

ERWINIA AMYLOVORA E API: SOPRAVVIVENZA NELL'ALVEARE E DISSEMINAZIONE

A.G. Sabatini, E. Carpana, M. Alexandrova

Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna

C. Porrini, C. Bazzi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

Introduzione

Il colpo di fuoco batterico, causato dal batterio Gram-negativo *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, è una delle più gravi malattie di pero, melo e di numerose altre rosacee coltivate e spontanee (Vanneste, 2000). Il patogeno può essere disseminato a breve e a lunga distanza da agenti biotici (attrezzi, uccelli, insetti, operatori) e abiotici (pioggia, vento, aerosol) (Bazzi *et al.*, 1994). Nell'ospite, i fiori rappresentano uno dei più importanti siti di penetrazione del batterio: pertanto, le api, in considerazione della loro attività di bottinamento sui medesimi, sono state oggetto di studi per valutarne l'effettivo ruolo quali mezzi di disseminazione del batterio stesso (Larue *et al.*, 1984; De Wael *et al.*, 1990), senza tuttavia giungere a risultati conclusivi.

In Italia, i primi casi della batteriosi furono scoperti nel 1990 (Cariddi, 1990), mentre in Emilia-Romagna, dove sono concentrate estese coltivazioni di pero,

i primi focolai sono stati scoperti a partire dal 1994 (Calzolari *et al.*, 1999), raggiungendo, nel 1997, il livello di epidemia. Come conseguenza di tale situazione, è stato emanato un Decreto Ministeriale recante misure per la lotta obbligatoria contro il colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*) nel territorio della repubblica (D.M. 27 marzo 1996, in Gazz. Uff. n. 81 del 5 aprile 1996, sostituito dal D.M. 10 settembre 1999, n.356), comprendente limitazioni alla movimentazione degli alveari con conseguenze molto gravi sull'attività di nomadismo e di impollinazione guidata.

Allo scopo di definire i rapporti esistenti tra api ed *E. amylovora*, sono state intraprese diverse sperimentazioni con i seguenti obiettivi:

- determinare la longevità del batterio nelle varie matrici apistiche mediante studi in laboratorio e in semi-campo (gabbie);
- migliorare le conoscenze sulla capacità dell'ape di acquisire il patogeno da fiori infetti e disse-

minarlo a fiori sani attraverso sperimentazioni in serra;

- valutare l'applicabilità di un metodo di "risanamento" di alveari contaminati da *E. amylovora*, basato sulla quarantena e sul trattamento con acido ossalico, al fine di consentirne la movimentazione in aree esenti da colpo di fuoco batterico.

Materiali e metodi

Sopravvivenza di *E. amylovora* nell'alveare

Lo scopo di questa ricerca, svolta nel periodo 1998-2000, è stato la definizione del periodo di sopravvivenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino delle api e nelle varie matrici apistiche (miele, cera, polline e propoli), sia in laboratorio, a 4°C, 15°C, 28°C e 35°C, che in alveari mantenuti all'aperto in primavera e in autunno.

Per gli esperimenti di laboratorio, un ceppo locale virulento di *E. amylovora* (OMP-BO 1077.7/94) è stato marcato per antibiotico-resistenza a rifampi-

cina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Per i saggi di laboratorio i campioni di miele, cera, polline, propoli e api sono stati contaminati con la sospensione del mutante Rif^r (10^8UFC ml^{-1}) secondo le seguenti modalità: un volume di 100 ml di sospensione Rif^r è stato aggiunto a 1000 g di miele e mescolato accuratamente; campioni di cera (500 g), polline (100 g), propoli (20 g) e api (800 individui) sono stati uniformemente contaminati con la sospensione del mutante; per ottenere la contaminazione interna delle api, 10 μl della sospensione Rif^r sono stati miscelati con un uguale volume di una soluzione zuccherina al 50% e ogni ape è stata nutrita con 20 μl della miscela. Dopo la contaminazione, i campioni sono stati conservati a 4, 15, 28 e 35°C.

Per le prove di semi-campo, condotte nell'autunno 1998 e 1999 e nella primavera 1999 e 2000, due alveari, chiusi in una ampia gabbia di rete a maglie strette, sono stati contaminati nebulizzando all'interno, direttamente sui favi e sulle api, 150 ml per alveare della sospensione del mutante Rif^r alla concentrazione di circa 10^8UFC ml^{-1} . La temperatura e l'umidità relativa negli alveari sono state misurate e registrate per mezzo di sonde Tinytalk® II Data Loggers insieme con OTLM Software. La longevità di *E. amylovora* nelle varie matrici apistiche e nelle api è stata determinata mediante reisolamenti quantitativi su substrato semi-selettivo NSA addizionato di 100mg ml^{-1} di rifampici-

na. In seguito, colonie rappresentative di *E. amylovora* sono state sottoposte ad analisi Bio-PCR (Schaad *et al.*, 1995) con gli inneschi A e B di Bereswill *et al.* (1992).

Disseminazione di *E. amylovora*

Nella primavera del 2000, del 2001 e del 2002 sono stati condotti esperimenti in serra per valutare il ruolo dell'ape nella disseminazione di *E. amylovora* da:

a) fiori contaminati ad alveari sani;

b) alveari contaminati a fiori sani. Gli esperimenti sono stati condotti in una serra condizionata, suddivisa in tre compartimenti chiusi e, per ognuno di essi, sono stati usati 15 astoni di pero (5 per settore) cv. Packams's Triumph in piena fioritura. Durante tutta la sperimentazione sono stati registrati i valori di temperatura e di umidità relativa all'interno della serra. Per la contaminazione dei corimbi fiorali e degli alveari sono state usate sospensioni batteriche di giovani cellule di *E. amylovora* alla concentrazione rispettivamente di 10^6UFC ml^{-1} e 10^8UFC ml^{-1} .

a) *Disseminazione da fiori contaminati ad alveari sani* - Nella primavera 2000, gli astoni di pero posti nel primo compartimento sono stati contaminati con la sospensione di *E. amylovora*; dopo 72 ore, è stato introdotto nello stesso settore un alveare esente da *E. amylovora* e lasciato a contatto con i peri inoculati per 24 ore. In seguito,

è stato spostato nel secondo compartimento dove è rimasto per altre 24 ore a contatto con 5 astoni di pero sani. Trascorse ulteriori 24 ore l'alveare è stato sistemato nel terzo compartimento con altre 5 peri sani.

b) *Disseminazione da alveari contaminati a fiori sani* - Nella primavera 2001, un alveare è stato contaminato nebulizzando direttamente sui favi e sulle api 150 ml della sospensione di *E. amylovora*. Subito dopo, è stato posto nel primo compartimento della serra insieme a 5 astoni di pero sani in piena fioritura precedentemente collocati. Dopo 24 ore, lo stesso alveare è stato spostato nel secondo compartimento assieme ad altri 5 astoni di pero sani; infine, dopo 24 ore, è stato spostato nel terzo compartimento per un ulteriore giorno. Lo stesso esperimento è stato eseguito contemporaneamente e con le stesse modalità usando un alveare in cui le api sono state alimentate con una sospensione di *E. amylovora* in soluzione zuccherina al 25%.

Ogni 24 ore, cioè prima dello spostamento dell'alveare da un compartimento all'altro, è stato fatto un campionamento di fiori (50 per albero) e di api (100 api-corpo e 100 api-intestino). L'esperimento è stato ripetuto nella primavera 2002, raccogliendo dagli alveari, oltre alle api, anche campioni di miele, cera e polline.

Il rilevamento di *E. amylovora* è stato effettuato mediante reisolamento quantitativo su terreno selettivo CCT e mediante Bio-PCR.

Procedure di risanamento

Protocollo di quarantena

Si è cercato di mettere a punto un metodo per il “risanamento” di alveari situati in aree dove la malattia è endemica ed interessati a programmi di nomadismo in zone indenni nel periodo considerato a rischio. Sulla base dei dati sperimentali relativi alla sopravvivenza e degli esiti di un ampio monitoraggio del territorio regionale (Ghini *et al.*, 2002), al fine di ottenere l’autorizzazione da parte del Servizio Fitosanitario Regionale alla movimentazione degli alveari, si è convenuto di procedere nel seguente modo:

- campionare un alveare su tre, presenti nell’apiario interessato allo spostamento, prelevando da ciascuno (dall’entrata dell’arnia oppure dalla regione periferica del nido) un minimo di venti api bottinatrici;
- introdurre le api in contenitori idonei (scatolette di cartone o gabbiette da spedizione) a garantirne la sopravvivenza fino alla consegna al laboratorio, consegna che comunque deve avvenire entro quattro ore;
- confinare in ambiente chiuso dopo il prelievo tutti gli alveari destinati allo spostamento che potrà avvenire soltanto quando sarà stata accertata, tramite analisi batteriologiche, l’assenza di cellule vitali di *E. amylovora* nei campioni (non oltre le 48 ore).

Trattamento degli alveari con acido ossalico

L’acido ossalico viene largamen-

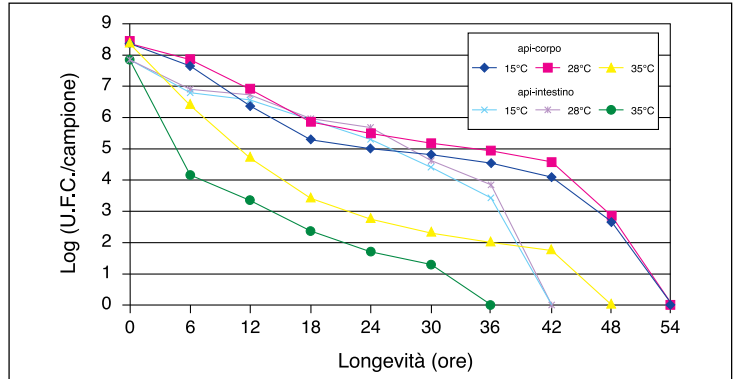


Figura 1 - Longevità di *E. amylovora* sul corpo e nell’intestino dell’ape a diverse temperature

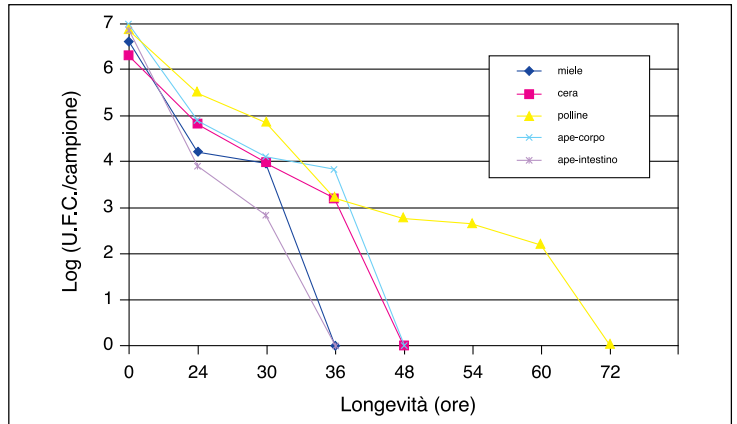


Figura 2 - Longevità di *E. amylovora* in alveari mantenuti all’aperto nella primavera del 1999

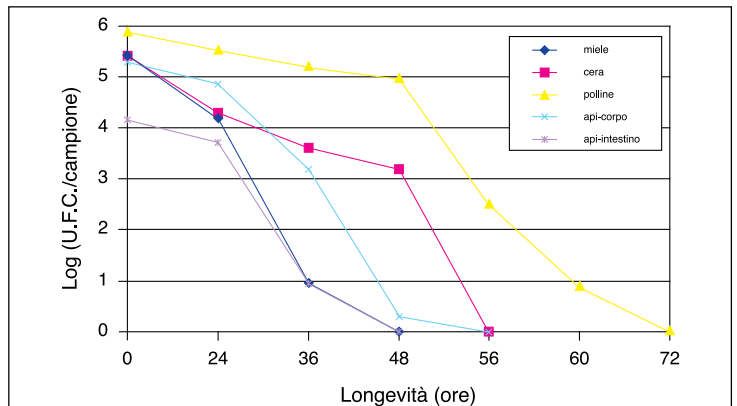


Figura 3 - Longevità di *E. amylovora* in alveari mantenuti all’aperto, nell’autunno del 1999

Tabella 1 - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape (UFC/campione) dopo aver visitato fiori di pero contaminati artificialmente con il batterio (esperimento 2000)

Comparto	Ore dal contatto	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo	Api-intestino
1	24	5/5 (non determinato)	$8,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
2	48	5/3 (3×10^5)	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0

Tabella 2 - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante nebulizzazione a fiori di pero sani (esperimento 2001)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi contaminati (UFC/camp.)	Api-corpo $T_0 = 3,7 \times 10^7$	Api-intestino $T_0 = 0$
1	24	5/3 ($4,6 \times 10^3$)	$2,5 \times 10^3$	0
2	48	5/0 (0)	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0

Tabella 3 - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante alimentazione a fiori di pero sani (esperimento 2001)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi contaminati (UFC/camp.)	Api-corpo $T_0 = 7 \times 10^3$	Api-intestino $T_0 = 2,5 \times 10^6$
1	24	5/3 (1×10^5)	$1,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$
2	48	5/3 (2×10^3)	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0

te utilizzato in apicoltura come principio attivo di origine naturale efficace nel trattamento profilattico degli alveari contro la varroasi. Il prodotto viene somministrato mediante uno o più trattamenti nell'arco della medesima stagione. Da qui l'interesse a verificarne l'efficacia battericida nei confronti di cellule di *E. amylovora* eventualmente contaminanti gli alveari.

Nell'autunno 2002, tre alveari sono stati contaminati con la sospensione di *E. amylovora*, alla concentrazione di 10^6 UFC ml⁻¹, quindi dopo 30 min sono stati trattati con soluzioni di acido ossalico,

secondo il seguente schema:

- *alveare 1*: somministrazione mediante nebulizzatore di 50 ml di una soluzione al 3% di acido ossalico;
- *alveare 2*: somministrazione mediante gocciolamento di 50 ml di una soluzione zuccherina (1:1) al 4% di acido ossalico;
- *alveare 3*: controllo non trattato.

A diversi intervalli di tempo è stata rilevato il livello di contaminazione di *E. amylovora* in campioni di api mediante reisolamento diretto su substrato semi-selettivo CCT. Per ogni prelievo, sono stati analizzati 3

campioni di api per alveare.

Risultati e discussione

Sopravvivenza di *E. amylovora* nell'alveare

La sopravvivenza dei batteri sul corpo delle api è stata di 48 ore a 15 e 28°C, mentre a 35°C sono stati rilevati batteri vitali fino a 42 ore dopo la contaminazione. Nell'intestino delle api, i batteri sono sopravvissuti per un massimo di 36 ore a 15 e 28 °C, mentre a 35°C sono stati reisolati batteri vitali fino a 30 ore dopo la contaminazione (fig. 1 - pag. 63).

Negli alveari tenuti in campo du-

Tabella 4 - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape e nelle matrici apistiche (UFC/campione) dopo aver visitato fiori di pero contaminati artificialmente con il batterio (esperimento 2002)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo	Api-intestino	Miele	Cera	Polline
1	24	5/5 (5,3x10 ¹⁰)	3x10 ⁴	4x10 ⁵	0	5x10 ³	3x10 ³
2	48	5/4 (3,4x10 ⁹)	0	0	0	3x10	8x10 ²
3	72	5/0 (0)	0	0	0	0	0

Tabella 5 - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape e nelle matrici apistiche (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante nebulizzazione a fiori di pero sani (esperimento 2002)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo T ₀ =5,7x10 ⁶	Api-intestino T ₀ =2,4x10 ³	Miele T ₀ =3x10 ⁴	Cera T ₀ =5x10 ⁶	Polline T ₀ =4x10 ⁵
1	24	5/5 (5x10 ⁷)	3,2x10 ⁵	5,3x10	2x10 ³	4x10 ⁴	4x10 ⁴
2	48	5/4 (2,8x10 ³)	6x10 ²	0	0	0	3,2x10 ²
3	72	5/0 (0)	0	0	0	0	0

Tabella 6 - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape e nelle matrici apistiche (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante alimentazione a fiori di pero sani (esperimento 2002)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo T ₀ =3x10 ³	Api-intestino T ₀ =5,5x10 ⁶	Miele T ₀ =0	Cera T ₀ =6x10	Polline T ₀ =1x10 ²
1	24	5/3 (2x10 ⁴)	2,5x10 ³	2,4x10 ³	3,3x10	1,7x10 ²	4,3x10
2	48	5/0 (0)	0	0	0	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0	0	0	0

rante la primavera, la sopravvivenza dei batteri è stata: 30 ore nel miele e nell'intestino dell'ape, 36 ore nella cera e sul corpo dell'ape, 60 ore nel polline (fig. 2 - pag. 63); durante l'autunno, la sopravvivenza di *E. amylovora* è stata: nel miele, 36 ore per la zona periferica del favo e 36-48 ore per l'area della covata; nella cera 48 ore; nel polline 60 ore; sul corpo e nell'intestino dell'ape rispettivamente 48 e 36 ore (fig. 3 - pag. 63). In altre sperimentazioni, condotte nella primavera 2000, è stato osservato che nel polline la sopravvivenza di *E. amylovora* può protrarsi fino a

72 ore, mentre per le altre matrici i dati ottenuti nel 1999 sono stati tutti confermati.

I risultati ottenuti dimostrano che sul corpo delle api, eventuali agenti di disseminazione di *E. amylovora* in campo, la sopravvivenza del batterio non supera le 48 ore.

Disseminazione di *E. amylovora*

Dopo aver visitato i fiori di pero contaminati con *E. amylovora*, le api sono risultate contaminate e in grado di trasportare il patogeno a piante sane in piena fioritura. Tuttavia a 48 ore dal pri-

mo contatto delle api con i fiori infetti non sono stati trovati batteri vitali sul corpo né nell'intestino delle api (tabb. 1 e 4), mentre questi erano ancora presenti nella cera e nel polline (tab. 4). Le api di alveari contaminati sperimentalmente hanno trasportato cellule di *E. amylovora* a fiori di pero sani per meno di 48 ore dal momento della contaminazione iniziale. Non sono stati infatti reisolati batteri vitali dalla superficie corporea e dall'intestino delle api, oltre le 24 ore dalla contaminazione degli alveari per nebulizzazione e per alimentazione (tabb. 2, 3, 5, e 6). Nel 2002,

Tabella 7 - Risultati ottenuti nel corso dei controlli effettuati

Anno	N. Alveari controllati	N. alveari positivi alla presenza di <i>E. amylovora</i>
1999	300	0
2000	499	0
2001	691	0
2002	550	0

Sopravvivenza di *E. amylovora* in alveari trattati con acido ossalico

La longevità di *E. amylovora* si riduce significativamente in conseguenza della forte acidificazione dell'ambiente interno all'alveare provocata dal trattamento

solo in seguito alla contaminazione tramite nebulizzazione, batteri vitali sono stati trovati sul corpo delle api anche 48 ore dopo la contaminazione (tab. 5). Inoltre i batteri sono sopravvissuti solo per 24 ore dalla contaminazione iniziale in tutte le matrici apistiche nell'esperimento per ingestione (tab. 6), mentre solo nel polline sono rimasti vitali anche a 48 ore dalla contaminazione per nebulizzazione (tab. 5).

Procedure di risanamento

Quarantena

Il protocollo di risanamento messo a punto, sebbene potenzialmente molto efficace in quanto basato su due livelli di sicurezza, (analisi di laboratorio e successivo periodo di quarantena di 48 ore), è risultato abbastanza complicato nella sua attuazione in particolare per quanto riguarda la costrizione delle api e l'individuazione di ambienti adatti al loro temporaneo collocamento. Tuttavia i confortanti dati ottenuti (tab. 7) e la fattiva collaborazione degli apicoltori è di stimolo per migliorare in futuro le procedure di messa in quarantena degli alveari.

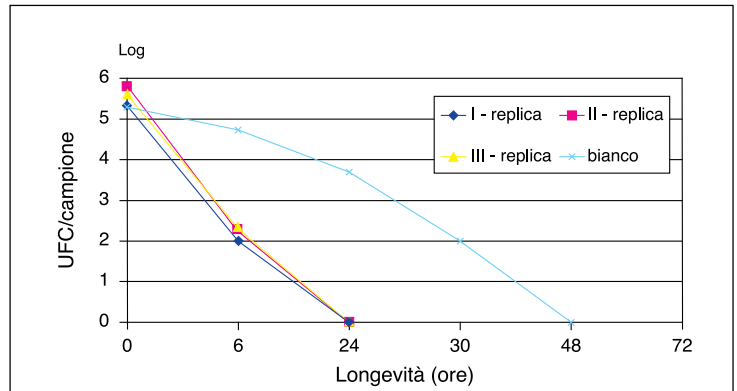


Figura 4 - Longevità di *E. amylovora* in alveare sperimentalmente contaminato e successivamente trattato con acido ossalico irrorato sui favi

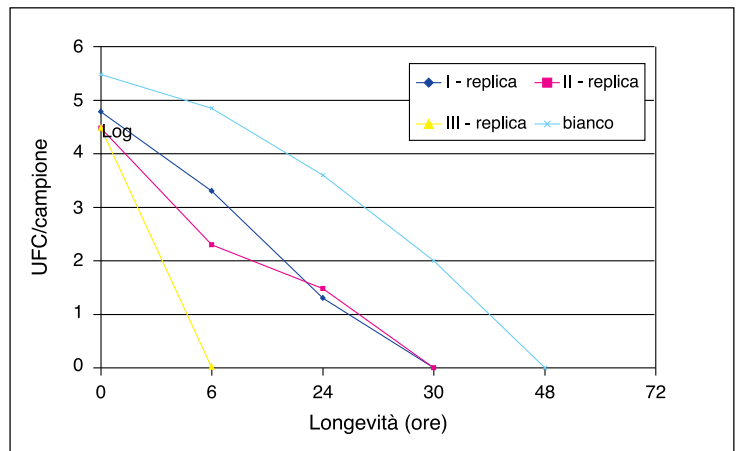


Figura 5 - Longevità di *E. amylovora* in alveare sperimentalmente contaminato e successivamente trattato con acido ossalico somministrato per gocciolamento

con acido ossalico, come chiaramente evidenziato dai grafici delle *figure 4 e 5*. La somministrazione per nebulizzazione si è dimostrata la più efficace (longevità inferiore a 24 ore), ma il numero limitato di dati sperimentali non ci consente di trar-

re conclusioni definitive in tal senso.

In ogni caso la tecnica del gocciolamento è quella comunemente adottata dagli apicoltori. Questi risultati preliminari suggeriscono la possibilità di usare l'acido ossalico come meto-

do chimico di risanamento degli alveari da *E. amylovora* che, sebbene di efficacia parziale, consentirebbe di abbreviare sensibilmente il periodo di quarantena previsto dalle procedure precedentemente descritte.

T ***Erwinia amylovora* survival in honeybee and its dissemination**

Studies on the role of honeybees in the dissemination of the bacterium *Erwinia amylovora* and as bioindicators of its presence in the environment.

C
A
R
T
S
B
A

Fire blight, caused by the Gram-negative bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* is one of most serious diseases on apple, pear and many other species of the *Rosaceae* family. As a consequence of disease spreading in Italy, and particularly, in the Emilia-Romagna region, different studies to evaluate the role of honeybee in the dissemination of *E. amylovora* were undertaken.

E. amylovora monitoring programs based on visual inspections. Second, *E. amylovora* longevity in honey, beeswax, pollen and propolis, as well as on honeybee bodies and in honeybee intestines, was studied both in laboratory, at different temperature regimes (4, 15, 28 e 35°C), and under outdoor conditions, in spring and autumn. It emerges that in the laboratory the bacterium longevity is inversely correlated with the storing temperature and under outdoor conditions *E. amylovora* is more persistent in autumn than in spring, in all tested matrixes. No bacteria were found in propolis. Third, the role of honeybees in the dispersal of *E. amylovora* from infected to healthy pear flowers and from contaminated beehives to healthy pear flowers was investigated. It was demonstrated that honeybees, having visited infected pear flowers, can transfer the bacterium on healthy ones within 48 hours. Finally, operating procedures and tests with oxalic acid allowing rational beehives moving from infected to disease-free areas were set up.

Bibliografia

- Bazzi C., Tagliati M.E., Spina F., Bendini L., 1994. *Disseminazione di Erwinia amylovora a breve ed a grande distanza. Atti giornate di studio sul colpo di fuoco da Erwinia amylovora*. U. Mazzucchi (ed.), Tecno-print s.n.c., Bologna, 29-40.
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K., 1992. *Sensitive and species-specific detection of Erwinia amylovora by polymerase chain reaction analysis*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3522-3526.
- Calzolari A., Finelli F., Ponti I., Mazzoli G.L., 1999. *L'esperienza dell'Emilia Romagna nella lotta al colpo di fuoco*. L'Inf.tore Agr. 14, 65-70.
- Cariddi C., 1990. *Colpo di fuoco sul pero*. Terra e Vita 34, 67-69.
- De Wael L., De Greef M., Van Laere O., 1990. *The honeybee as a possible vector of Erwinia amylovora (Burr.) Winslow et al.* Acta Hort. 273, 107-113.
- Ghini S., Girotti S., Calzolari A., Sabatini A.G., Alessandrini A., Zerl L., Porrini C., 2002. *Use of honeybees (Apis mellifera L.) as indicators of the presen-*

ce pf the phytopathogenic bacteria Erwinia amylovora. Ins. Soc. Life 4, 69-77.

Larue P., Desbons C., Lecomte P., 1984. *Activity of pollinating insects of fire blight host plants.* Acta Hort. 151, 137-143.

Merighi M., Malaguti S., Bazzi C., Sandrini A., Landini S., Ghini S., Girotti S., 1999. *Specific detection of Erwinia amylovora by immunoenzymatic determi-*

nation of PCR products. Acta Hort. 489, 39-42.

Merighi M., Sandrini S., Landini S., Ghini S., Girotti S., Malaguti S., Bazzi C., 2000. *Chemiluminescent and colorimetric detection of Erwinia amylovora by immunoenzymatic determination of PCR amplicons (PCR-ELISA) from plasmid pEA29.* Plant Disease 84, 49-54.

Schaad N.W., Cheong S.S., Ta-

maki S., Hatziloukas E., Panopoulos N.J., 1995. *A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in been see extracts.* Phytopathology 85, 243-248.

Vanneste J., 2000. *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora.* Ed. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, UK, 370.pp.