnold, G.; Halm, M.; Touffet-Briens, F.. 2005. Modes of honeybee exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36, 71-83.
- Sandermann, H.. 2006. Plant biotechnology: ecological case studies on herbicide resistance. *Trends in Plant Science* 11 (7), 324-328.
- Seeley, T. D.. 1995. *The wisdom of the hive*. Ed. Harvard University Press, Cambridge.
- Sejenovich, H.; Panario, D. 1998. *Hacia otro desarrollo: Una perspectiva ambiental*. Editorial Nordan, 172 págs.
- Sheppard, W.S.; Rinderer, T.E.; Garnery, L.; Shimanuki, H.. 1999. Analysis of Africanized honey bee Mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. *Genetics and Molecular Biology* 22 (1), 73-75.
- Snedecor, G.; Cochran, W.. 1980. *Métodos Estadísticos*. 2<sup>da</sup> ed.. Editorial Continental S. A., México.
- Sodré, G.; Marchini, L.; De Camargo Carmello Moreti, A.; Pozar, I.; Lopes, C.. 2007. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Ciência Rural* 37 (4), 1139-1144.
- Sokal, R.; Rohlf, F.. 1995. *Biometry*. 3 rd ed. W. H. Freeman y Co., New York.
- Soria, A.; González, M.; De Lorenzo, C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J.. 2005. Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by SPME and GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 817-824.
- Suchail, S.V.; Guez, D.; Belzunces, L.P.. 2000. Characteristics of Imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (7), 1901-1905.
- Tasei, J.N.; Pham-Delegue, M-H.; Belzunces, L.. 2003. Registration of systemic insecticides and European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) guidelines. *Bulletin of Insectology* 56, 189-191.

- Terrab, A.; Recamales, A.; Hernanz, D.; Heredia, F.. 2004. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry* 88, 537-542.
- Thompson, H.; Wilkins, S.. 2003. Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bulletin of Insectology* 56, 131-134.
- Tinker, B.. 1997. The environmental implications of intensified land use in developing countries. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 352, 1023-1033.
- Tornier, I.; Kling, A.; Schur, A.. 2003. Honey bee testing in Southern Europe: from the laboratory to the relevant crop in the field. *Bulletin of Insectology* 56, 185-187.
- Tremolada, P.; Mazzoleni, M.; Saliu, F.; Colombo, M.; Vighi, M.. 2010. Field trial for evaluating the effects on honeybees of corn sown using Cruiser ® and Celest xl® treated seeds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 85, 229-234.
- US EPA. 1996. Honey bee acute contact toxicity test (OPPTS 850, 3020). Ecological effects test guidelines. EPA 712-C-96-147. Washington DC, USA.
- Van der Steen, J.; Dinter, A.. 2007. A monitoring study to assess the acute mortality effects of indoxacarb on honey bees (*Apis mellifera* L.) in flowering apple orchards. *Pest Management Science* 63, 1095-1099.
- Van Engelsdorp, D.; Meixner, M.. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S80-S95.
- Visscher, K.. 1983. The honey bee way of death: necrophoric behaviour in *Apis mellifera* colonies. *Animal Behaviour* 31, 1070-1076.
- Warrington, S.. 1987. Relationship between SO<sub>2</sub> dose and growth of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, on peas. *Environmental Pollution* 43, 155-162.
- Welke, J.; Reginatto, S.; Ferreira, D.; Vicenzi, R.; Soares, J.. 2008. Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural* 38 (6), 1737-1741.

- Williams, N.; Crone, E.; Roulston, T.; Minckley, R.; Packer, L.; Potts, S.. 2010. Ecological and life-history traits predict bee species responses to environmental disturbances. *Biological Conservation* 143, 2280-2291.
- Winston, M.. 1987. *The biology of the honey bee*. Ed. Harvard University Press, Cambridge.
- Winston, M.; Dropkin, J.; Taylor, O.. 1981. Demography and life history characteristics of two honey bee races (*Apis mellifera*). *Oecologia* 48, 407-413.
- Winston, M.; Fergusson, L.. 1985. The effect of worker loss on temporal caste structure in colonies of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Canadian Journal of Zoology* 63, 777-780.
- Wu, J.; Anelli, C.; Sheppard, W.. 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE* 6, e14720.
- Xiaobo, M; Rencai, H.. 1996. Effect of air pollutant SO<sub>2</sub> on the lifespan and mortality of honeybee. *Journal of Fujian Agricultural University* 25 (4), 482-484.
- Yang, E.; Chuang, Y.; Chen, Y.; Chang, L.. 2008. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 101(6), 1743-1748.
- Yilmaz, K.; Inac, S.; Dikici, H.; Reyhanli, A.. 2004. The effects of a coal power plant on the environment and wildlife in southeastern Turkey. *Journal of Environmental Biology* 25, 423-429.
- Zhong, H.; Latham, M.; Hester, P.; Frommer, R.; Brock, C.. 2003. Impact of Naled on honey bee *Apis mellifera* L. survival and productivity: aerial ULV application using a flat-fan nozzle system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 216-220.
- Zhou, T.; Zhou, W.; Wang, Q.; Dai, P-L.; Liu, F.; Zhang, Y-L.; Sun, J-H.. 2011. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100, 35-40.

# ANEXOS

Tabla 1. Ensayo N° 1: Número de abejas muertas marcadas colectadas por cada tipo de trampa a diferentes intervalos de tiempo.

TIPO DE TRAMPA	TIEMPO (horas)															
	0,25	0,5	0,75	1	2	4	6	8	10	24	48	72	96	120	144	168
De Barrera	31	24	12	8	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
De Barrera	18	21	22	18	21	11	10	10	8	0	0	0	0	0	0	0
De Barrera	34	36	36	36	30	31	19	17	15	13	12	11	8	6	6	6
De Barrera	41	24	27	32	29	31	31	20	5	5	5	5	5	1	0	0
De Barrera	16	12	8	7	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Underbasket	26	34	34	34	33	27	23	20	18	15	6	1	0	0	0	0
Underbasket	38	39	38	37	38	37	27	23	5	0	0	0	0	0	0	0
Underbasket	31	33	33	33	31	32	27	31	31	31	27	24	18	18	20	20
Underbasket	39	36	34	33	33	23	16	12	7	3	0	0	0	0	0	0
Underbasket	27	28	26	26	31	27	27	27	25	25	27	9	12	10	10	10
INIA_LE	26	26	20	18	13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INIA_LE	19	20	20	15	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INIA_LE	21	22	22	21	20	18	17	15	14	14	13	8	1	1	1	0
INIA_LE	31	30	32	32	28	17	8	5	3	0	0	0	0	0	0	0
INIA_LE	12	13	13	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	30	33	31	27	20	14	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Control	12	12	8	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	19	16	17	9	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	10	6	5	5	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	18	11	15	14	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 2. Ensayo N° 2: Número de abejas muertas marcadas colectadas por cada tipo de trampa a diferentes intervalos de tiempo.

TIPO DE TRAMPA	TIEMPO (horas)															
	0,25	0,5	0,75	1	2	4	6	8	10	24	48	72	96	120	144	168
INIA_LE	23	23	23	23	23	20	20	20	19	22	12	0	0	0	0	0
INIA_LE	28	35	31	29	28	13	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
INIA_LE	10	16	18	19	15	15	15	15	14	11	1	0	0	0	0	0
INIA_LE	27	35	35	32	19	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INIA_LE	9	9	7	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
De Barrera	25	26	27	27	28	27	26	20	17	16	13	6	0	0	0	0
De Barrera	16	20	28	28	26	32	23	20	15	14	7	1	0	0	0	0
De Barrera	31	34	34	34	34	30	29	29	29	19	10	1	0	0	0	0
De Barrera	23	31	29	30	29	29	29	29	27	29	29	13	0	0	0	0
De Barrera	20	19	21	23	16	14	14	9	5	13	12	11	3	3	1	0
Control	13	8	8	8	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	20	18	17	18	19	18	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	5	13	15	18	30	37	18	16	14	1	0	0	0	0	0	0
Control	23	27	30	27	24	26	9	8	4	0	0	0	0	0	0	0
Control	26	40	45	40	33	24	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Underbasket	43	46	44	44	44	44	39	33	30	21	8	0	0	0	0	0
Underbasket	47	47	46	45	46	39	28	22	13	10	0	0	0	0	0	0
Underbasket	33	34	36	36	36	36	36	35	34	32	10	2	2	2	2	2
Underbasket	31	38	39	38	37	36	31	23	20	15	0	0	0	0	0	0
Underbasket	18	29	35	41	41	42	38	35	31	31	0	0	0	0	0	0

Tabla 3 .Tamaño poblacional de las colonias pertenecientes a la red de monitoreo en Fray Bentos, Río Negro.

Ubicación	Población	
	inicio	final
<b>FB2</b>		
FB2_1	6	7
FB2_2	6	6
FB2_3	8	7
FB2_4	7	7
FB2_5	10	10
<b>FB4</b>		
FB4_1	4	4
FB4_2	10	6
FB4_3	5	6
FB4_4	6	6
FB4_5	10	8
<b>FB8a</b>		
FB8a_1	7	6
FB8a_2	7	5
FB8a_3	6	5
FB8a_4	6	5
FB8a_5	7	4
<b>FB8b</b>		
FB8b_1	10	8
FB8b_2	1	0
FB8b_3	8	8
FB8b_4	5	3
FB8b_5	5	4
<b>FB16</b>		
FB16_1	6	7
FB16_2	3	4
FB16_3	6	7
FB16_4	3	4
FB16_5	6	7

Tabla 4 .Tamaño poblacional de las colonias pertenecientes a la red de monitoreo en Juan Lacaze, Colonia.

<b>Ubicación</b>	<b>Población</b>	
	inicio	final
<b>JL2</b>		
JL2_1	10	8
JL2_2	10	6
JL2_3	8	8
JL2_4	7	7
JL2_5	7	7
<b>JL4</b>		
JL4_1	10	8
JL4_2	7	5
JL4_3	8	6
JL4_4	10	8
JL4_5	10	9
<b>JL8a</b>		
JL8a_1	6	4
JL8a_2	8	6
JL8a_3	7	6
JL8a_4	10	6
JL8a_5	10	5
<b>JL8b</b>		
JL8b_1	10	5
JL8b_2	6	7
JL8b_3	7	8
JL8b_4	8	8
JL8b_5	8	7
<b>JL8c</b>		
JL8c_1	10	3
JL8c_2	5	3
JL8c_3	4	3
JL8c_4	9	2
JL8c_5	9	8

