

Novità dalla ricerca

di Enrico Ercole e Gruppo Biomonitoraggio Aspromiele



Per fare tutto ci vuole un fiore

1° parte

Il ruolo dei microrganismi nell'impollinazione.

Un inedito sguardo sull'interazione tra fiori e api in contesti agricoli monitorati

Nel 2020 Aspromiele, il Settore Fitosanitario della Regione Piemonte e Agrion - Fondazione per la ricerca l'innovazione e lo sviluppo tecnologico dell'agricoltura piemontese, hanno dato il via a un progetto triennale di monitoraggio ambientale con le api, effettuato in 4 dei siti sperimentali gestiti dalla Fondazione Agrion sul territorio piemontese. Obiettivo del progetto era studiare l'impatto delle pratiche agricole sugli alveari, al fine di rintracciare spunti pratici e di ricerca per migliorare gli approcci di tutela delle api e degli impollinatori nell'agro-ecosistema. **Bio-agri-apis**, questo il nome del progetto, è stato quindi l'occasione per focalizzare l'attenzione di tecnici della Regione, agronomi, agricoltori e apicoltori sul complesso rapporto tra api e agricoltura; un'occasione pienamente sfruttata da tutte le parti in quanto, proprio sulle basi del progetto è stato costituito, a fine 2023, il **Tavolo permanente per la tutela della biodiversità e dei pronubi in Piemonte**.

Nel corso dei 3 anni di attività sono stati raccolti dati relativi alla contaminazione da pesticidi, alla forza e alla produttività delle famiglie di api nei diversi contesti, all'impatto sugli alveari di una pratica agronomica "emergente" come la semina dei sovesci e all'**interazione microbiologica tra fiori e api, con un focus sperimentale sul miele**.

Sono proprio le indagini microbiologiche, oggetto di questo articolo, ad aver dato gli spunti più interessanti e innovativi, in quanto hanno permesso di far luce sui meccanismi associati al servizio ecosistemico dell'impollinazione in un modo completamente inedito. Il ruolo dei microrganismi nell'impollinazione è infatti strategico e fondamentale, non solo per le api ma anche per le piante, in modo mutualistico. Il microbiota fiorale è in sostanza il fulcro ecologico dei diversi cicli biologici, microbiologici ed ecosistematici dell'ambiente, come confermano gli studi scientifici che sempre di più sottolineano i forti legami microbici tra suolo, piante e impollinatori, legami che hanno forti ricadute sullo stesso servizio di impollinazione e sulla salute generale dell'ecosistema.

Provare a comprendere le dinamiche associate al microbiota fiorale durante il processo di impollinazione è quindi un passaggio essenziale per la comprensione dell'interazione tra piante e api, per valutare il rapporto tra agricoltura e apicoltura, e per avviare azioni efficaci per la tutela dei pronubi in contesti agricoli (e, perché no, anche in contesti naturali e semi-naturali).

Attraverso il campionamento e l'analisi molecolare del microbiota dei fiori, degli intestini delle api, del pan d'api e del miele (analisi semi-quantitativa dei funghi e dei batteri presenti sulle diverse matrici), effettuate durante i periodi più significativi delle stagioni 2021 e 2022, il progetto Bio-agri-apis ha permesso di scattare delle "istantanee microbiologiche" molto dettagliate, in grado di fornire dati utili per descrivere il network dei microrganismi coinvolti nel processo di impollinazione (Figura 1). Nonostante si tratti di un progetto pilota, i dati raccolti hanno già permesso di tracciare ed evidenziare

l'impronta microbiologica che caratterizza e accomuna fiori, api, pan d'api e miele nei diversi ambienti. Ma non solo, si è dimostrata essere anche una efficace e profonda analisi sullo stato di salute delle api e dello stesso ciclo ecologico legato all'impollinazione.

I dati in pillole

Senza addentrarsi nelle specifiche attività che i singoli microrganismi assolvono (sono state rinvenute circa 930 ipotetiche specie fungine e 430 batteriche), si è cercato di leggere i dati ottenuti in modo olistico, analizzando le reti microbiologiche di co-occorrenza (Figura 1) fra le diverse matrici analizzate, e decifrando la "firma microbiologica" (*microbial footprint*) che queste comunità microbiche apportano tramite i metadati associati, come ad esempio le categorie funzionali (core-microbiota, lieviti, patogeni, ecc...) o i semplici attributi, come la correlazione con l'agricoltura o le pressioni ambientali (Figure 2 e 3).

In altre parole, anche se con i dati a disposizione non è possibile dire in modo preciso **chi fa cosa e perché**, è comunque possibile dire **chi sono, da dove vengono e dove vanno**, analizzando la "mappa" del network microbiologico associabile all'interazione tra fiori e api.

In dettaglio, questo **network microbiologico dell'impollinazione ha messo in evidenza quanto siano strettamente correlate ed interconnesse fra di loro le comunità microbiche dei fiori e delle api**. Tale interconnessione è evidenziata

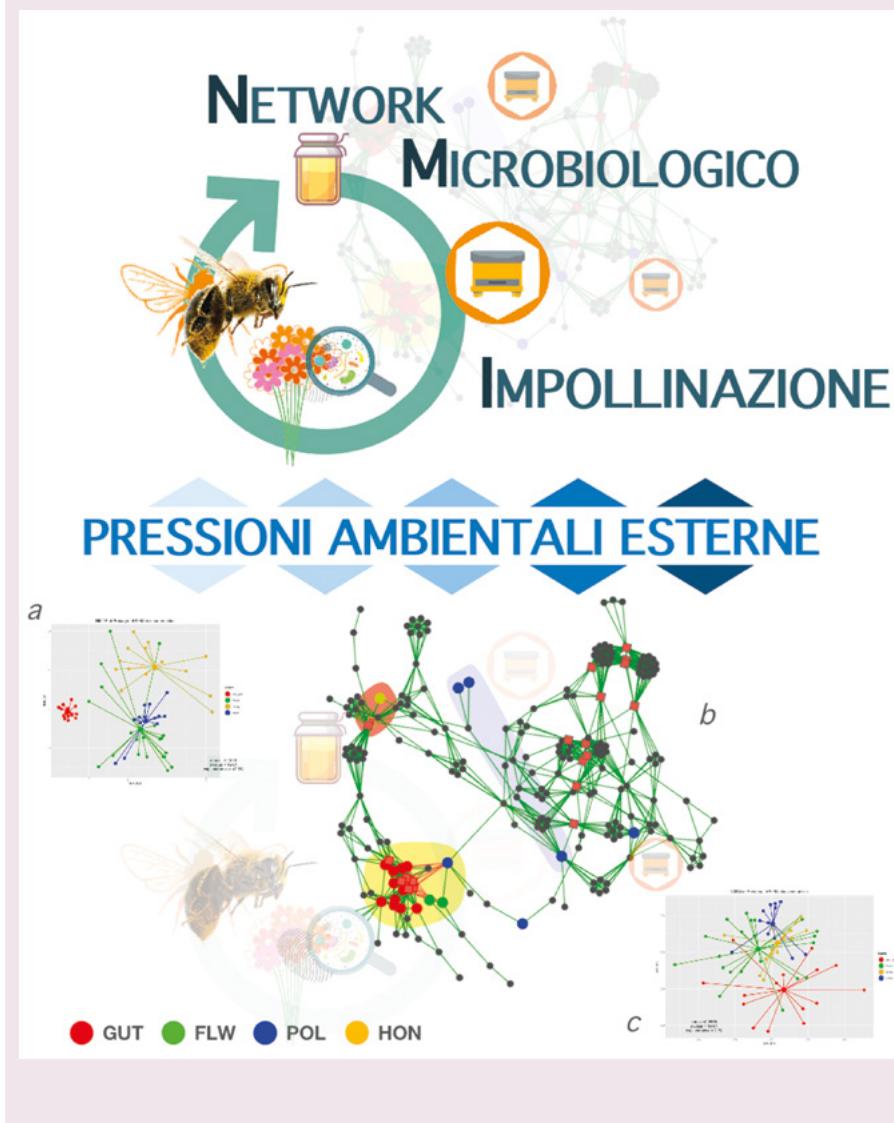


Figura 1
"Network Microbiologico dell'Impollinazione", rappresentato mediante il "co-occurrence network" ("b," parte sottostante della figura) dei dati metagenomici derivanti dalle analisi molecolari del microbiota (funghi e batteri) fiorale, degli intestini delle api, del polline e del miele. Il network mostra le interazioni microbiche all'interno dell'ecosistema.

Il co-occurrence network evidenzia le relazioni sinergiche (linee verdi) e antagonistiche (linee rosse) tra i diversi microrganismi presenti nelle diverse matrici analizzate, delineando le correlazioni che intercorrono fra di essi. Le specie microbiche indicative delle diverse matrici analizzate sono evidenziate nei quattro colori rosso (GUT, microbiota degli intestini delle api), verde (FLW, microbiota fiorale), blu (POL, microbiota del pan d'api) e giallo (HON, microbiota del miele). L'area gialla del grafico, è un fulcro di connessioni (hub) dei punti GUT, FWL e POL, che rappresenta la stretta interconnessione fra queste matrici, dall'ambiente esterno con i fiori, agli ambienti interni delle api e degli alveari stessi. Il microbiota del pan d'api, così come l'interazione dei microbioti dei fiori con gli intestini delle api, sono a loro volta interconnessi con il microbiota dei mieli, divenendo una vera e propria firma microbiologica. Nei riquadri a lato del network sono raffigurate le analisi di diversità microbiologica delle diverse matrici analizzate (β -div., NMDS), in modo singolo per i batteri ("a") e per i funghi ("c"). Nel caso dei batteri, le comunità microbiche degli intestini delle api sono molto omogenee e diverse dalle altre matrici, che sono a loro volta molto più simili e sovrapponibili. Nel caso dei funghi, le comunità microbiche sono più simili e sovrapponibili fra loro, molto probabilmente per il ruolo svolto dai lieviti

dall'hub nel network (Figura 1, area gialla) tra i batteri presenti sui fiori e negli intestini delle api. Si può notare come la semplice presenza di determinati batteri sui fiori può influire (positivamente e negativamente) sul microbiota intestinale specifico delle api (core microbiota), anche se quest'ultimo risulta meno soggetto a variazioni e molto diverso rispetto alle altre comunità batteriche rilevate (vedi riquadro "a" in Figura 1). In particolare il gruppo dei batteri simbionti delle api *Gilliamella*, *Snodgrasella* e *Frischella* rimane pressoché inalterato, nonostante sia soggetto a perturbazioni microbiologiche esterne temporanee, innescate dal flusso di microrganismi ambientali associabili a ogni singola fioritura.

I batteri simbionti rappresentano l'identità microbiologica delle api, ciò che le distingue e le caratterizza evolutivamente da ogni altro essere vivente, e non si trovano sui fiori, ma solo nell'alveare. Il microbiota fiorale, invece, è l'elemento che le api sfruttano per vivere in salute favorendo, tra le altre cose, la vitalità delle colonie batteriche dei simbionti.

Un'altro elemento importante che emerge dall'indagine è che in realtà le api, durante la fioritura, sfruttano il microbiota fiorale anche per "cucinare" il cibo che andrà ad alimentare la colonia del futuro: **anche il microbiota del pan d'api e del miele risultano infatti strettamente interconnessi fra loro, a chiudere**

il ciclo che dal fiore arriva alle bottinatrici che sfrutteranno la fioritura successiva.

Quella microbiologica è quindi una vera e propria firma o impronta digitale che l'ambiente lascia (in modo sia positivo sia negativo) su tutto ciò che partecipa al processo di impollinazione, e su tutto ciò che, in termini di produzioni agricole e apistiche, ne deriva. Tale firma ci autorizza a conferire al fiore il ruolo di vero protagonista, in qualità di **Hub Microbiologico**, ovvero di fonte di microrganismi fondamentali al sostentamento della vita delle api, alla produzione di miele, al processo di impollinazione e al servizio ecosistemico derivato.

Il fiore

Ogni fiore, come ogni altro organismo o meglio come ogni altro ecosistema, è abitato da microrganismi specifici (come ad esempio il lievito *Metschnikowia*) e da microrganismi ambientali (come ad esempio i patogeni vegetali delle colture). L'insieme di tutti i microrganismi presenti nel fiore è definito **microbiota fiorale**.

I dati raccolti mostrano come ogni specie botanica presa in esame abbia un microbiota fiorale caratteristico e ogni fiore, pur condividendo con i fiori della stessa specie un profilo microbiologico omogeneo, di derivazione biologica e genetica, abbia un proprio microbiota specifico, acquisito attraverso le interazioni con l'ambiente e con gli impollinatori.

Le analisi effettuate sul singolo fiore hanno poi restituito una "fotografia" sorprendente che, anche se non rappresenta una vera e propria scoperta, è da considerare una robusta conferma di ciò che si trova in letteratura: sulla matrice erano presenti tracce di DNA riconducibili a numerose specie botaniche (pollini) e a numerose specie microbiche.

Tale "contaminazione" del fiore è il frutto di uno scambio "programmato" e funzionale tra fiori di specie botaniche diverse, mediato dagli insetti impollinatori. L'impronta del **microbiota fiorale** è infatti presente anche in api, pan d'api e miele e la corrispondenza non è casuale: è l'impronta univoca che l'ambiente imprime sul network microbiologico dell'impollinazione.

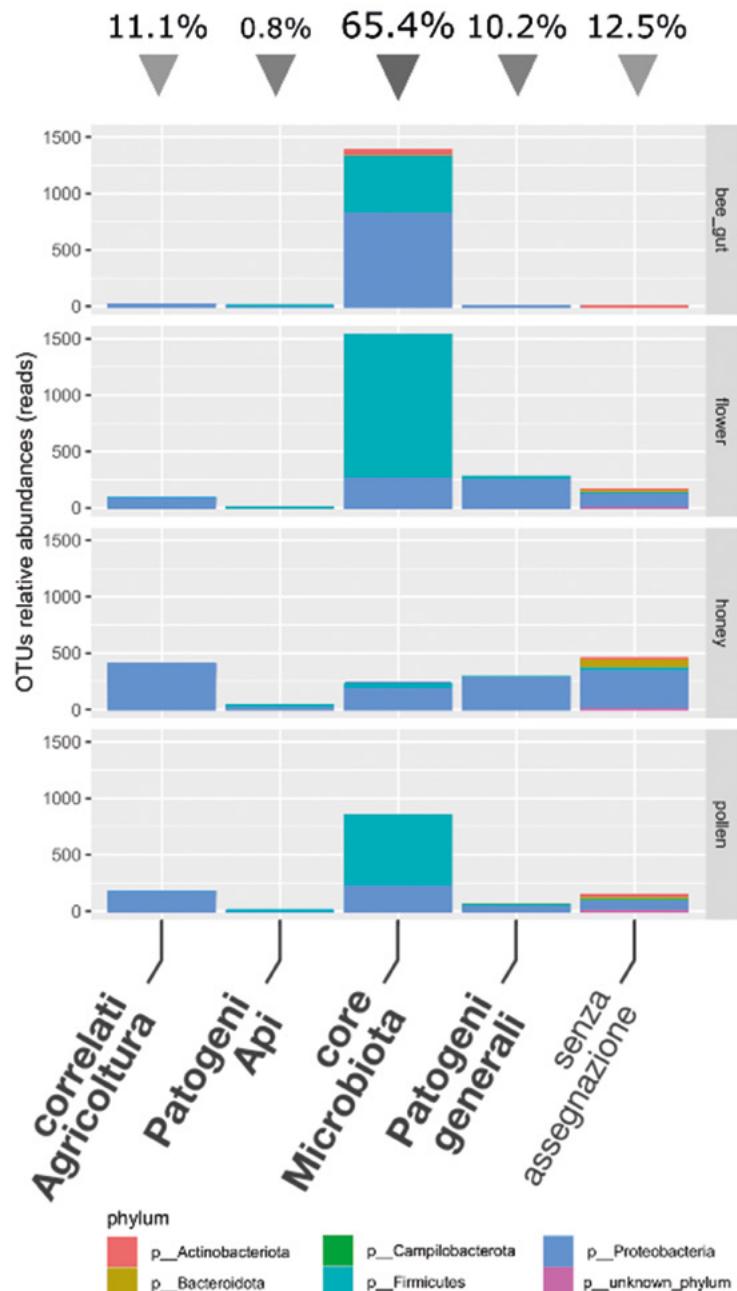
Figura 2

Analisi delle abbondanze relative dei microbi batterici delle diverse matrici analizzate (GUT, FLW, POL, HON) suddivise per la categoria funzionale di appartenenza (metadati) come le specie batteriche correlate all'agricoltura, le specie patogene e le specie associate alle api. I valori percentuali in testa ai grafici corrispondono alle abbondanze delle specie batteriche riscontrate nelle varie categorie funzionali (colonne). In breve, si evidenzia quanto siano abbondanti le specie associate alle api presenti sui fiori (bee core microbiota), la presenza significativa di specie correlate all'agricoltura (pressione agricola microbiologica) e la presenza di patogeni in tutte le matrici

L'esposizione del fiore all'ambiente e all'attività degli impollinatori non ha quindi una funzione soltanto riproduttiva: tutto è organizzato affinché il fiore si "contamini" continuamente, affinché si arricchisca il più possibile di biodiversità microbica. Sappiamo dalla letteratura che alcuni di questi microrganismi dal fiore passeranno al seme e andranno a costituire il primo microbiota funzionale del germoglio che verrà, altri garantiranno la visita da parte delle api, altri ancora garantiranno la salute degli impollinatori, altri ancora la salute della pianta. **In sostanza sia le piante che gli insetti hanno estremo interesse nell'avere a disposizione fiori microbiologicamente ricchi e attivi.**

Basti ricordare, per esempio, che se la nicchia ecologica è ricca in biodiversità c'è meno spazio per le specie patogene. Da questo punto di vista l'impollinazione, per la pianta, è anche il processo che garantisce la qualità e la sanità dei frutti e dei semi nel momento stesso in cui questi vengono generati.

La biodiversità microbica dell'ambiente viene in sostanza sfruttata a scopo "immunitario" per cui, se si ragiona da agronomi, per coltivare prodotti sani la biodiversità del microambiente, che garantisce a sua volta la biodiversità microbiologica, è la vera conditio sine qua non, e in quest'ottica le api non sono soltanto fecondatrici ma anche operatrici sanitarie.



L'alveare

Sui fiori le api incontrano e raccolgono un vero e proprio network di microrganismi. A testimonianza di questo fatto c'è la **firma microbiologica** che, perfettamente riconoscibile nelle diverse matrici, caratterizza il fiore, il microbiota funzionale¹ dell'intestino delle api, il pan d'api e il miele.

Grazie al lavoro delle bottinatrici l'alveare, durante la fioritura, diventa un vero e proprio serbatoio dinamico di microrganismi fiorali. Una parte di essi tornerà all'esterno dell'alveare insieme alle bottinatrici e andrà a colonizzare nuovamente i fiori, magari quelli appena sbocciati, mentre una parte andrà a innescare, a mantenere e a proteggere i processi bio-chimici sui quali si fondano la vita, la riproduzione e la sopravvivenza delle api.

Il microbiota florale gioca dunque un ruolo attivo non solo nel fiore ma anche all'interno dell'alveare, fungendo da vero e proprio strumento metabolico e immunitario per l'intera colonia. Dalla letteratura² sappiamo infatti che i microrganismi ambientali possono avere un ruolo fondamentale nella digestione, nella detossificazione e nella neutralizzazione di sostanze attive (naturali o artificiali) e patogeni presenti nel nettare e nel polline. Sfruttando l'attività diretta e indiretta (attraverso i metaboliti prodotti soprattutto dai batteri) dei microrganismi le singole api e l'alveare acquisiscono gli strumenti per sopravvivere e adattarsi all'ambiente.

In altre parole la vitalità delle api operaie, la sanità della covata, la salute dell'alveare e le proprietà nutraceutiche del miele hanno tutte la stessa "radice" e la stessa firma microbiologica per cui sostanzialmente l'interazione tra fiori e api è anche un complesso e mutualistico circolo della salute.

Da questo punto di vista le api hanno un ruolo, nell'agro-ecosistema, ben più importante di quello che

comunemente si attribuisce loro così come il fiore ha in realtà una funzione ben più complessa e preziosa di quello che si è sempre pensato.

I sovesci

Se la valenza agronomica dei sovesci è nota da tempo, meno chiara è la valenza apistica degli stessi. Le fioriture che generano sono davvero utili alle api?

Per rispondere alla domanda si sono allestite due tesi: in due siti di monitoraggio sono stati seminati e lasciati fiorire i sovesci e in altri due no. L'analisi dei dati permette di affermare con sufficiente sicurezza che sì, i sovesci sono davvero utili alle api, e non solo perché sono in grado di fornire nettare e polline, magari in periodi non caratterizzati da grandi fioriture, ma anche e soprattutto perché **le diverse specie botaniche che fioriscono contemporaneamente forniscono alle api un complesso di pollini diversi, e di microrganismi diversi.** In altre parole durante la fioritura **un complesso eterogeneo di piante sono una fonte di cibo e di salute molto più ricca di quella fornita da un complesso omogeneo.** Ogni specie botanica offre infatti alle api una fonte proteica specifica e un microbiota florale specifico per cui bottinando sui sovesci l'alveare si "arricchisce" di più rispetto al bottinamento "monofloreale". Non solo: le indicazioni che provengono dall'analisi dei dati sembrano suggerire che la concentrazione su una piccola porzione di terreno di diverse specie botaniche in fioritura sia in grado di favorire un più veloce ed efficiente "arricchimento" microbiologico sia dei fiori sia degli alveari, rispetto alla presenza di diverse specie in fioritura su un territorio più vasto.

Questioni da approfondire

Se le indagini di Bio-agri-apis hanno mostrato chiaramente quanto sia

complesso il servizio ecosistemico dell'impollinazione, quanto sia importante l'interazione tra fiore e ape e quanto profondamente siano legati il lavoro (e il destino) di agricoltori e apicoltori, le questioni da approfondire che il progetto ha "aperto" sono tante, e di un'importanza ancora maggiore rispetto alle nozioni e alle certezze acquisite. In altre parole ciò che c'è ancora da capire e da scoprire è molto di più di quello che si è capito e scoperto.

Una questione su tutte ha catalizzato l'attenzione del gruppo che in Aspromiele si occupa di monitoraggio ambientale: siccome in tutte le matrici analizzate (anche quelle derivanti dai sovesci) sono stati rinvenuti residui di pesticidi (in alcuni casi in dosi molto significative), **che impatto hanno i fitofarmaci sul network microbiologico dell'impollinazione?** Quali conseguenze ha l'introduzione diretta, tramite l'irrorazione più o meno accidentale dei fiori, o indiretta, tramite la deriva aerea o le zampette dei pronubi, di uno o più pesticidi nel micro-ecosistema florale?

Purtroppo non ci sono elementi in letteratura che consentano una risposta a queste domande: una valutazione d'impatto dei pesticidi sul microbiota florale semplicemente non è mai stata fatta. E forse non è nemmeno mai stata concepita. **La logica suggerisce che, almeno i fungicidi, un qualche impatto negativo dovrebbero averlo sulla componente fungina, quella che gioca un ruolo fondamentale nell'attrattività del fiore e nella digeribilità, da parte delle api, dei grani pollinici.** La logica però non basta: nessuno può affermare che i fungicidi in fioritura siano un problema proprio perché nessuno lo ha mai verificato.

Sarebbe dunque urgente aprire un campo di indagine sull'argomento in quanto ciò che in ogni caso sappiamo ci autorizza ad essere preoccupati. Sappiamo infatti che i pesticidi, so-

¹ Il microbiota funzionale si riferisce alla comunità di microrganismi presenti in un ambiente specifico e con una determinata funzione, come il "core microbiota" intestinale delle api, che contribuisce alla digestione, sintetizza vitamine, regola il sistema immunitario e protegge contro i patogeni.

² Engela P., Martinson V.G., Moran N.A., 2012. *Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee.* PNAS 109:27. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202970109

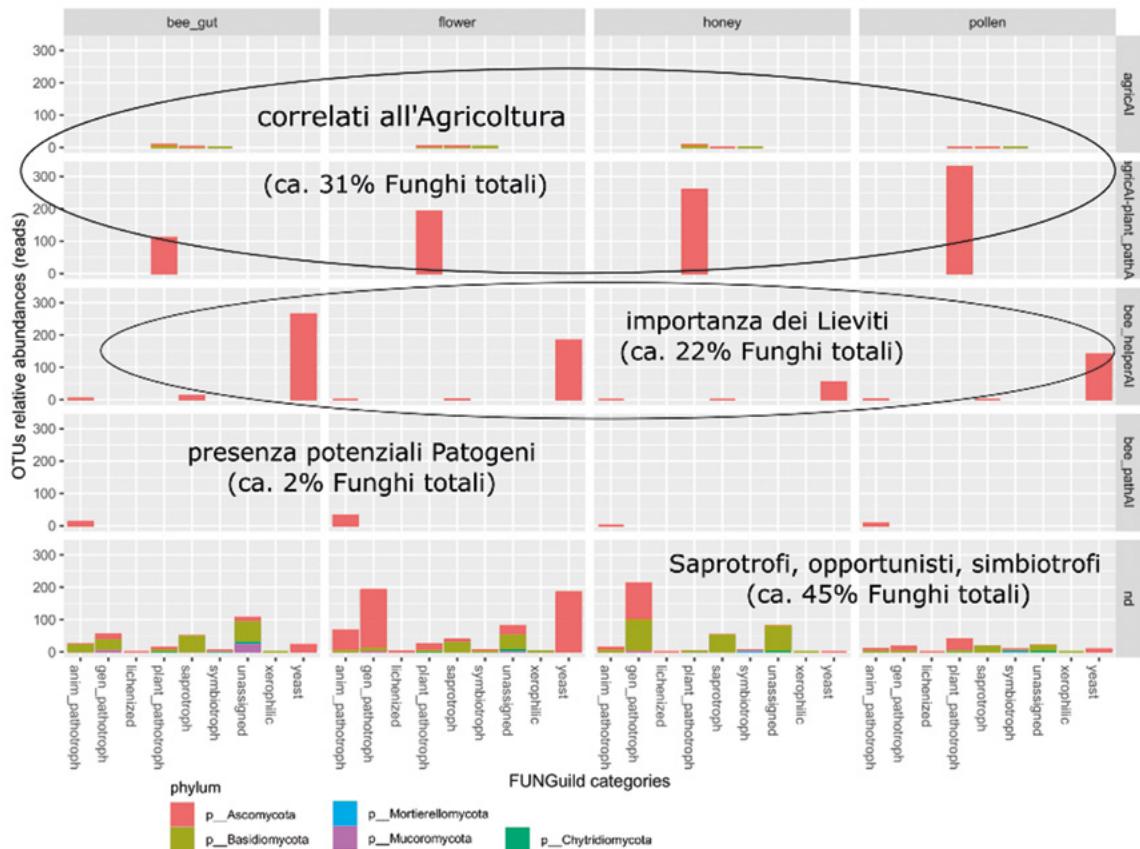


Figura 3

Analisi delle abbondanze relative dei microbioti fungini delle diverse matrici analizzate (GUT, FLW, POL, HON) suddivise per la categoria funzionale di appartenenza (metadati) come i lieviti, le specie fungine correlate all'agricoltura, le specie patogene e le specie ad ampi ruoli ecologici (saprotrofi, opportunisti, simbiotrofi, ecc...). I valori percentuali corrispondono alle abbondanze delle specie fungine riscontrate nelle varie categorie funzionali (righe). In breve, si evidenzia quanto siano abbondanti le specie di lieviti che sono associate alle api e ai fiori, la presenza significativa di specie correlate all'agricoltura (pressione agricola microbiologica), la bassa presenza di patogeni in tutte le matrici, e l'abbondanza di funghi ad ampi ruoli ecologici a suggerire quanto sia preponderante la firma microbiologica fungina dell'ambiente esterno

prattutto quelli sistematici, percorrono le stesse vie biologiche dei microrganismi fiorali: dal fiore possono passare al frutto e al seme e, sempre dal fiore, possono passare all'ape e all'alveare, e dall'alveare fare il percorso inverso verso altri fiori. **Irrorare, volontariamente o accidentalmente, pesticidi sui fiori significa quindi "spalmarli" in tutto l'ambiente, dopo aver contaminato tutti gli organismi coinvolti nell'impollinazione.**

Non sono però la contaminazione e la residualità a preoccupare: un eventuale impatto negativo sui microrganismi del fiore innescherebbe infatti, nel lungo periodo, **un danno biologico** (e se si ragiona in termini produttivi **un danno alla qualità degli alimenti**) su tutta la "filiera" legata all'impollinazione. In altre parole, **se i pesticidi avessero un impatto negativo sui**

microrganismi, lo avrebbero allo stesso modo sulla salute e le qualità nutrizionali di tutte le piante presenti nel microambiente, dei loro frutti, dei loro semi e persino sulle qualità nutraceutiche del miele.

Il futuro di agricoltura e apicoltura potrebbe essere strettamente legato a una risposta chiara data alla domanda: **che impatto hanno davvero i pesticidi sui fiori?**

Qualora poi si accertasse che i fungicidi hanno un impatto negativo sui funghi fiorali, quanto evidenziato con Bio-agri-apis potrebbe aiutare gli agricoltori a trovare una soluzione biologica per contenere, ad esempio, la moniliosi dei fruttiferi senza l'impiego di fungicidi? Si potrebbe ricorrere all'uso di biostimolanti micbici? Servirebbe a qualcosa saturare di fiori le interfile dei frutteti in fioritura e

installare un apario nelle vicinanze? Avrebbe senso provare a saturare le nicchie ecologiche fiorali del melo o dell'albicocco, per esempio, con microrganismi provenienti da altre specie botaniche, attraverso l'azione delle api, in modo da ridurre lo spazio per lo sviluppo del patogeno sul singolo fiore?

Anche a queste domande è impossibile rispondere perché nessuno ci ha mai provato. Le esperienze di entomovectoring forniscono infatti dati soltanto sull'introduzione di bio-pesticidi sui fiori tramite l'azione delle api, ma non sono utili a capire se la biodiversità vegetale naturale, sapientemente concentrata nei frutteti e intensivamente visitata dai pruni, può davvero evitare l'uso dei fungicidi in fioritura. Sarebbe interessante scoprirllo. ●