



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**API E CARATTERIZZAZIONE DELLA POPOLAZIONE LIEVITIFORME:  
MONITORAGGIO DELL'AMBIENTE E  
RUOLO DEI LIEVITI ISOLATI**

**CHARACTERIZATION OF THE YEAST POPULATION IN HONEY BEES:  
ENVIRONMENTAL MONITORING AND  
ROLE OF ISOLATED YEASTS**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Silvia Gattucci

Relatore

Prof.ssa Francesca Comitini

Correlatore:

Dr.ssa Alice Agarbati

Sessione estiva

Anno accademico 2021-2022

*Alla natura,  
che ogni giorno trova il modo di meravigliarmi...*

## INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	1
1.1 Biologia dell'ape e rapporto con l'uomo e l'ambiente	1
1.1.1 Origine ed evoluzione dell'ape	4
1.1.2 Ciclo biologico dell'ape	7
1.2 Nutrizione dell'ape	13
1.3 Anatomia e fisiologia dell'apparato gastroenterico	17
1.4 Microbioma gastroenterico dell'ape	20
1.5 Ruolo del microbioma dell'ape	27
1.6 Cambiamenti del microbioma a seguito di fattori biotici e abiotici	31
1.7 Fermentazione eterolattica nel passaggio da polline a pane d'api	32
CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO	35
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	36
3.1 terreni di coltura	36
3.2 Campionamento	38
3.2.1 fiori	40
3.2.2 Apparato gastroenterico dell'ape	43
3.2.3 Prodotti dell'alveare	44
3.3 Identificazione e caratterizzazione molecolare	46
3.3.1 Estrazione del DNA	47
3.3.2 Reazione di amplificazione	48

3.3.3 Elettroforesi su gel di agarosio	50
3.3.4 Sequenziamento	50
3.4 Crioconservazione dei ceppi isolati	51
CAPITOLO 4: RISULTATO E DISCUSSIONI	52
4.1 Risultato delle conte vitali di lievito su fiori, intestino e prodotti dell'alveare	52
4.2 Identificazione dei lieviti isolati	60
4.3 Elaborazione delle relazioni presenti nei lieviti trovati nelle varie matrici	64
4.3.1 Lieviti nei fiori	65
4.3.2 Lieviti nel corpo dell'ape	67
4.3.3 Lieviti nell'apparato gastroenterico dell'ape	69
4.3.4 Lieviti nei prodotti nel polline	76
4.3.5 Lieviti nel pane d'api	78
4.3.6 Lieviti nella propoli	82
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	85
CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA	89

## CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

### *1.1 Biologia dell'ape e rapporto con l'uomo e l'ambiente*

Sono numerose le trattazioni scientifiche che considerano il presupposto “*senza le api non ci sarebbero piante da fiore, e senza piante da fiore non ci sarebbero api*”. La sopravvivenza a lungo termine dell'agricoltura in tutto il mondo si basa in parte sugli insetti impollinatori. In termini monetari questi ultimi contribuiscono con una stima di 117 miliardi di dollari all'anno; in Italia una sola arnia contribuisce ad un incremento produttivo delle colture agricole pari a 1200 euro l'anno; Le api domestiche e selvatiche sono responsabili di circa il 70% dell'impollinazione di tutte le specie vegetali viventi sul pianeta e garantiscono circa il 35% della produzione globale di cibo (Silli et al, 2019).

*Apis mellifera* è l'impollinatore più importante dal punto di vista economico delle colture agricole in tutto il mondo. Inoltre, le api sono cruciali per mantenere la biodiversità in tutto il mondo perché permettono la riproduzione sessuata di numerose specie vegetali che richiedono un impollinatore obbligatorio per la loro fecondazione.

Le piante da un punto di vista riproduttivo possono essere divise in diversi gruppi in base a quale meccanismo sfruttato per trasportare i granelli di polline dall'antera o organo maschile del fiore all'organo femminile o stigma di un altro fiore. Piante che affidano il processo di impollinazione a vettori biotici e più specificatamente agli insetti sono denominate entomofile. Per richiamare il maggior numero di insetti pronubi sui propri fiori le piante entomofile hanno evoluto finissimi meccanismi di richiamo quali in primis la produzione di nettare, principale fonte zuccherina alla base dell'alimentazione degli insetti ed in secondo luogo la produzione di profumi, colori nonché la stessa forma dei fiori sono sistemi messi in atto dalla vegetazione per attirare gli impollinatori. Nelle diverse aree del mondo questi variano in funzione del tipo di impollinatori che vi sussistono. I fiori impollinati dalle api sbocciano più spesso di giorno, possono avere colori diversi, ma raramente rossi, colore che

troviamo ampiamente espresso nelle zone tropicali e sub-tropicali dove invece l'impollinazione dei fiori avviene ad opera di uccelli. Il profumo dei fiori impollinati dalle api diurne tende ad essere meno forte di quello dei fiori impollinati di notte, spesso visitati da pipistrelli o falene. Hanno guide di nettare o di colore che spesso sfociano nell'ultravioletto, non visibile per l'occhio umano ma perfettamente acquisibili dall'ape e spesso petali come piste di atterraggio. Le api sono particolarmente attratte dai fiori bianchi, blu e gialli.

Molto importante sottolineare che sono entomofile la stragrande maggioranza delle piante che costituiscono le foreste tropicali denominate per il loro ineguagliabile servizio di rimozione di CO<sub>2</sub> dall'atmosfera ed immissione di O<sub>2</sub> i polmoni del mondo, i boschi della savana, le mangrovie e quelle che fanno parte delle foreste decidue temperate attribuendo così all'ape domestica e selvatica il fondamentale ruolo di guardiane dell'ecosistema (Le Conte et al, 2008).

Al fine di questa strettissima relazione, durante il corso dei secoli si è assistito ad una co-evoluzione delle specie entomofile e dei loro insetti pronubi tanto che l'affermazione poco sopra citata assume un significato cardine da cui ha preso forma tale Tesi di laurea.

Le api vivendo in simbiosi con l'ambiente che le circonda sono state una delle prime specie animali a risentire in maniera molto forte dell'attività umana e del sistema capitalista che governa la nostra società.

L'inquinamento atmosferico ha portato a fenomeni climatici sempre più imprevedibili come lunghi mesi di siccità seguiti da piogge alluvionali ed all'innalzamento delle temperature medie annuali con conseguente rischio di estinzione di preziosi biotipi quali ad esempio *A. mellifera* subsp. *sahariensis* comunemente denominata ape sahariensis stanziata nel deserto del Sahara dove possono essere registrati anche 50 °C. La sottospecie in questione per sopportare le infernali temperature crea i suoi nidi all'interno di oasi ed ha adattato il suo completo ciclo vitale alla fioritura delle palme (Navajas et al, 2008).

Tuttavia, le previsioni fatte da diversi studiosi affermano che se il surriscaldamento globale non si fermerà le oasi verranno perdute portando perciò alla scomparsa delle specie animali e vegetali che

dipendono direttamente da esse compresa l'ape *sahariensis* che in base alle sue caratteristiche ecologiche non sarebbe in grado di trovare rifugio in altri habitat.

È stato documentato come nelle zone urbane le api non riescano più a trovare la guida nettarifera che le conduca al fiore in quanto intossicate dai gas di scarico delle macchine, è stato inoltre visto come in base all'abbassamento delle difese immunitarie dovuta alla forte presenza di questi gas nell'aria esse sono più suscettibili ad ulteriori fattori stressogeni (Reitmayer et al, 2019).

La crescente richiesta di prodotti agricoli a poco prezzo e da ritrovare in qualsiasi momento della stagione sulle nostre tavole ha portato all'intensificazione delle colture e all'adozione della tecnica delle monocolture a discapito della biodiversità vegetale e animale. L'ambiente innaturale che si viene a generare porta ad un indebolimento anche della pianta coltivata stessa la quale sarà maggiormente soggetta allo sviluppo di malattie microbiche e all'invasione di insetti infestanti. Quest'ultimo punto apre le porte ad un altro fenomeno che sta via via facendo diminuire drasticamente la popolazione apistica mondiale; l'utilizzo di pesticidi in agricoltura. Quest'ultimi rientrano nella categoria dei fitosanitari e rappresentano delle molecole i quali target molecolari sono posseduti anche dalle api che direttamente o indirettamente ne vengono a contatto. Le conseguenze sono diverse, in base alla modalità di assunzione ed alla concentrazione della molecola bioattiva, tra cui la morte diretta una volta giunte alla colonia formando dei veri e propri tappeti di api senza vita davanti l'arnia o pur rimanendo vive perdono la capacità di comunicare con le proprie sorelle, fattore fondamentale per il giusto sviluppo della colonia. Da annoverare infine anche l'aumento dell'incidenza di malattie associate ad agenti patogeni di ogni tipologia (virali, batterici, funginei e parassitari) che da un lato sono diventati più aggressivi e dall'altro, a causa dell'indebolimento delle api stesse, hanno preso più campo.

Nell'insieme tutti questi fattori hanno portato ad un abbattimento consistente delle colonie in tutto il mondo tanto che è stato dato uno specifico nome a questo fenomeno: Colony Collapse Disorder (CCD). Il CCD è ad oggi un problema di ordine globale e tutti gli sforzi dei ricercatori nel campo

ecologico sono riversati proprio sullo studio delle motivazioni che hanno originato questa nuova pandemia apistica e sulla base di queste creare un'eventuale cura o almeno un palliativo.



Figura 1 - Tappeto di api morte intossicate all'entrata dell'arnia dopo visita in un campo trattato. Da apicoltura CH.

### ***1.1.1 Origine ed evoluzione dell'ape***

In questa tesi di Laurea verrà sottointesa seppur non specificata la specie *A. mellifera* subsp. *ligustica* in quanto specie più allevata al mondo in virtù della sua grande produttività e studiata in questa specifica ricerca.

*A. mellifera* è la specie più presente nel mondo in base alle sue origini fondate su una selezione naturale di famiglie e soggetti capaci di produrre molto miele per sopperire alle esigenze alimentari che si presentavano durante gli inverni lunghi e freddi dell'Eurasia. Occorre tenere in considerazione che fino al XVII secolo la coltivazione della canna e della barbabietola da zucchero non erano presenti e quindi il miele era l'unico dolcificante e importantissima fonte di nutrimenti dalle nobili qualità. Questo giustifica l'attenzione che l'uomo ha sempre avuto nei confronti di questo insetto e dei suoi



prodotti. La sua originaria distribuzione comprendeva l'Europa, l'Africa, l'est dell'Afghanistan, il Kazakistan e la Russia orientale.

Tabella 1 – Classificazione tassonomica dell'*A. mellifera*.

<b>REGNO</b>	<b>ANIMALE</b>
Phylum	Artropodi
Classe	Insetti
Ordine	Imenotteri
Sezione	Aculeata
Sottordine	Apocrita
Famiglia	Apidi
Genere	Apis
Specie	mellifera
Sottospecie	ligustica

La Specie *A. mellifera*. è originaria dell'Africa e si è poi diffusa, a partire dall'Ottocento a opera dell'uomo, in America del nord e del sud, Australia e Nuova Zelanda.

*A. mellifera* grazie alla sua naturale propensione a costruisce più favi paralleli e riparati all'interno di cavità come alberi tronchi o fessure di pareti rocciose si è potuta adattare a molti ambienti diversi, da quelli tropicali del sud, fino a raggiungere il 60° parallelo a nord, in Russia, differenziando poi le proprie caratteristiche biologiche e comportamentali al fine di adattarsi alle diverse zone climatiche e conseguentemente alle diverse stagionalità delle fioriture.

In virtù di questa forte spinta evolutiva ad oggi sono presenti ben 25 sottospecie di *A. mellifera*.

Ai fini di questa trattazione ci si limiterà a descrivere le caratteristiche ecologiche più salienti dell'*A. mellifera* subsp. *ligustica* o ape italiana.

Questa sottospecie in particolare si è formata sopravvivendo all'era delle glaciazioni e mostrando un profilo genetico differente della “sorelle” Spagnole e Siciliane.

*A. mellifera* subsp. *ligustica* è diffusa in quasi tutto il territorio italiano, dalle zone pedemontane del Nord fino alla Calabria, in Sicilia come sopra già citata si trova l'ape mellifica sicula di colore scuro. La sottospecie ligustica si differenzia dalle altre perché le operaie hanno i primi segmenti dell'addome di colore giallo chiaro, le regine sono gialle dorate, con enorme capacità di ovodeposizione ed inoltre essendosi evoluta in Italia in una posizione geografica che favorisce la crescita di una vasta gamma di piante nettariifere e povera di predatori di miele, l'ape italiana è tendenzialmente docile e molto laboriosa. Di negativo le colonie hanno la tendenza al saccheggio e alla deriva.

Le api italiane essendosi evolute nel caldo clima mediterraneo possono sopportare i duri inverni europei, con cui si difendono consumando grandi quantitativi di miele immagazzinato durante l'estate, e le fresche e umide primavere delle latitudini più a Nord.

Le api sono insetti sociali che formano colonie poliennali, la famiglia è divisa in caste con determinate gerarchie e ruoli altamente specializzati che cambiano nelle varie fasi della loro breve esistenza. Sono animali che lavorano dal primo giorno della loro vita fino alla loro morte. Una famiglia ben formata conta un numero di api che va dalle 50000 sino alle 80000.

Tuttavia, le api non hanno sempre condotto una vita così altamente sociale e tale teoria può essere senza dubbio convalidata dallo studio delle singole specie appartenenti alla loro stessa famiglia (apidi), di fatti la maggior parte di esse conduce tutt'ora una vita solitaria caratterizzata dall'accoppiamento e dalla successiva deposizione delle uova da parte della femmina in gallerie scavate nel suolo o nel legno e portate alla vita tramite un'alimentazione di miele e polline.

Di solito dopo la deposizione delle uova la femmina muore senza aver mai visto la propria prole. Un passo in più verso l'ape che noi oggi conosciamo può essere fatto studiando la specie *Bombus latreille*, comunemente chiamati Bombi, in quanto conducono una vita sociale che si avvicina di molto a quella delle api ma di durata molto più corta, estiva; le nuove regine allevate in autunno dopo l'accoppiamento svernano singolarmente per rifondare in primavera nuove società. Nell'America

Latina esistono api, appartenenti alla sottofamiglia dei Mieloponini, che presentano già una società poliennale dove le regine hanno perso totalmente la capacità di condurre anche per brevi periodi vita autonoma concentrandosi esclusivamente sulla deposizione delle uova e della continuità della famiglia (Contessi A., 2016).

### ***1.1.2 Ciclo biologico dell'ape***

Per quanto riguarda *A. mellifera* l'inizio della stagione è segnato dal volo di purificazione compiuto dalle operaie nei primi giorni di primavera, esse rilasciano nell'ambiente circostante le deiezioni accumulate nel retto durante l'inverno.

Tutto parte poi dalla regina e dalla sua fecondazione da parte di un numero variabile di fuchi (dai 6 ai 16). Se da una parte tanti fuchi per un'unica ape regina spiega l'enorme variabilità genetica della sua prole, essenziale per il giusto e corretto andamento della famiglia, dall'altra spiega la divisione sociale che talvolta si verifica all'interno di essa tra api derivate da semi diversi ed aventi perciò caratteri anche assai diversi che potrebbero in alcuni casi portare a non pochi problemi. L'espressione "volo nuziale" indica in etologia il rituale d'accoppiamento degli insetti sociali (isotteri e imenotteri), più precisamente il volo che la femmina ancora vergine, la futura regina della colonia, compie inseguita da vari fuchi.

L'epoca in cui si effettua inizia ad aprile-maggio raggiungendo la massima frequenza in giugno, continuando fino a settembre. Tale accoppiamento è un rituale unico nel mondo degli insetti in quanto segue delle leggi specifiche (trascendentali) che ogni elemento della specie ha ben conservate nel corredo genetico. Innanzi tutto, dal 5° al 15° giorno di vita la futura regina della colonia compie dei piccoli voli di ricognizione di una durata variabile dai 5 ai 10 minuti spronata ed incentivata dalle operaie, talvolta anche in modo brusco, solitamente nelle ore più calde di una tiepida giornata senza vento accompagnata da una corte di circa venti api.

Quando la regina compare sulla porticina con l'intenzione di effettuare il vero e proprio volo nuziale ogni altra attività si arresta ed un gruppo di operaie estroflette la ghiandola di Nasonov e il volo nuziale ha inizio.

L'accoppiamento avviene in dei luoghi predisposti denominati punti di raduno, molti studi si sono concentrati sul capire il perché le api prediligano determinati luoghi a discapito di altri ma ancora non si è riusciti a risolvere il quesito; tutta via si ipotizza che ci sia un legame tra il punto di raduno prescelto e la sua correlazione con la luce polarizzata associata alla grande sensibilità posseduta dagli occhi delle api nei confronti di essa. Il volo nuziale deve avvenire a una certa distanza dalla colonia per evitare l'accoppiamento con fuchi appartenenti alla stessa con conseguente instaurazione di consanguineità e quindi fragilità genetica.

Nel luogo prestabilito i fuchi arrivano prima delle regine, verso mezzogiorno per poi aumentare esponenzialmente nelle ore successive. I fuchi sono attirati da qualsiasi insetto voli nelle loro vicinanze e si attingono a seguirlo ma, dopo pochi secondi, quando si accorgono che esso non è rappresentato dall'ape regina la loro attenzione si sposta su un altro insetto volatore e così via fino al fatidico incontro con la sposa che si è visto essere promosso anche da particolari molecole chimiche attrattive prodotte dalla regina stessa mediante specifiche ghiandole (mandibolari).

Di ostacolo al volo nuziale possono essere le cattive condizioni meteorologiche: se il maltempo non permette alla regina di compiere per oltre venti giorni il volo nuziale non le sarà più possibile deporre uova fecondate, ne deporrà solo di non fecondate da cui nasceranno esclusivamente fuchi.

In un luogo di raduno è possibile distinguere due categorie di maschi:

1. esemplari che volano alti (la maggior parte) che rappresentano coloro che non si accoppieranno svolgendo l'importante ruolo di barriera da eventuali predatori tra il vero e proprio accoppiamento che si verificherà sotto;
2. soggetti geneticamente più forti e resistenti che formano attorno alle regine lo sciame di accoppiamento, quest'ultimo non è caotico ma bensì molto ordinato e composto, si è visto di fatti

come ogni fuco aspetti “il proprio turno” in fila indiana, ordine deciso dal diverso grado di dominanza posseduto da ogni esemplare.

L'accoppiamento avviene in volo, al termine di esso il fuco cade esanime a terra in quanto nella copulazione gli organi riproduttivi del maschio vengono strappati restando agganciati alla borsa copulatrice della regina.

Gli spermatozoi, dopo l'accoppiamento, migrano nel dotto spermatico per poi passare nella spermateca sia con movimenti propri attivati dalla secrezione della ghiandola della spermateca sia con movimenti meccanici compiuto dalla regina stessa mediante l'attività della pompa del seme.

Un maschio può fornire da 1,5 a 1,7 mm<sup>3</sup> di sperma, contenente da 11 a 15 milioni di spermatozoi gran parte dei quali tutta via verranno persi durante l'accoppiamento (quasi il 90%).

Il fuco contiene circa l'85% del patrimonio genetico delle api. Una regina continua ad accoppiarsi fino a che non raggiunge un totale di circa 5-7 milioni di spermatozoi all'interno della propria spermateca, questo spiega il così alto numero di fuchi che partecipano alla fecondazione di una sola regina.

Il rituale dura all'incirca 10-20 minuti, raramente si prolunga. Dopo di che le regine tornano nel proprio alveare con ancora attaccato l'endofallo dell'ultimo fuco con cui si sono accoppiate come testimonianza del fatto che il volo ha avuto successo.

Da questo momento in poi non usciranno più dall'alveare, se non nei casi di sciamatura, ed inizieranno a deporre costantemente uova.

Le uova vengono normalmente deposte partendo dai telaini al centro dell'arnia in modo concentrico verso l'esterno in uno spazio molto grande denominato nido di covata circondato da polline e miele, all'interno di esso la temperatura si mantiene costante fra i 34 ° e i 35 °C.

Quando la regina termina gli spermatozoi che ha a disposizione o non è stata fecondata diverrà una regina fucaiola ovvero una regina che depone solo covata determinando a breve la fine della colonia.

Le operaie in questo caso possono decidere di sostituire la regina prelevando un uovo, confinandolo in una celletta reale ed iniziando a nutrire la larva con pappa reale. Tale operazione, si verifica anche

quando le operaie non avvertono più i feromoni secreti dalla regina vecchia o che non riescono più ad essere gestite da essa coalizzandosi tra loro per formare quindi una nuova regina.

La regina vecchia a questo punto, avvistata una nuova celletta reale, cessa di deporre le uova e sciamata con il 70 % delle operaie.

Quando la nuova regina nasce effettua il “canto di guerra”, seguito dall’uccisione delle regine ancora non nate ed inizia così il suo reame. Si riscontrano casi in cui la soppressione delle altre regine è impedita dalle operaie magari perché preferiscono tenere qualche regina di riserva nel caso in cui la prima nata durante il volo nuziale rimanga in qualche modo uccisa o da predatori o da fenomeni climatici avversi. Se ciò si verifica le operaie inizieranno i preparativi per compiere una seconda sciamatura. Ma la seconda regina che sciamata insieme alle sue operaie è una regina vergine, che troverà il luogo dove iniziare la colonia molto lontano a dove è nata, nel momento in cui si stabilizzerà farà il suo volo nuziale.

L’ape regina è fondamentale per mantenere una giusta “omeostasi” all’interno dell’alveare, di fatti deponendo circa 250000 uova l’anno e ben 2000 uova al giorno durante i mesi estivi permette da una parte un continuo ricambio di esemplari prevenendo perciò la creazione di blocchi generazionali che risulterebbero deleteri all’interno del grande ciclo continuo della loro invidiabile organizzazione e dell’altra l’ampliamento della colonia necessaria per avere una massiccia forza lavoro indispensabile per stoccare il giusto quantitativo di miele da consumare poi durante l’inverno.

Le operaie tuttavia, senza togliere niente all’ape regina, sono il vero cuore pulsante dell’alveare in quanto compiono praticamente ogni ruolo al suo interno dall’allevamento delle future sorelle alla produzione di propoli per proteggere la colonia da eventuali invasori sia macro che microscopici.

L’ape operaia impiega 21 giorni per nascere in condizioni di temperatura ottimale, che si aggira intorno ai 30-35 °C, mentre la conta dei giorni aumenta se è più bassa e vive all’incirca 45 giorni in estate e 180 giorni invece in inverno in quanto la regina smette di deporre. Per diventare tale nei primi tre giorni di vita viene ad essere nutrita con pappa reale poi l’alimentazione cambia e diviene una miscela a base di miele con l’aggiunta di più sostanze tra cui acqua, polline, pane d’api e nettare.

Una singola ape operaia nel corso della sua breve vita estiva compie effettivamente tutti i lavori all'interno della famiglia:

Tabella 2 – Stato sociale dell'ape relazionata ai suoi giorni di vita.

<b>Giorni dopo la nascita</b>	<b>Lavoro svolto</b>
1-3 gg	Pulisce e prepara le celle per la deposizione delle uova e si occupa della covata
4-5 gg	Nutre le larve dai tre giorni di vita in poi con una miscela a base di pane d'api e miele
6-9 gg	A seguito dell'entrata in funzione delle ghiandole ipofaringee nutre le larve fino ai tre giorni di vita con la pappa reale
10-16 gg	Inizia a lavorare la cera tramite le mandibole producendo calore e facendo così arrivare la cera a 40 gradi per essere modellata al meglio
17-19 gg	Immagazzina miele nelle cellette e lo porta a maturazione
Al 20 gg	Si occupa della difesa dell'alveare
Dal 21 gg	Diventa bottinatrice, solo a questo tempo in quanto si pensa che prima non sia neurologicamente preparata per fare la danza che dirà alle sorelle dove si trova la fonte nettarifera

Tale divisione non è tuttavia rigida in quanto il loro percorso di sviluppo si basa sulle esigenze della colonia, di fatti si è visto come il passaggio da ape adulta a bottinatrice varia in base alla presenza o meno di risorse alimentari all'interno dell'alveare; lo sviluppo è più veloce nel momento in cui esse scarseggiano mentre la presenza di molte api vecchie determinano un rallentamento della crescita della nuova generazione. Riguardo quest'ultimo punto si è studiato che i fattori principali che intervengono su tale comportamento sono il contatto diretto tra la generazione vecchia e quella nuova e il rilascio da parte delle ghiandole mandibolari delle api anziane di determinati feromoni inibitori. Nelle ultime fasi della loro vita le api operaie sono bottinatrici in quanto hanno una maggiore quantità di peluria sul proprio esoscheletro, man mano che vanno avanti con l'età, tale peluria viene persa e con essa anche il loro ruolo che muta e diventa quello di lavorare la propoli.

La propoli è una sostanza resinosa, aromatica, di consistenza picea composta chimicamente dal 50% in resine aromatiche che le conferiscono particolari colori a seconda delle piante di origine che variano dal giallo-rossastro al verdastro, dal 40% in cera che viene aggiunta in un secondo momento per rendere la propoli più lavorabile e dal 10% in oli essenziali. Una colonia sufficientemente popolata ne produce in un anno circa 200 grammi.

Le api distaccano con le mandibole la propoli dalle gemme, dalle pigne e dalla corteccia delle piante resinose quali pino, pioppo e ontano, la iniziano subito a lavorare per renderla più malleabile ed infine la depositano nelle corbicole al fine di poterla trasportare all'interno dell'alveare, nei siti dove è più richiesta, dove ad aspettarle ci saranno le api cementatrici addette al distacco del prezioso materiale dalle cestelle del polline. Questa particolare classe operaia impiega generalmente 15 minuti per staccare con le mandibole la propoli ma in base alla consistenza di quest'ultima sono stati documentati casi in cui il processo di scarico è durato dalle sette ore fino ad intere nottate, una volta effettuata l'operazione le api cementatrici attaccano immediatamente la resina a un sito lungo il muro dell'alveare.

L'ape cementatrice leviga quindi la resina, ora ufficialmente propoli, con le sue mandibole in un modo simile a quello della costruzione in cera.

Le resine possono anche essere collocate in un'area di stoccaggio dove le api possono afferrare pezzi di propoli per poi inserirli dove la sua presenza è richiesta.

Le api utilizzano la propoli a fini antisettici in virtù della grande coorte di molecole antibatteriche ed antifungine che la caratterizzano, per chiudere le fessure delle arnie, rinforzare le cellette e rivestire animali invasori che in base alle loro notevoli dimensioni non riescono ad essere allontanati prontamente dalle operaie addette a tale ruolo così evitando l'iniziazione di processi putrefattivi all'interno dell'arnia.

Durante il processo di cementazione, le resine non sembrano essere modificate chimicamente anche se ci sono alcune prove che i profili chimici generali di resine raccolte direttamente da un raccoglitore e dalla propoli raccolta invece nell'alveare possono variare leggermente dalle gemme fogliari della



pianta da cui essa è derivata, ciò è ipoteticamente ascrivibile alla volatilizzazione di alcune sostanze chimiche durante diversi step all'interno del processo quali il viaggio di ritorno e l'eventuale addizione di secrezioni come effettivamente è stato testimoniato nella specie d'ape senza pungiglione *Plebeia emerina*. Tuttavia, come questo possa cambiare le proprietà chimiche delle resine deve ancora essere studiato (Simone-Finstrom et al, 2010).

## ***1.2 Nutrizione dell'ape***

Il nettare viene ad essere utilizzato dall'ape come principale risorsa zuccherina, consumato tal quale o sotto forma di miele generato tramite un processo di trasformazione enzimatica denominato trofallassi.

Il contenuto energetico del nettare di un fiore dipende, oltre che dalla specie vegetale che lo produce, dal suo volume e dalla concentrazione di zucchero (Nicolson et al, 2011). Anche se è difficile parlare di composizione chimica del nettare datosi che entrano in gioco diversi e molteplici fattori quali la singola specie che lo produce e la sua fenologia, il sesso, la densità, la longevità la distribuzione spaziale dei fiori ed in ultima analisi anche dalle condizioni abiotiche quali temperatura, disponibilità idrica e fotoperiodo, il nettare in generale è principalmente composto da zuccheri semplici come glucosio, fruttosio e saccarosio, da diversi amminoacidi quali prolina e glicina e da proteine dette nettarine presenti in concentrazione più bassa, il suo contenuto in acqua come accennato può variare notevolmente a seconda delle condizioni ambientali.

Il nettare floreale da un punto di vista microbiologico è inizialmente sterile ma viene dopo la sua sintesi rapidamente colonizzato da microrganismi provenienti da diverse fonti tra cui l'aria, le gocce di pioggia, la rugiada, il polline, la corolla e soprattutto il corpo (generalmente apparato boccale) degli animali che visitano i fiori.

Il nettare fornisce l'habitat ideale per molte specie microbiche come lieviti e batteri, che prosperano grazie all'alto contenuto di zucchero ma che esercita anche, proprio grazie a questa specifica

caratteristica, su di esse un filtro biologico dovuto alle alte pressioni osmotiche che si vengono a generare selezionando indirettamente le sole specie osmotolleranti.

Si assiste in questo caso ad un interessante rapporto mutualistico che si viene ad instaurare tra microrganismi e pianta; infatti è stato osservato come il metabolismo dei microrganismi all'interno del nettare produca un cambiamento delle sue caratteristiche organolettiche che si può ricollegare poi anche alla tipologia di insetti impollinatori che la pianta riesce a richiamare e d'altro canto come le proprietà intrinseche del nettare possono alterare la crescita e la proliferazione microbica.

È stato osservato che in generale i lieviti hanno un effetto neutro sulla preferenza degli impollinatori, sebbene in alcuni studi siano stati osservati effetti positivi ricollegati alla loro presenza. Al contrario, un rapporto sbilanciato tra batteri e lieviti verso i batteri ha mostrato effetti negativi sul comportamento degli impollinatori nei confronti della pianta, sebbene studi più approfonditi a riguardo dovranno essere condotti (Parachnowitsch et al, 2019).

I cambiamenti nel comportamento degli impollinatori dovuti alla presenza di microrganismi nel nettare possono influenzare la forma fisica delle piante e perciò la sua fitness, portando alla selezione naturale di particolari condizioni ecologiche del nettare che supportano o scoraggiano la crescita di diversi microrganismi.

I batteri più presenti in questa nicchia ecologica appartengono al genere *Acinetobacter sp.* seguiti da quelli del genere *Asaia sp.*, *Erwinia sp.*, *Neokomagataea sp.*, *Pantoea sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Rosenbergiella sp.*

I lieviti trovati in questo ambiente sono molteplici e con caratteristiche diverse, ad esempio sono state isolate specie di lievito in grado di crescere solo ed esclusivamente in questi ambienti, altre solo in piante particolari ed altre ancora, molto meno selettive delle prime, come *Metschnikowia reukauffii* in diverse specie di piante e substrati.

I generi di lieviti maggiormente isolati nel nettare e nelle superfici floreali dopo la *Metschnikowia sp.* sono *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Sporobolomyces sp.* (Álvarez-Pérez, 2019),

*Aureobasidium sp.*, *Clavispora sp.*, *Debaryomyces sp.*, *Hanseniaspora sp.*, *Kodamaea sp.*, *Papiliotrema sp.*, *Starmerella sp.*, e *Wickerhamiella sp.* (Klaps et al, 2020).

I potenziali meccanismi di interazione fungo-batterio nei microhabitat floreali degni di essere studiati includono la formazione di complessi fisici (ad es. aggregati cellulari, biofilm multispecie e associazioni endosimbiotiche), interazioni nutrizionali (competizione, sintrofia, alimentazione incrociata, ecc.), antibiosi, interazioni basate sulla segnalazione (ad es. quorum sensing) e trasferimento genico orizzontale tra cellule fungine e batteriche.

Il pane d'api è invece un prodotto di fermentazione derivante dal polline che viene ad essere utilizzato dall'ape come principale fonte proteica per nutrire le larve di operaia dopo il terzo giorno di vita.

Non si sa ancora bene se le api scelgano il fiore da visitare anche in base alle caratteristiche chimiche del polline contenuto al suo interno; si è visto ad esempio che la manipolazione del contenuto proteico del polline fornito alle colonie di bombi ha portato a un piccolo ma significativo aumento delle temperature toraciche negli esemplari che raccoglievano polline con concentrazione elevata di proteine e amminoacidi liberi e che api con due tipologie diverse di pollini a disposizione tendono a scegliere quello più ricco di alcuni amminoacidi essenziali, tuttavia queste sono solo teorie che devono essere confermate da ulteriori studi (Nicolson, 2011).

Per comprendere al meglio la conversione da polline d'api a pane d'api è importante avere informazioni riguardo rispettivamente il profilo dei carboidrati di entrambi i prodotti.

Il contenuto di zucchero libero del polline d'api è in media del 40%. Il fruttosio è lo zucchero identificato nelle quantità più elevate e rappresenta il 46% del contenuto di zucchero totale mentre il glucosio ne rappresenta il 37%. I monosaccaridi totali (fruttosio e glucosio) rappresentano circa l'83% della frazione di carboidrati del polline d'api. Il saccarosio rappresenta l'8%, il maltosio il 7%, il trealosio e il turanosio circa l'1% ciascuno (Szczesna et al, 2007).

La concentrazione di fruttosio e glucosio scende nel pane d'api mentre il saccarosio non viene più rilevato come dimostrato dallo studio di Urcan et al, (2018) che hanno eseguito analisi fisico-chimiche

su pane d'api proveniente da alveari siti in Romania ed in India quantificando gli zuccheri presenti, il rapporto fruttosio/glucosio, i fenoli totali ed i flavonoidi.

Il contenuto di fruttosio in tutti i campioni di pane d'api analizzati era superiore a quello del glucosio. Per quanto riguarda gli zuccheri minoritari come turanosio e maltosio sono state trovate solo quantità minori.

Tabella 3 - Contenuto di zucchero e rapporto F/G nei vari campioni di BB analizzati (Urcan et al, 2018).

Sample	Fructose (%)	Glucose (%)	Sucrose (%)	Turanose (%)	Maltose (%)	F/G
BB Romania—July 2016	19.32 ± 0.01	13.19 ± 0.01	nd	0.66 ± 0.01	0.89 ± 0.01	1.46
BB India—June 2016	18.79 ± 0.06	12.66 ± 0.04	nd	0.65 ± 0.01	0.82 ± 0.01	1.48
BB India—June 2016	19.58 ± 0.03	15.13 ± 0.02	nd	0.70 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.29
BB Romania—June 2016	13.97 ± 0.05	6.40 ± 0.010	nd	0.56 ± 0.02	0.82 ± 0.02	2.18
BB Romania—April 2016	19.29 ± 0.03	10.07 ± 0.02	nd	0.87 ± 0.01	0.91 ± 0.02	1.92

Come testimonianza dell'alto valore nutritivo posseduto dal pane d'api sono sotto riportati diverse caratteristiche possedute dal pane d'api proveniente da colonie stanziate in Colombia. Il contenuto di umidità era di  $15,7 \pm 3,6$  g / 100 g mentre le sostanze secche in composizione centesimale erano così ripartite: ceneri  $2,4 \pm 0,2$  g, lipidi  $3,4 \pm 1,1$  g e proteine  $23,1 \pm 2,9$  g. Il contenuto totale di flavonoidi e fenolici aveva mostrato valori rispettivamente di  $3,2 \pm 1,0$  mg di quercetina / g di pane d'api e  $8,9 \pm 3,1$  mg di acido gallico / g di pane d'api. L'attività antiossidante di FRAP e ABTS aveva riportato valori di  $46,1 \pm 13,0$  e  $61,5 \pm 10,2$   $\mu\text{mol TROLOX}$  / g di pane d'api. L'attività antiossidante misurata da entrambe le tecniche suggeriva inoltre una correlazione lineare tra i livelli di composti fenolici (Zuluaga et al, 2015).

Precedenti indagini hanno dimostrato che il pane d'api ha una migliore biodisponibilità rispetto al polline poichè lo strato esterno denominato esina, che ha lo scopo di proteggere il gamete dall'ossidazione dalla luce e dal disseccamento, fornisce resistenza al pieno rilascio dei nutrienti ed è perciò direttamente responsabile della limitata capacità di assorbimento di quest'ultimi e delle

sostanze bioattive dal polline, ma nel pane d'api l'esina è in gran parte degradata dalla fermentazione e il contenuto di polline, funzionalmente ed energeticamente ricco, può essere assimilato e usato più facilmente.

### ***1.3 Anatomia e fisiologia dell'apparato gastroenterico dell'ape***

È oramai appurato che il microbioma presente all'interno dell'apparato gastroenterico dell'ape supporti l'insetto in ogni sua fase di vita apportandole beneficio, questo per l'ape ma anche per tutti gli animali, sotto diversi punti di vista tra cui supporto metabolico, competizione contro svariati patogeni gastroenterici ed implemento del sistema immunitario e sorprendentemente anche di quello nervoso (Zheng et al, 2017).

Per una razionale comprensione delle molteplici funzioni svolte dal microbiota dell'ape è oneroso parlare da un punto di vista anatomo-funzionale dell'apparato gastroenterico che possiedono questi insetti. L'ape a livello anatomico può essere divisa in 3 regioni principali; testa, torace ed addome.

L'apparato gastrointestinale viene a ritrovarsi nell'addome dell'animale e si divide in 4 regioni ben distinte per ruolo e condizioni fisico-chimiche. I quattro compartimenti anatomici che compongono l'apparato, partendo dal prossimale fino al distale, prendono il nome di borsa melaria, intestino medio, ileo e retto.

L'alimento transitante nell'esofago dopo aver percorso tutto il torace arriva nell'addome e sbocca nella borsa melaria o ingluvie, un notevole serbatoio dalle pareti estensibili che le api bottinatrici sfruttano come sito di stoccaggio di liquidi alimentari, continua nell'intestino medio separato dall'ingluvie da una valvola denominata valvola cardiaca la quale apertura e chiusura viene ad essere determinata dal senso di sazietà dall'insetto. Quanto l'ape ha fame la valvola si apre e permette il passaggio del nutrimento dallo stomaco all'intestino, sede principale di assorbimento, mentre quando essa deve rigurgitarne il contenuto la valvola si chiude ermeticamente al fine di evitare il riversamento del materiale intestinale all'esterno. Segue l'intestino medio separato dall'ileo dalla valvola pilorica

ed infine il retto le quali due principali funzioni sono quelle di espellere il materiale di scarto attraverso l'ano nei cosiddetti "voli di purificazione" e di assorbire elettroliti ed acqua.

Il lume intestinale, a differenza degli altri organi che compongono l'apparato, è rivestito dalla matrice peritrofica prodotta da cellule epiteliali specializzate e destinata ad avvolgere e filtrare il bolo alimentare, sottoposto all'azione degli enzimi digestivi.

La matrice peritrofica fisicamente consiste in uno spesso strato acellulare che riveste totalmente l'epitelio ed è costituita principalmente da proteine, glicoproteine, mucopolisaccaridi acidi e chitina la quale crea a livello tridimensionale una griglia ordinata di microfibrille con maglie di diametro compreso tra 4 e 10 nm atte al filtraggio delle sole molecole assimilabili ed al blocco di eventuali patogeni o xenobiotici come i pesticidi.

A livello funzionale la matrice peritrofica divide l'intestino medio nello spazio endoperitrofico ed ectoperitrofico (tra la matrice peritrofica e l'epitelio), i microrganismi sono solitamente confinati nello spazio endoperitrofico. (Tauber, 2019).

Molto diversi sono gli ambienti chimico-fisici che si vengono a ritrovare nei 4 compartimenti anatomici sopra elencati determinando indirettamente perciò la selezione di diverse e specifiche specie microbiche in grado di sfruttare al meglio queste condizioni:

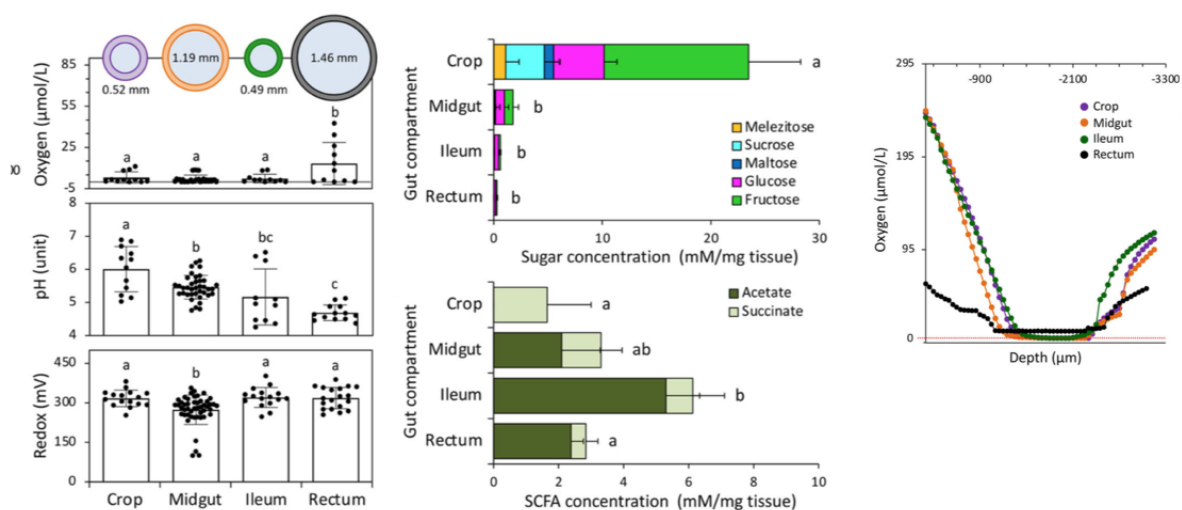


Figura 2 - Caratterizzazione fisico-chimica e metabolica dei compartimenti intestinali delle api (Callegari et al, 2021).

I due monosaccaridi glucosio e fruttosio e il disaccaride saccarosio sono gli zuccheri più comuni del nettare e del miele. Questi zuccheri semplici sono, in parte, assorbiti passivamente attraverso la parete intestinale dell'ospite. Di conseguenza, questi zuccheri sono stati rilevati principalmente nella sacca melaria in alte concentrazioni e drasticamente ridotti nell'intestino medio. Gli altri zuccheri minoritari come melezzitosio e maltosio molto probabilmente derivano da una dieta zuccherina a base di melata, molto utilizzata dalle api soprattutto in periodi in cui c'è assenza o scarsità di nettare. L'attività metabolica predominante nell'intestino delle api è la fermentazione microbica di zuccheri e carboidrati complessi (es. pectina) in acidi organici. Tutti gli zuccheri che non vengono assimilati direttamente dall'ape sono utilizzati dai componenti del microbioma con la conseguente produzione di particolari metaboliti secondari come gli SCFAs (acidi grassi a catena corta) che di fatti aumentano al diminuire degli zuccheri lungo l'apparato gastroenterico. In particolare, è stata osservata una riduzione del fruttosio da  $13,32 \pm 4,8$  a  $0,1 \pm 0,06$  mM/mg di tessuto nella sacca melaria e nel retto, rispettivamente e glucosio da concentrazioni da  $4,7 \pm 1,2$  a  $0,2 \pm 0,08$  mM/mg di tessuto, nonché nel consumo totale di saccarosio, melezzitosio e maltosio dall'ingluvie all'ileo.

Tra tutti i vari zuccheri sembrerebbe il saccarosio avere un ruolo determinante nella compartimentalizzazione del microbioma nei vari settori dell'apparato. È stato visto come alte concentrazioni di saccarosio siano correlate negativamente con i generi batterici del genere *Bifidobacterium sp.*, *Frischella sp.* e *Snodgrassella sp.* i quali vengono ad essere ritrovati nella parte distale dell'apparato (ileo e retto) e positivamente invece con *Lactobacillus firmucutes-5* che è invece in grado di metabolizzare perfettamente il fruttosio derivante dal disaccaride in questione. Seguendo questo trend anche le specie fungine sono correlate positivamente alla presenza di saccarosio tranne il genere *Hanseniaspora sp.* il quale è stato osservato in alte concentrazioni nel retto, sito dove il saccarosio è quasi assente. Tra gli SCFAs prodotti sembrerebbe che la presenza di acido acetico sia correlata negativamente con la popolazione fungina (Callegar et al, 2021).

#### ***1.4 Microbioma gastroenterico dell'ape***

L'ape essendo un insetto sociale e vivendo in grandi comunità poliennali a contatto diretto con un ecosistema sempre dinamico ha sviluppato ed evoluto nel tempo un forte e massiccio microbioma a livello gastroenterico che supporta l'insetto in ogni suo stadio di sviluppo.

Il microbioma dell'ape è responsabile di molteplici funzioni riconducibili a quelle attribuite al microbioma intestinale umano; esso infatti grazie al ventaglio di pathway metabolici di cui dispongono i componenti microbici che lo compongono interviene positivamente in maniera diretta ed indiretta nel metabolismo energetico da un lato assumendo un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi degli zuccheri e dei lipidi mediandone la loro assimilazione a livello di cellule epiteliali intestinali e dall'altro modulando invece il senso di sazietà nell'animale, si occupa inoltre di produrre metaboliti secondari fondamentali per l'ape come vitamine e acidi grassi a corta catena variando conseguentemente le condizioni chimico fisiche del compartimento in cui opera, ne stimola il sistema immunitario e previene mediante competizione diretta l'instaurarsi di patologie a livello gastroenterico come ad esempio la nosemiasi sostenuta dal fungo unicellulare *Nosema Apis* (El Khoury et al, 2018).

Molti ricercatori nell'ultimo decennio prendendo sempre più consapevolezza del fondamentale ruolo del microbioma gastrointestinale sulla salute dell'ape hanno indagato sui componenti microbici che lo compongono e di conseguenza una grande mole di informazioni a riguardo si sono riversate nella comunità scientifica fino ad arrivare alla completa approvazione dell'esistenza, almeno nell'*A. mellifera*, di un "core gut microbioma", un gruppo composto da cinque consistenti, ubiquitari ed abbondanti phyla batterici che sempre sono presenti all'interno dell'apparato.

Tali phyla sono rappresentati dal beta proteobacterium *Snodgrassella alvi* appartenente alla famiglia Neisseriaceae, non in grado di fermentare zuccheri ma assume un ruolo cruciale nella formazione del biofilm a livello delle pareti intestinali, il gamma proteobatterio *Gilliamella apicola* appartenente alla famiglia delle Orbaceae in grado di fermentare zuccheri, due lattobacilli quali *Lactobacillus firm-4*, *Lactobacillus firm-5* e l'actinobacterium *Bifidobacterium asteroides*. Sono inoltre presenti, anche se



in concentrazioni molto più basse ed in relazione all'ambiente quattro membri rari che da alcuni autori vengono inclusi all'interno del core gut microbioma rappresentati da i proteobatteri *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Bombella apis*, *Commensalibacter* e *Apibacter*.

Insieme, perciò, il core gut microbioma ed i quattro membri rari rappresentano i principali membri batterici del microbioma intestinale stabile delle api (95-99%) mentre il restante 4-1% è invece rappresentato da un microbioma transitorio derivante dall'ambiente che non riesce a stabilire un rapporto stabile con l'ospite e per tale ragione si viene a ritrovare solo momentaneamente nell'apparato con una maggior concentrazione a livello della borsa melaria, primo organo che di fatti i microrganismi presenti nel nettare ed altri substrati alimentari incontrano.

A tale riguardo uno studio condotto sul microbioma di api (*A. mellifera jemenitica* e *A. florea*) stanziata in Arabia Saudita ha confermato la presenza delle specie batteriche caratteristiche del core gut microbioma ma ha anche evidenziato come tutti gli altri batteri definiti ambientali hanno mostrato una composizione tassonomica notevolmente diversa rispetto a quella delle api italiane.

L'esistenza di un core gut microbioma strutturato come appena descritto è stata confermata anche da uno studio di Tola et al, (2020) volto alla ricerca e scoperta di quali specie microbiche colonizzassero l'apparato gastroenterico di api stanziata nell'Africa subsahariana e se quest'ultimo rimaneva invariato o subiva modifiche in base sia alle diverse condizioni ambientali sia alle diverse tecniche di apicoltura che prevedono ancora metodi poco invasivi a differenza di quelli adottati nell'odierna apicoltura Europea.

In base a studi di ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) ed esperimenti di qPCR sono state osservate le singole componenti microbiche che cooperano insieme all'interno di ogni compartimento anatomico dell'apparato gastroenterico in base alle loro esigenze ed alle caratteristiche fisico chimiche della nicchia che hanno colonizzato.

Partendo dalla borsa melaria sono stati pochi i batteri che sono riusciti a ritrovare in questa nicchia ecologica un habitat stabile limitando la varietà del microbioma ad alcuni membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* come *Lactobacillus kunkeey* e *Parasaccharibacter apium* ritrovati anche nel

nettare ed in diverse zone dell'alveare, una così limitata colonizzazione potrebbe essere ascrivibile alle alte concentrazioni zuccherine che si vengono a ritrovare continuamente nell'organo.

Poche specie batteriche ed in piccola concentrazione sono state ritrovate anche nell'intestino medio, sede principale della digestione ed assorbimento dei nutrienti, in quanto in quest'organo il continuo rinnovamento della matrice peritrofica non fornisce probabilmente un substrato stabile da poter colonizzare se non in specifiche zone come quella adiacente al piloro che viene ad essere invece abbondantemente invase ed abitata da *F. perrara*.

È stato osservato che *F. perrara* stimola da parte dell'organismo la melanizzazione della regione posteriore del piloro localizzata a 0.5 mm dallo sbocco dei tubuli malpighiani ed in prossimità dell'ileo portando a delle "croste" che possono variare dal giallo al nero. Negli insetti, la melanizzazione è coinvolta nell'ispessimento della cuticola e svolge un ruolo importante nella risposta immunitaria innata tuttavia ancora non è chiaro se la presenza di *F. perrara* sia effettivamente positiva oppure si tratta di un patogeno che si sta potenzialmente evolvendo in un commensale o un mutualista, non essendo esso trovato nell'apparato gastroenterico dei bombi che invece è regolarmente colonizzato da *G. apicola* e *S. alvi* (Engel et al, 2015).

Al contrario, l'intestino posteriore diviso in due regioni distinte, l'ileo e il retto è rivestito da uno strato stabile di cuticola che permette la colonizzazione di moltissime specie microbiche, diverse in base alla regione che si sta analizzando, ma che in generale sono comprese tra  $10^8$  e  $10^9$  UFC che rappresentano una percentuale maggiore al 99% dei batteri nelle api operaie adulte, sulla base del profilo del rDNA 16S.

*G. apicola* viene a ritrovarsi nel lume dell'ileo, il quale ha un rapporto superficie:volume di  $6.700 \text{ m}^2/\text{m}^3$  molto più grande di quello dell'intestino umano o del ruminante bovino, ed è coinvolta nella fermentazione dello zucchero mentre *S. alvi*, localizzato nelle pieghe longitudinali che forma l'epitelio in questa regione è un batterio aerobio obbligato non fermentante in grado di svolgere l'ossidazione aerobica dei carbossilati come l'acetato e conseguentemente creare regioni di anossia fondamentali per il metabolismo di altri simbionti intestinali, i carbossilati molto probabilmente sono generati dal

metabolismo di *G. apicola* stessa. Questo uso complementare di risorse da parte di diversi membri batterici consente loro di occupare la stessa nicchia ecologica e potrebbe essere il risultato di una coevoluzione di lunga data. I lattobacilli Firm 4 e Firm 5 risiedono nel retto insieme al *B. asteroides* dove è stato dimostrato che insieme digeriscono complessi composti aromatici del polline e fermentano gli zuccheri derivati in acidi organici.

All'interno dell'apparato gastroenterico dell'ape non risiedono soltanto batteri ma, come in altre specie di insetto (Dowd et al, 2005), c'è una controparte eucariotica il più delle volte rappresentata da specie lievitiformenti ovvero funghi la cui forma morfologica primaria è una forma cellulare unicellulare che si divide per gemmazione o fissione (Knop, 2011).

Questa presenza senza dubbio è ascrivibile all'enorme diffusione dei lieviti in natura infatti essi sono praticamente ubiquitari, isolati da suolo, aria, superfici vegetali, animali e cibi conservati con predilezione di substrati altamente zuccherini come il nettare dei fiori ed i succhi di frutta (Sandhu, 1985).

La porzione eucariotica del microbioma dell'ape denominata micobioma, anche se presente in minor misura rispetto alla porzione batterica presenta lo stesso trend di colonizzazione, con un progressivo incremento partendo dalla borsa melaria fino ad arrivare al retto con  $4.9 \times 10^2$ ,  $5.8 \times 10^2$ ,  $1.7 \times 10^3$  e  $2.9 \times 10^3$  UFC rispettivamente nella borsa melaria, nell'intestino medio, nell'ileo e nel retto.

Lo studio di Callegari et al, (2021) effettuato su 3 diverse sottospecie di api (*A. mellifera ligustica*, *A. mellifera jemenitica* e *Apis florea*) site in altrettante località hanno mostrato come il genere più abbondante è rappresentato da *Starmerella sp.* (31%) seguito da *Hanseniaspora sp.* (12%), *Aspergillus sp.* e *Naganisha sp.* (entrambi 11%), i generi *Aureobasidium sp.*, *Moniniella sp.*, *Candida sp.* e *Penicillium sp.* sono stati ritrovati in più basse percentuali.

I lieviti del genere *Starmerella sp.* sono i più frequenti associati agli apidi, tanto che alcune specie sono state scoperte proprio a seguito dello studio delle api. Alcune specie di *Starmerella sp.* sembrano essere specificatamente associate ad alcuni tipi di api, ad esempio *Starmerella meliponinorum* principalmente con *Tetragonista angustula*, il complesso di specie *Starmerella apicola* con *Melipona*

*quadrifasciata* e *Melipona rufiventris*, e *Starmerella batistae* con *Diadasina distinctia* e *Ptilotrix plumat* (Detry et al, 2020).

Da un punto di vista metabolico, i membri del genere *Starmerella sp.* sono nutrizionalmente specializzati, utilizzando solo un piccolo numero di fonti di carboidrati e azoto.

È noto che diverse specie di *Starmerella sp.* producono in quantità significative una particolare molecola anfifilica denominata soforolipide. La sua produzione è ceppo-specifica e dipende dalle condizioni ambientali in cui il lievito si viene a trovare (De Clercq et al, 2021).

I soforolipidi assumono diversi ruoli a favore delle *Starmerelle sp.* quali fungere da materiale di stoccaggio extracellulare di carbonio da utilizzare quando le condizioni nutritive esterne iniziano ad essere sfavorevoli, come adattamento all'elevata pressione osmotica causata da alte concentrazioni di zucchero, come molecola che migliora l'uptake di sostanze idrofobiche e come agente antimicrobico al fine di vincere eventuali competizioni microbiche per lo stesso substrato nutritivo.

Il genere *Metschnikowia sp.* è stato rilevato, a seguito di un sequenziamento ad alto rendimento, come uno dei generi fungini in grado di produrre proteasi acide più comuni nell'apparato gastroenterico delle api (Kakumanu. 2016).

La presenza di lieviti nelle api è confermata anche dallo studio del 1985 di Sandhu et al, (1985) effettuato su stomaci di api mellifere stanziate in India i quali risultati hanno sottolineato la grande presenza di diverse specie del genere *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Clavispora sp.*, *Lindnera sp.* e *brettanomyces sp.*

È molto importante sottolineare che il microbioma convivendo in simbiosi con l'ape subisce indirettamente tutti i cambiamenti metabolici e fisici a cui essa va in contro durante l'arco della sua vita. Partendo dall'analisi complessiva del microbioma dell'ape appena emersa pre e post 12 h di vita passando per lo studio dell'ape nutrice fino ad arrivare alla bottinatrice è stato osservato come sia la componente batterica che fungina cambia in base ai diversi ruoli che essa assume all'interno della colonia.

Per quanto riguarda la porzione batterica sono stati complessivamente rilevati i 9 componenti del core gut microbioma ma analizzando poi ogni singolo ruolo sono stati osservati diversi quadri microbiologici specifici. Solo nell'ape nutrice e in quella bottinatrice si sono ritrovati tutti e nove i componenti del core gut microbioma.

I batteri intestinali transitori erano più abbondanti nell'ape bottinatrice che nell'ape nutrice, suggerendo che l'attività di foraggiamento consente all'ape bottinatrice di ingerire i diversi microrganismo essendo essa a contatto con un ambiente tutt'altro che sterile.

In totale, sono stati identificati cinque phylum fungini all'interno dell'intestino delle api. Lieviti appartenenti al phylum *Ascomycota* (93,28% delle sequenze classificate) e *Basidiomycota* (5,89%) sono stati rilevati come phylum dominanti, seguiti da *Glomeromycota* (0,24%), *Chytridiomycota* (0,20%) e *Zygomycota* (0,05%) e 373 sequenze fungine (0,35%) non classificate. Per quanto riguarda la composizione fungina, la maggior parte delle singole api è stata dominata a livello di phylum da *Ascomycota*. Altri phyla (cioè *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Glomeromycota*) sono apparsi allo stadio di ape bottinatrice sottolineando anche qui una forte relazione ambiente-ape.

A livello di genere, l'ape appena emersa, l'ape di 12 ore e l'ape nutrice erano dominate da lieviti del genere *Saccharomyces sp.*, con proporzioni rispettivamente di  $99,53 \pm 0,31\%$ ,  $69,93 \pm 11,05\%$  e  $97,06 \pm 1,00\%$ . D'altra parte, l'intestino delle api bottinatrici aveva un basso rapporto di composizione di *Saccharomyces sp.* ( $2,18 \pm 0,88\%$ ) e comprendeva più phylum fungini. L'abbondanza relativa di *Basidiomycota sp.* come *Coprinopsis sp.*, *Schizopora sp.* e *Agaricales sp.* non classificati e *Pleosporales* non classificati appartenenti ad *Ascomycota sp.* era significativamente più alta nelle api bottinatrici che nelle api nutrice. L'abbondanza relativa di *Cystofilobasidium sp.* era significativamente più alta nelle api nutrici che nelle api foraggiate e c'era una differenza significativa in *Yarrowia sp.* nelle api di 12 ore rispetto ad altri gruppi di api.

Per quanto riguarda le rispettive porzioni procariotiche ed eucariotiche in base allo stato sociale dell'ape ed è stato osservato che il rapporto batteri/funghi aumenta all'aumentare dei giorni di vita dell'ape.

I batteri seguono un trend di crescita esplosivo passando da  $10^6$  UFC nelle api appena emerse a  $10^9$  UFC in quelle bottinatrici mentre per quanto riguarda i funghi essi non vedono un loro aumento progressivo rimanendo sempre sotto alle  $10^6$  UFC nelle diverse classi sociali tranne che nelle api nutrici dove invece c'è un leggero aumento arrivando a  $10^7$  UFC per ape. È stato poi osservato che alcuni phyla batterici erano correlati con le popolazioni specifiche di lieviti intestinali di fatti *Saccharomyces sp.* era correlato negativamente sia con *L. kunkeei* che con *L. Firm-5* nelle api appena emerse. *Saccharomyces sp.* era correlato negativamente solo con *L. kunkeei* nelle api di 12 ore. *Saccharomyces sp.* era correlato negativamente con Firm-5 e positivamente correlato con *L. kunkeei* nelle api bottinatrici. Tuttavia, *Saccharomyces sp.* era correlato positivamente con entrambe le specie di *Lactobacillus* nelle api nutrici. Le relazioni tra *Lactobacillus Firm-5* e *Saccharomyces sp.*, e tra *Snodgrassella sp.* e *Saccharomyces sp.*, erano inversamente correlate nelle api nutrice e nelle bottinatrici. Pertanto, probabilmente il passaggio dello stato sociale dell'ape nutrice a quella bottinatrice non solo altera la struttura microbica intestinale, ma cambia anche la relazione tra i membri del microbiota intestinale.

Altro cambiamento del microbioma intestinale si ha nella transizione dell'intera comunità da estate ad inverno passando per l'autunno e la primavera. Le api durante l'inverno vanno in uno stato di riposo metabolico al fine di consumare il minor quantitativo di scorte possibili ma contemporaneamente utilizzarle al massimo. L'alimentazione in inverno è prevalentemente di tipo zuccherino basata cioè sul miele che durante l'estate sono riuscite ad immagazzinare all'interno dei favi.

Ludvigsen et al (2021) hanno analizzato il microbioma complessivo nelle quattro differenti regioni anatomiche dell'apparato gastroenterico dal mese di marzo fino a novembre escludendo nell'analisi il mese di maggio. I risultati mostrano come generalmente la componente batterica sovrasta in ogni mese la componente fungina in tutte e quattro le regioni anatomiche e che, a differenza della popolazione batterica, l'abbondanza dei funghi nell'intestino medio e nell'ileo è stata sostanzialmente influenzata dalla stagionalità osservando dei picchi nel mese di giugno e luglio mentre nel retto ha

mostrato un andamento diverso, con una sua maggior densità nei mesi di marzo e aprile. I batteri presenti all'interno di ogni singolo segmento non variano al variare delle stagioni confermando ancora una volta la presenza del core gut microbioma e la sua importanza nel mantenere l'ape in salute.

Per quanto riguarda invece la diversità funginea essa segue un trend positivo da marzo a luglio nell'intestino medio, nell'ileo e nel retto molto probabilmente in concomitanza con la ripresa dell'attività lavorativa. Nella borsa melaria tale trend è meno marcato ma comunque presente (Ludvigsen, J., 2021).

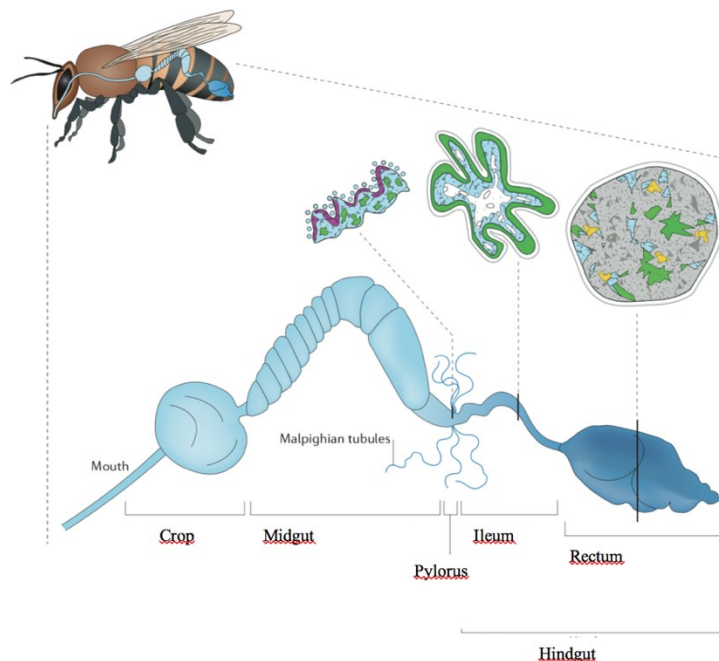


Figura 3 – Rappresentazione grafica dell'apparato gastroenterico dell'ape suddiviso nelle varie regioni anatomo-funzionali.

### ***1.5 Ruolo del microbioma gastroenterico dell'ape***

Il microbioma gastroenterico e soprattutto la sua composizione incide profondamente sulla salute dell'ospite in cui si trova e ciò è largamente dimostrato per quanto riguarda quello residente nell'intestino umano. I ruoli svolti dal microbioma umano includono la fermentazione di componenti alimentari indigeribili in metaboliti riassorbibili, la sintesi di vitamine essenziali, la rimozione dei composti tossici, il superamento dei patogeni, il rafforzamento della barriera intestinale e la stimolazione e regolazione del sistema immunitario (Heintz-Buschart et al, 2017).

Tali funzionalità potrebbero senza dubbio essere traslate al microbioma di qualsiasi organismo tra cui quello dell'ape, svariati studi che si sono concentrati sull'indagine di come il microbioma dell'ape interagisce con essa hanno mostrato risultati simili a quelli ottenuti studiando il microbioma umano traendo perciò la conclusione che anche se ovviamente i singoli componenti microbici sono rappresentati da specie diverse selezionate diversamente dal diverso ambiente gastroenterico e dalla diversa alimentazione sostenuta dall'ospite le funzioni generali di un corretto e bilanciato microbioma vanno tutte verso la stessa direzione: mantenere in salute l'ospite mediante l'instaurazione di un mutualismo con esso.

Sono molto forti le prove che le api acquisiscano il microbiota dall'ambiente circostante nel momento della loro nascita attraverso ad esempio la masticazione del cappuccio di cera che opercola la celletta e che esso venga poi ad essere stabilizzato ulteriormente mediante il contatto e l'alimentazione da parte delle api nutrici, che come visto precedentemente possiedono all'interno del proprio apparato gastroenterico tutte le componenti del core gut microbioma (Waldan et al, 2016).

Come prova dell'impatto benefico che il microbiota gastroenterico esercita sulla salute *A. mellifera* sono stati messi a paragone da Zheong et al, (2017) due gruppi di individui appartenenti allo stesso alveare ma cresciuti uno in sterilità e l'altro invece nutrendosi con cibo sterile addizionato all'omogenato dell'apparato gastroenterico delle api nutrici.

È stato osservato che il metabolismo microbico riduce notevolmente il pH intestinale e il potenziale redox attraverso la produzione di acidi grassi a catena corta quali succinato, acetato e butirato e che i batteri adiacenti alla parete intestinale formano un gradiente di ossigeno all'interno dell'intestino. Inoltre, le analisi metabolomiche hanno rivelato che la comunità intestinale ha impatti sorprendenti sui profili metabolici dei compartimenti intestinali e dell'emolinfa, suggerendo che i batteri intestinali abbiano le potenzialità per degradare i polimeri vegetali del polline e che i metaboliti risultanti contribuiscono alla nutrizione dell'ospite. Il metabolismo microbico associato ad un equilibrato microbioma influenza positivamente la crescita delle api, la segnalazione ormonale, il comportamento, le condizioni fisico-chimiche dell'intestino e la produzione di acidi grassi a corta



catena. Gli SCFAs fungono da importanti composti neuroattivi in grado di stimolare le vie neuronali ed immunitarie, determinare l'abbassamento del Ph dell'ileo ed è stato dimostrato che il butirrato funge anche da principale fonte di energia per i colonociti (Zheng et al, 2017).

Per quanto riguarda il ruolo del microbioma relazionato allo stato sociale dell'ape esso subisce delle modificazioni dinamiche al fine di prevenire qualsiasi tipo di competizione di risorse con l'ospite. È stato infatti osservato come nelle api bottinatrici, le quali hanno una dieta prettamente a base di carboidrati e povera invece di proteine, sono stati ritrovati cluster genici microbici del metabolismo degli amminoacidi ed una maggior concentrazione di *Snodgrassella sp.* il quale possiede un'intricata rete di vie biosintetiche che portano alla produzione di ben 21 amminoacidi proteinogenici e vitamine fornendoli perciò all'ape che in questa fase della sua vita ne è carente, aumenta seppur di poco rispetto alle api nutrici anche la concentrazione di *B. apis* la quale ottiene anch'essa energia e carbonio dal catabolismo degli amminoacidi piuttosto che degli zuccheri. Situazione opposta è osservata invece nelle api nutrici che seguendo invece una dieta ricca di proteine e povera di zuccheri si ritrovano a convivere con un microbioma che in questo caso è modellato al fine di non consumare lui stesso gli amminoacidi necessari all'ospite. Si è osservato in questa classe sociale un aumento di Firm-5 che possiede effettivamente vie biosintetiche solo per tre amminoacidi e presenza di numerosi cluster genici del metabolismo dei carboidrati quali fruttosio e mannosio, amido, saccarosio e dei lipidi.

Anche se alcuni studi hanno messo in relazione un aumento di lieviti a livello gastroenterico con il dismicrobismo generato dall'infezione del microsporidio *Nosema ceranae* altri ne sottolineano invece l'importanza per il corretto mantenimento della salute dell'intera comunità (Tauber et al, 2019).

La presenza di lieviti associati agli insetti, come *Saccharomyces sp.* e *Candida sp.*, svolgono un ruolo nella digestione dei substrati da parte di enzimi secreti come  $\beta$ -glucosidasi, xilasi e cellulasi e nella disintossicazione dei metaboliti vegetali tossici nell'ospite (Yun et al, 2018).

Uno studio in particolare ha riportato una competizione per substrati zuccherini tra *Saccharomyces cerevisiae* e le specie tipiche del genere *Lactobacillus sp.* presenti nell'apparato gastroenterico

dell'ape. La crescita e il metabolismo del lievito sono inibiti da prodotti batterici acidi, che inducono la flocculazione del lievito (Santos et al, 1993).

L'analisi di correlazione ha rivelato tuttavia una correlazione positiva tra *Saccharomyces sp.* e *Lactobacillus Firm-5* nell'intestino dell'ape nutrice. L'elevata abbondanza relativa di lieviti *Saccharomyces* e *Lactobacillus Firm-5* e l'elevata densità fungina nell'intestino dell'ape nutrice hanno suggerito che la relazione negativa tra *Saccharomyces sp.* e *Lactobacillus Firm-5* potrebbe essere rallentata dall'interazione tra l'ospite e/o altri microbi intestinali in questo particolare ambiente con le specie lievitiformenti. L'ape nutrice ingerisce il pane d'api per sintetizzare la pappa reale, suggerendo che *Saccharomyces sp.* ed altri generi di lievito, effettivamente trovato in alte concentrazioni in questa classe sociale, può fornire un corredo enzimatico per la degradazione del polline o aiutare nella maturazione della pappa reale.

Un'altra spiegazione potrebbe essere data dal fatto che i metaboliti acidi prodotti dai batteri del genere *Lactobacillus sp.* sono utilizzati dall'ospite e da altri componenti del microbioma intestinale prevenendo la flocculazione del lievito.

Sebbene i processi metabolici generalisti, come la respirazione, il potenziale metabolico e la resa cellulare siano eseguiti da filotipi dominanti, funzioni più specializzate, come la degradazione di composti specifici, possono essere svolte da filotipi di nicchia e scarsamente abbondanti.

È stato riscontrato un metabolismo attivo anche da parte di batteri transitori in grado di apportare comunque beneficio all'ape, anche se momentaneamente, mediante svariate azioni quali biosintesi di metaboliti secondari come AMPs, biodegradazione xenobiotica, biosintesi e degradazione di glicani, metabolismo di carboidrati, amminoacidi e lipidi ed infine biosintesi di cofattori e vitamine.

*Hanseniaspora sp.* e *Starmerella sp.* sono lieviti fermentanti, sulla base della loro tassonomia e delle informazioni metaboliche disponibili in letteratura, possono avere un ruolo nella digestione degli alimenti e favorire l'interazione trofica e spaziale tra i microrganismi intestinali. La loro presenza è giustificata dalla nicchia favorevole che l'intestino delle api fornisce a tali microrganismi zuccherofementativi.

La frequente associazione tra lieviti e l'intestino dell'ape suggerisce che, come in altri insetti (Dwdp et al, 2005) sono importanti nell'omeostasi dell'ospite, nella fisiologia e nello sviluppo e che forse forniscono un supporto nutrizionale essenziale, inclusi enzimi, aminoacidi essenziali, vitamine e steroli. I lieviti beneficiano invece dell'ambiente protetto dell'intestino e di un servizio di dispersione fornito dall'insetto ospite.

Immagini al TEM hanno mostrato che le cellule fungine erano costantemente circondate da batteri andando a supporre che questo contatto fisico potrebbe celare interazioni trofiche e spaziali tra di loro (intragruppo) così come quella presente tra i componenti batterici core e non core.

Le cellule fungine inoltre in virtù delle loro grandi dimensioni possono modellare le interazioni spaziali e il flusso metabolico all'interno della comunità microbica intestinale progettando l'architettura dell'intestino e influenzando la geometria delle interazioni tra i componenti batterici: i batteri potrebbe sfruttare le superfici messe a disposizione dalle cellule fungine per stabilire interazioni ecologiche tra loro.

### ***1.6 Cambiamenti della composizione del microbioma gastroenterico dell'ape a seguito di fattori abiotici e biotici***

I fattori che nell'insieme portano ad un cambiamento climatico sono l'aumento delle concentrazioni atmosferiche di CO<sub>2</sub>, il riscaldamento globale ad esso associato ed i regimi di precipitazione alterati. Non si è ancora indagato su come il cambiamento climatico potrebbe alterare il microbioma dell'ape tuttavia molti studi hanno osservato come il naturale microbioma del suolo composto da popolazioni batteriche e fungine risenta di quest'ultimo. Ad esempio, è stato osservato un rapporto inferiore tra biomassa fungina e batterica nei suoli di brughiera artica a seguito dell'aumento delle temperature e dei cambiamenti nella composizione relativa di tali gruppi in base ad un diverso regime di precipitazione (Rinnan et al, 2006) e (Hector et al, 2010). Un'altra minaccia per l'ape e per l'ecosistema è senza dubbio l'uso e relativo abuso di antibiotici in apicoltura. È altamente sconsigliato fare uso di questi prodotti in quanto potrebbero ritrovarsi in tracce nel miele con conseguenze dirette

per l'uomo ma anche essere escrete a seguito di metabolizzazione nell'ambiente apportando un ulteriore fattore in grado di determinare lo squilibrio del microbioma ambientale e con lui quello di molti organismi che giornalmente ne vengono a contatto. È stato osservato come la perturbazione del microbiota intestinale dell'ape a seguito dell'esposizione ad antibiotici quali la tetraciclina porta a una maggiore mortalità all'interno degli alveari ed a una maggiore suscettibilità a patogeni come *Serratia marcescens*, suggerendo un ruolo cruciale di un sano microbioma nella salute delle api (Raymann et al, 2017).

I pesticidi utilizzati in agricoltura sono nocivi per le api possedendo quest'ultime target molecolari come il recettore nAChRs (Nicotinic acetylcholine receptors) affini a molti principi attivi di pesticidi tutt'ora in commercio (Jones et al, 2006). Tuttavia, oltre al danno diretto che essi infliggono all'ape si è visto che possono causarne una sub-letalità mediante l'alterazione della comunità microbica intestinale con diverse conseguenze tra cui una diminuzione della propria capacità funzionale di metabolizzare zuccheri e di contrastare agenti patogeni; nello specifico è stato osservato come api alimentate con polline contenente clorotalonil, noto fungicida, erano tre volte più suscettibili all'infezione da Nosema (Kakumanu M.L. 2016).

### ***1.7 Fermentazione eterolattica nel passaggio da polline a pane d'api***

Un altro ruolo fondamentale che riveste la popolazione lievitiforme all'interno della vita dell'ape è la trasformazione biochimica del polline in pane d'api, fonte di proteine e vitamine nella dieta dell'insetto e fondamentale alimento somministrato alle larve dalle api nutrici per il loro corretto sviluppo.

Il polline, che costituisce la materia fecondante dei fiori, si presenta come una polvere fine e appiccicosa perfetta per rimanere adesa alla peluria delle api bottinatrici le quali una volta essersi imbrattate tutte lo impastano con secrezioni salivari (contenenti anche parte del contenuto dalla borsa melaria) al fine di generare delle palline di un diametro tale da poter essere caricate in specifiche

modificazioni anatomiche delle zampe posteriori denominate cestelle del polline o corbicole per trasportarlo in sicurezza all'alveare.

Una volta arriva alla colonia la bottinatrice impacca il prezioso materiale all'interno delle cellette nei favi per essere ulteriormente lavorato dalle operaie le quali rigurgiteranno altro materiale rappresentato da miele, microrganismi ed enzimi derivante dalla propria borsa melaria sul polline.

Da questo momento parte la fermentazione eterolattica che durerà circa 7 giorni e porterà alla produzione di un materiale biochimicamente diverso dal polline denominato pane d'api.

Le componenti chimiche del polline variano in base al fiore da cui esso deriva ma generalmente è composto dal 22% di amido, 20% di lipidi, quantità considerevoli di vitamine idrosolubili e generalmente meno del 20% di acqua mentre il pane d'api è caratterizzato dalla presenza soltanto in tracce di amido, un basso pH tra i 4.7 e 4, alte concentrazioni di amminoacidi liberi, una maggior concentrazione di zuccheri riducenti ed un incremento notevole di vitamina K.

Il processo di fermentazione è diviso in 4 fasi:

1°: ha una durata di 12 ore circa ed è caratterizzata dallo sviluppo di un gruppo eterogeneo di lieviti e batteri;

2°: i lieviti producono fattori di crescita utilizzati da batteri lattici anaerobi (*Streptococcus sp.*) che a loro volta determinano mediante la produzione di acido lattico un abbassamento del pH;

3°: scomparsa degli streptococchi e comparsa di lattobacilli con conseguente maggiore produzione di acido lattico (fermentazione eterolattica);

4°: inizia al settimo giorno ed è caratterizzata dalla scomparsa dei lattobacilli e di alcuni lieviti per la grande quantità di acido lattico prodotto.

Alla fine del settimo giorno il pane d'api formatosi è diventato microbiologicamente stabile in virtù del basso pH (Gilliam et al, 1979). I lieviti nelle fasi iniziali della fermentazione sono presenti in basso numero, aumentano durante il processo e rimangono stabili nel pane d'api maturo.

Detry et al, (2020) mediante un'analisi comparativa di più substrati quali polline fresco, pane d'api e apparato gastroenterico delle operaie hanno indagato su chi possono essere i lieviti che intervengono

nel processo fermentativo ed i risultati hanno mostrato che sono principalmente *Debaryomyces sp.*, *Metschnikowia sp.*, *Starmerella sp.* e *Zygosaccharomyces sp.* i 4 generi che più caratterizzano l'habitat del pane d'api. Essi sono presenti in diversa concentrazione in base alla freschezza del prodotto vedendo un cambio drastico tra pane d'api fresco (<7 giorni) e pane d'api invecchiato il quale è caratterizzato da altissime concentrazioni di *Zygosaccharomyces sp.* che invece si ritrova solo in tracce nel pane d'api fresco. Gli stessi generi sono stati poi ritrovati anche nel polline fresco raccolto dalle corbicole delle bottinatrici e dall'apparato gastroenterico dell'ape.

Prendendo da riferimento i quattro generi di lievito maggioritari sono state osservate le UFC per mg di pane d'api a diverso stadio di maturazione ed è stato visto che dal 1° giorno al 4° sono generalmente molto attivi e presenti mentre iniziano a scarseggiare dal 5° al 7° giorno.

Il genere *Starmerella sp.* è stato il più isolato sia nel polline sia nel pane d'api in quanto si pensa che possa sfruttare il liquido viscoso ricco di lipidi e idrocarburi denominato pollenkitt presente sulla superficie del polline mediante la produzione di soforolipi che in virtù delle loro caratteristiche anfifiliche potrebbero determinare l'interazione selettiva delle diverse specie di *Starmerella sp.* con tale film adesivo (Detry et al, 2020).

Per confermare la presenza dei lieviti come microrganismi necessari all'interno del processo di trasformazione del polline in pane d'api alcuni ricercatori hanno seminato su polline sterile diverse specie di batteri appartenenti al genere *Lactobacillus sp.* ed hanno concluso che una fermentazione omolattica non è sufficiente per la creazione di un fermentato appetitoso e di ottimo valore nutritivo per le api perciò è necessario un armonico processo di maturazione del polline attraverso diversi protagonisti microbici sia batterici che fungini.

## CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO

La presente ricerca parte dalla mia passione per il mondo naturale visto sotto ogni punto di vista a partire dalla più piccola formica che trasporta faticosamente il cibo al proprio formicaio al ruggito del leone più maestoso della Savana e dal mio desiderio, come essere umano, di preservarlo il più possibile. L'ape è un insetto a mio parere speciale in quanto grazie alla sua invidiabile organizzazione sociale ed alla sua instancabile operosità è in grado, pur essendo di fatti un piccolo insetto, di sostenere l'intero pianeta terra grazie al suo lavoro di impollinazione donando a tutti gli esseri viventi un respiro di aria fresca ad ogni suo sbattere di ali.

A questo proposito la mia tesi si è concentrata sullo studio del microbioma dell'*A. mellifera* sottospecie ligustica in quanto ora più che mai essa ha bisogno di aiuto che potrebbe essere celato dietro uno studio accurato del mondo naturale in cui essa vive. I substrati analizzati microbiologicamente sono stati rispettivamente fiori, polline, pane d'api, propoli e l'apparato gastroenterico dell'ape stessa.

A tal fine è stata effettuata una mappatura ecologica nel tempo per comprendere le interazioni che l'insetto instaura in prima istanza con l'ambiente in cui vive e come, in base alle esigenze specifiche della colonia, la popolazione lieviti-forme ambientale è riuscita ad insidiarsi nella vita quotidiana all'interno dell'alveare e per quali motivazioni. Alla luce dei dati ottenuti è stato poi cercato di elucidare l'eventuale presenza di un microbioma stabile all'interno dell'apparato gastroenterico dell'ape in grado di sostenerla come la sostiene il già conosciuto *core gut microbioma* batterico.

## CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

### 3.1 Terreni di coltura e tamponi

I terreni di coltura di seguito descritti sono stati utilizzati per eseguire le conte vitali su piastra per l'isolamento dei lieviti che provenivano dalle varie matrici. In particolare, sono stati utilizzati WL YMA e RB in forma agarizzata i quali hanno permesso la visualizzazione delle diverse specie provenienti da fiori, apparato gastroenterico dell'ape e prodotti dell'alveare.

I terreni utilizzati per gli isolamenti e le conte sono stati:

1) WL Nutrient Agar (Oxoid) 80 gr/L

Estratto di lievito 4g/

Triptone 5g/L

Glucosio 50 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.55 g/L

KCL 0.425 g/L

CaCl<sub>2</sub> 0.125 g/L

MgSO<sub>4</sub> 0.125 g/L

FeCl<sub>3</sub> 0.0025 g/L

MnSO<sub>4</sub> 0.0025 g/L

Verde di Bromocresolo 0.022 g/L

Agar 15 g/L

2) YMA (yeast mannitol agar)

Estratto di lieviti 3 g/L

Estratto di malto 3g/L

Peptone 5g/L

Glucosio 10g/L

Agar 18g/L

Il WL agar è un terreno differenziale che permette di effettuare una prima identificazione a livello morfologico delle colonie presenti all'interno del campione.

Si aggiunge 1 µL di cloranfenicolo al 5% per 100 mL di terreno al fine di eliminare la crescita batterica ed ottenere una selezione delle sole specie fungine all'interno del campione.



Si aggiunge 1mL di bifenile al 2% per 100 mL di terreno al fine di rallentare la crescita delle muffe ed ottenere perciò la selezione ed il successivo isolamento dei soli lieviti nel campione.

Il terreno YMA (Yeast Mannitol Agar) è un terreno minimo selettivo utilizzato per l'isolamento dei lieviti.

### 3) Rose Bengala Chloramphenicol Agar

Peptone micologico 5.00 g/l

Potassio fosfato bibasico 1.00 g/l

Magnesio solfato 0.50 g/l

Glucosio 10.00 g/l

Rosa bengala 0.05 g/l

Agar 15.00 g/l

Cloramfenicolo 0.10 g/l

### 4) YPD Agar (yeast peptone dextrose)

Estratto di lievito 10g/L

Peptone 20 g/L

Glucosio 20 g/L

Agar 20 g/L

Il Rose Bengala Chloramphenicol Agar è un terreno differenziale selettivo per le specie lievitiformenti mentre Il terreno YPD (yeast peptone dextrose) Agar è un terreno ricco utilizzato per il mantenimento e la conservazione delle colture isolate dai sopracitati terreni differenziali.

### 5) YPD broth

Estratto di lievito 10 g/l

Peptone 20 g/L

Glucosio 20 g/L

### 6) PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl 8 g/L

KCL 0.20 g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/L

7) glicerolo all'80%

Il YPD broth è stato utilizzato per le precolture di lievito, mentre il tampone PBS è stato utilizzato per sospendere l'apparato gastroenterico dell'ape una volta estratto dall'addome.

Il glicerolo all'80% dopo essere stato sterilizzato in autoclave è stato unito a 100 mL di YPD broth.

### **3.2 Campionamento**

Oggetto dei vari campionamenti sono state tre famiglie di *A. mellifera* subsp. *ligustica* site a Cesi coordinate 43°18'42"N 12°55'18"E, una frazione del Fabrianese (figura 4). Le famiglie sono state denominate rispettivamente famiglia celeste, famiglia mandala e famiglia N°1, la prima ad aver costituito il piccolo apiario.

I fiori sono stati campionati in un'area che copre circa 5 km di distanza dalle arnie coerentemente con le distanze che le api bottinatrici sono in grado di percorrere nell'arco di una giornata. I campionamenti hanno avuto cadenza mensile a partire da giugno 2021 fino a novembre 2021, la dove possibile per ogni campionamento sono stati prelevati fiori, api, ed i vari prodotti dell'alveare tra cui polline, pane d'api e propoli.

I fiori non sono stati raccolti nel mese di novembre 2021 e marzo 2022.

Nella pianificazione preliminare di questo lavoro sono stati utilizzati vari tipi di terreno selettivi e differenziali per avere la possibilità di visualizzare il più ampio numero di lieviti possibili tuttavia nel corso dei campionamenti è risultato il terreno WL agar quello più conveniente in quanto effettivamente solo esso conteneva molto probabilmente i giusti componenti alle giuste concentrazioni per permettere la crescita dei microrganismi ambientali in questione. Relativamente ai prodotti dell'alveare il prelievo del polline ha subito durante la sperimentazione delle modifiche; infatti inizialmente ci si era avvalsi dei commerciali cattura polline posizionati sul predellino di volo, all'entrata dell'alveare. Tuttavia, le tempistiche richieste per l'accumulo di 1-5 mg di polline erano

insostenibili per la ricerca, considerata anche la stagione non permissiva dell'anno 2021 quindi si è passato alla raccolta del polline, accidentalmente caduto dalle corbicole delle api bottinatrici all'interno dell'alveare, direttamente sul cassetto estraibile con apposite pinzette sterilizzate con alcol ad ogni utilizzo. In questa maniera si è riuscito ad ottenere un giusto quantitativo di polline da analizzare.

Nel campionamento di agosto non è stato analizzato in nessuna famiglia il polline.

Nel mese di Marzo 2022 sono stati effettuati tre campionamenti che hanno visto l'acquisizione delle sole api invernali.

Soltanto nei mesi di ottobre e novembre sono state fatte camminare per ogni famiglia tre api bottinatrici per circa 3 minuti di tempo all'interno di piastre Petri contenenti WL agar senza cloranfenicolo.

Nel mese di ottobre sono stati prelevati anche sette acari di *Varroa destructor* staccatisi dal corpo dell'ape che parassitavano a seguito del trattamento anti-varroa con acido ossalico sublimato e caduti nel cassetto estraibile. Per ogni famiglia i rispettivi sette acari sono stati immessi in tre diverse sterilin contenenti 9 mL di acqua sterile.

La raccolta di fiori, polline, pane d'api, propoli e *Varroa sp.* è stata effettuata in sterilità mediante pinze monouso e un "bisturi" apposito, sterilizzato ad ogni utilizzo con alcool, ed immessi all'interno di sterilin contenenti 9 mL di acqua sterile. Le api sono state prelevate ed immerse in eppendorf sterili. Tutti i campioni una volta prelevati e identificate con appositi codici in base al loro alveare di origine sono stati mantenuti ad una temperatura di 4°C e trasportati immediatamente all'Università Politecnica delle Marche presso il laboratorio di microbiologia per essere sottoposti ad analisi microbiologica.



Figura 4 – Apiario e famiglie oggetto di studio singolarmente fotografate. a) vista dell’apiario sulle colline del fabrianese; b) famiglia mandala; c) famiglia celeste; d) famiglia N°1.

### 3.2.1 Fiori

Le specie di fiori campionate nelle date 24 giugno, 12 luglio, 24 agosto, 26 settembre 2021 raccolte in maniera sterile e di seguito riportate con le relative foto scattate in campo sono state rispettivamente *Prunella vulgaris*, *Rubus ulmifolius*, *Centaurea erythraea*, *Echium Vulgare*, *Ligustrum lucidum*, *Menta longifolia*, *Lavandula officinalis*, *Medicago sativa*, *Daucus carota*, *Tauschia spp.*, *Pentanema squarrosus*, *Picris hieracioides*, *Hedera helix*, *Geranium sylvaticum*, *Helianthus tuberosus* e *Medicago sativa*.

La conta e l’isolamento per i campioni di fiori è avvenuta mediante la tecnica delle diluizioni seriali, si è preso 1 mL dal campione originario (che già aveva subito la prima diluizione in campo essendo

stato immesso in 9 mL di acqua sterile) e si è poi posto in un tubo contenente 9 mL d'acqua sterile ottenendo così una diluizione 1:100 ( $10^{-2}$ ). Dopo aver vortexato a 9000 rpm il tempo necessario per ottenere un omogenato si è prelevato da questa 1 mL e posto in un altro tubo contenente 9 mL di acqua sterile, tale operazione è stata ripetuta per altre 2 volte fino ad ottenere la diluizione  $10^{-5}$ .

Successivamente sono stati trasferiti 100 µl di ogni sospensione sulle rispettive piastre Petri precedentemente preparate con i terreni WL agar con e senza cloranfenicolo, YMA e RB sopra descritti e con una spatola di vetro modellata al calore si è poi proceduto allo spatolamento per diffusione cellulare. Le piastre seminate sono state messe ad incubare a 22°C per quattro giorni.

N.B: Dai risultati poco selettivi ottenuti il 26/06/21 per quanto riguarda i terreni YMA e RB per i campionamenti successivi è stato deciso di utilizzare solo WL agar con e senza cloranfenicolo.

Trascorsi i quattro giorni sono state eseguite le conte ed isolate le colonie di lievito sul terreno YPD, nel momento in cui c'era un sospetto sull'identità della colonia osservata ci si è avvalsi di un microscopio ottico ad immersione 100×.

Ogni colonia isolata è stata descritta in base alla forma, morfologia, profilo, superficie, consistenza e colore ed assegnata ad uno specifico numero.

*P. vulgaris*

*R. ulmifolius*

*C. erythraea*

*E. vulgare*



*L. lucidum*



*M. longifolia*



*L. officinalis*



*M. sativa*



*D. carota*



*Tauschia spp.*



*P. squarrosus*



*P. hieracioides*



*H. helix*



*G. sylvaticum*



*H. tuberosus*



*M. sativa*



Figura 5 – *P. vulgaris*, *R. ulmifolius*, *C. erythraea*, *E. Vulgare*, *L. lucidum*, *M. longifolia*, *L. officinalis*, *M. sativa*, *D. carota*, *Tauschia spp.*, *P. squarrosus*, *P. hieracioides*, *H. helix*, *G. sylvaticum*, *H. tuberosus* e *M. sativa* in ordine di raccolta, identificati in campo mediante ricerca fotografica con google lens.

### ***3.2.2 Apparato gastroenterico dell'ape***

Al fine di indagare le specie lievitiformenti presenti all'interno dell'apparato gastroenterico le api morte a seguito dell'induzione del coma freddo sono state sezionate in sterilità. L'apparato gastroenterico è stato sospeso in 500 µl di PBS e 100 µl di sospensione è stata trasferita in una piastra Petri precedentemente preparata con WL agar addizionato con e senza cloranfenicolo e mediante una spatola sterilizzata dopo ogni utilizzo all'interno dello stesso campione sono state effettuate due diluizioni seriali su altre due piastre per un totale quindi di sei piastre Petri a campione (tre con WL agar senza cloranfenicolo e tre addizionate con il cloranfenicolo). Le piastre sono state messe ad incubare a 22°C per quattro giorni.

NB: le prime api campionate hanno dato risultati negativi, nessun microrganismo sia di origine batterica sia di origine funginea era stato osservato in piastra quindi si è ipotizzato che le pareti gastroenteriche rimaste integre avevano assunto un ruolo di barriera all'uscita delle specie microbiche nel mezzo. Seguendo questa linea teorica è stata messa appunto perciò una metodica di rottura delle pareti gastroenteriche unendo metodi fisici e meccanici. Di seguito viene riportato il protocollo di rottura delle pareti intestinali:

- estrazione in sterilità dell'apparato gastroenterico e sospensione in 500 µl di PBS in eppendorf da 1,5 mL contenuti sferette di vetro per ¼ del loro volume
- 1 minuto di vortex a 9000 rpm alternato ad 1 minuto di ghiaccio per la rottura meccanica e fisica delle pareti gastroenteriche
- punto 2 ripetuto n volte fino a che il PBS da trasparente non assume un colore giallo opaco
- semina di 100 µl su piastra e diluizione per spatolamento
- incubazione delle piastre a 22°C per quattro giorni

Trascorsi i quattro giorni sono state eseguite le conte ed isolate le colonie di lievito sul terreno YPD, nel momento in cui c'era un sospetto sull'identità della colonia osservata ci si è avvalsi di un microscopio ottico ad immersione 100×.

Ogni colonia isolata è stata descritta in base alla forma, morfologia, profilo, superficie, consistenza e colore ed assegnata ad uno specifico numero. Ogni lievito isolato corrisponde a numeri diversi.



Figura 6 - Apparato gastroenterico dell'ape durante la sua estrazione dall'addome (sinistra) e all'interno dell'ependorf con sferette di vetro per la rottura meccanica (destra).



### 3.2.3 Prodotti dell'alveare: polline, pane d'api e propoli

Per le conte e l'isolamento dei lieviti derivanti dal polline, pane d'api e propoli è stata utilizzata la stessa tecnica delle diluizioni seriali descritta per l'isolamento delle specie lievitiforimi nei fiori.

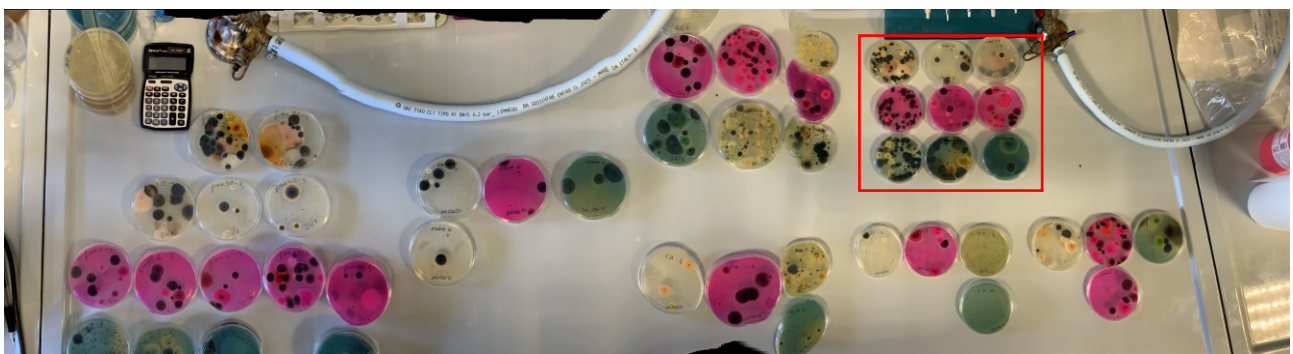


Figura 7 - Inquadratura dall'alto delle conte ottenute utilizzando diversi terreni di coltura. Da sinistra a destra del riquadro rosso sono mostrati i terreni YMA, RB e WL agar.



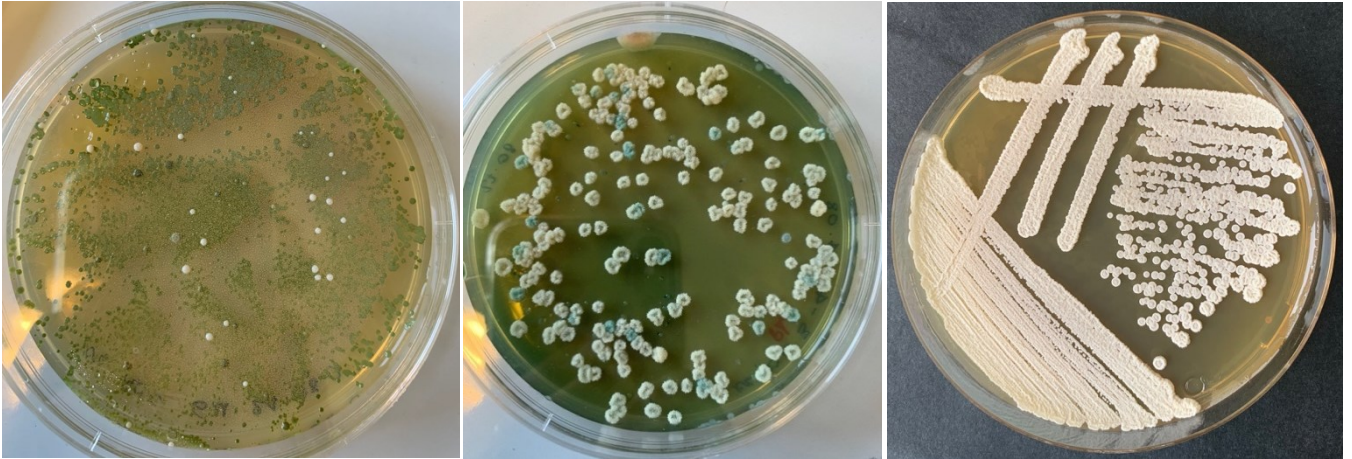
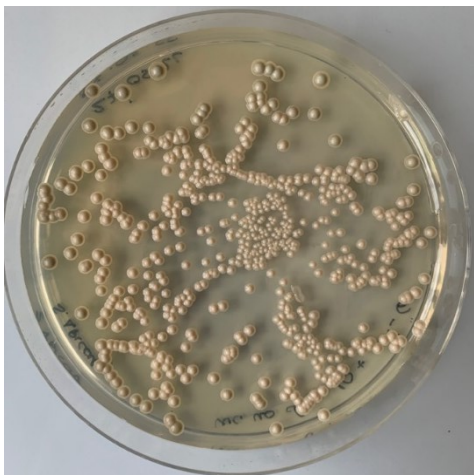
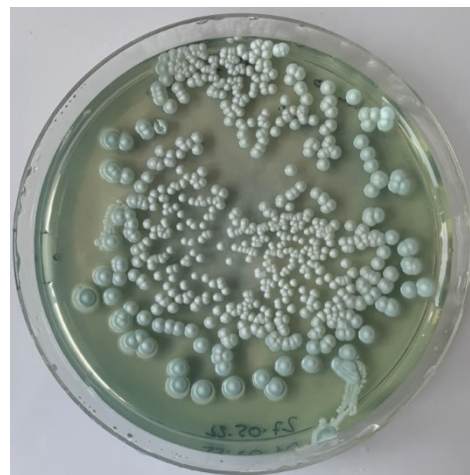


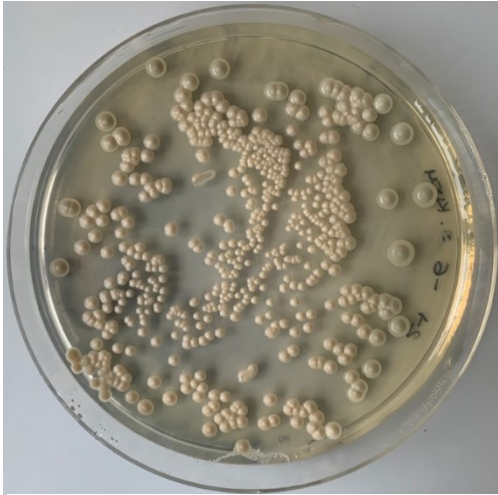
Figura 8 – Colonie in terreni agarizzati su piastre Piastre. A sinistra piastra Petri con terreno WL agar non addizionato di cloranfenicolo, si può notare il tappeto batterico che sovrasta le colonie di lievito (bianche). Al centro piastra Petri con terreno WL agar con cloranfenicolo, si noti la minor presenza di colonie batteriche e l'alta densità di colonie del lievito *Yarrowia galli*. A destra *Pichia kluyvery* isolato in purezza e portato a colonia singola in terreno YPD agar.



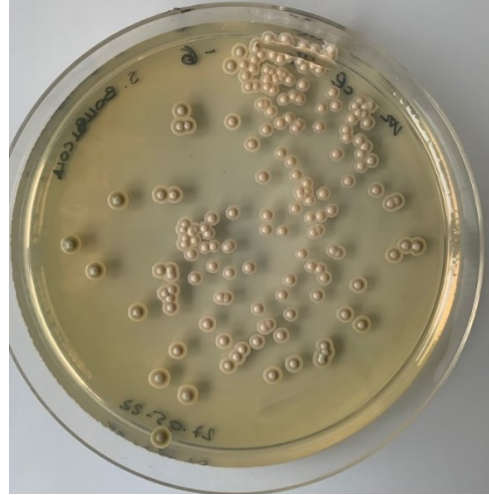
*Starmarella apicola*



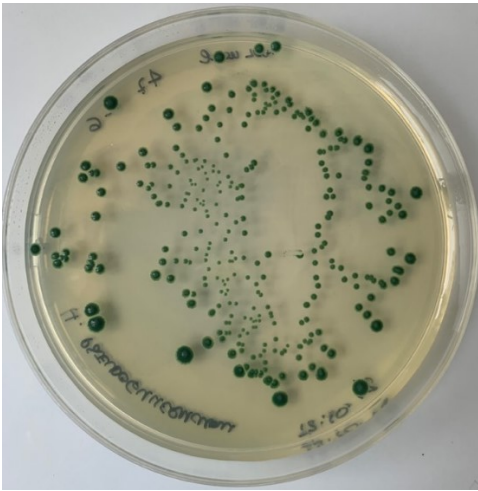
*Meyerozyma guillermondi*



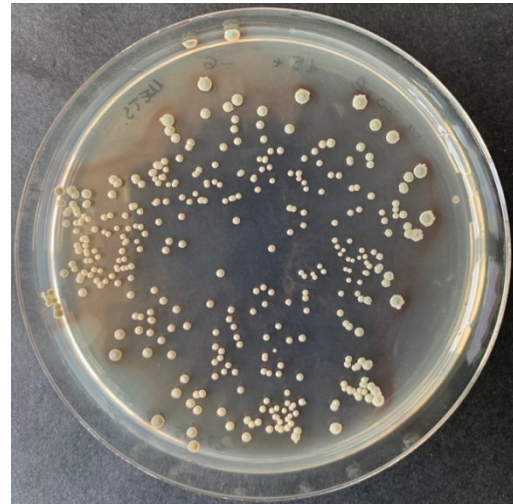
*Starmarella kuoi*



*Starmarella bombicola*



*Hanseniaspora pseudoguilliermondi*



*Metschnikowia chrysoperlae*

Figura 9 – Varie specie lievitiformenti su terreno differenziale WL agar isolate durante il corso della sperimentazione. Si denota facilmente la differenza sostanziale tra i diversi generi di lievito ma non è troppo palesata invece tra diverse specie quali *S. apicola*, *S. bombicola* e *S. kuoi*. Da notare la secrezione extracellulare di pulcherrimina da parte di *M. chrysoperlae*.

### 3.3 Identificazione e caratterizzazione molecolare

Al fine di identificare le specie di lievito isolate durante i vari campionamenti è stato necessario effettuare una caratterizzazione molecolare che ha visto in un primo momento l'ottenimento del DNA di tutti i lieviti portati a colonia singola su terreno YPD tramite la tecnica di estrazione messa a punto per i lieviti non *Saccharomyces sp.* È stata poi effettuata l'amplificazione della regione ITS mediante PCR al fine di ottenere i rispettivi profili molecolari che sono stati poi, insieme alle caratteristiche

macroscopiche delle colonie ed altre informazioni più avanti esplicitate utilizzati per effettuare una vagliatura di tutti i ceppi in nostro possesso per eliminare i cloni dalla ricerca e procedere invece con il sequenziamento delle sole specie dissimili.

### 3.3.1 Estrazione del DNA

Le tecniche utilizzate per l'estrazione del DNA delle specie isolate sono state principalmente due; Un'estrazione rapida al calore che però è stata quasi da subito non più effettuata perché molto probabilmente non in grado di rompere la spessa parete che caratterizza in particolar modo i lieviti ambientali ed un'estrazione più approfondita effettuata in genere per l'estrazione del DNA dei lieviti non appartenenti al genere *Saccharomyces sp.* specificatamente i passaggi eseguiti sono stati:

- 1) immettere in 200 µl di TE ph 8 Un'ansata consistente di colonia
- 2) Far bollire le eppendorf per 15/18 minuti
- 3) Immettere le eppendorf in ghiaccio per 10 min
- 4) Centrifugare 10 minuti a 14000 rpm
- 5) Trasferimento del surnatante in una nuova eppendorf da 1,5 mL

Relativamente all'estrazione del DNA di lieviti non appartenenti al genere *Saccharomyces sp.* è stata eseguita la seguente metodica:

- 1) Crescita O.N. delle cellule su piastra (YPD-agar)
- 2) Prelevare le cellule dalla piastra con un'ansa di plastica (1/8 della superficie totale) e metterle in un'eppendorf con 300 µl di tampone (0.1M Tris pH 8,5, 50 mM EDTA pH8, 1% SDS)
- 3) Aggiungere le sferette di vetro (circa 1/3 del contenuto dell'eppendorf)
- 4) Vortexare per 1 min e porre in ghiaccio per 1 min (ripetere tre volte)
- 5) Bollire le eppendorf in acqua per 10 min
- 6) Mettere il ghiaccio per 3 min

- 7) Aggiungere 20  $\mu$ l TRIS HCL M1 e 15  $\mu$ l di EDTA 0.5M
- 8) Aggiungere 50  $\mu$ l di SDS 10% e mescolare con la pipetta
- 9) Aggiungere 200  $\mu$ l di potassio acetato 5M (non piaccato) e spipettare brevemente
- 10) Porre 30 min in ghiaccio
- 11) Centrifugare 10 min a 14000 rpm
- 12) Prelevare 500  $\mu$ l di sovratanante (buttare via le sferette) e aggiungere un egual volume di isopropanolo freddo (-20°C)
- 13) Incubare 5 min in ghiaccio e centrifugare 10 min a 14000 rpm
- 14) Eliminare il sovratanante ed aggiungere 500  $\mu$ l di etano al 70% freddo (-20°C)
- 15) Centrifugare per 5 min ed eliminare l'etanolo
- 16) Risospendere su 100  $\mu$ l di TE pH 8
- 17) Incubare in stufa a 30°C per 15 min (va bene anche 45°C)
- 18) Spipettare bene, vortexare e conservare a -20°C

### ***3.3.2 Reazione di amplificazione***

I geni che codificano per i diversi frammenti di rRNA sono geni ripetuti, costituenti le regioni organizzatrici del nucleolo, NOR (Nucleolus organizer region). All'interno del cromosoma sono raggruppati in unità strutturali separate da sequenze spaziatrici non codificanti denominate NTS (non transcribed spacer) o IGS (intergenic spacer).

Ogni unità strutturale é costituita da un trascritto esterno spaziatore, ETS (external transcribed spacer), situato all'estremità 3' del gene 18S e due trascritti interni spaziatori detti ITS (internal transcribed spacer), situati rispettivamente: l'ITS1 fra il gene 18S ed il gene 5,8S, l'ITS2 tra il gene 5,8S e l'estremità 3' del gene 28S.

La regione amplificata nel nostro studio comprende le due regioni spaziatrici interne e l'RNA ribosomiale 5,8; la sua dimensione e struttura nucleotidica varia di specie in specie rendendo perciò l'amplificazione di tale frammento genomico ideale al fine della suddetta ricerca.

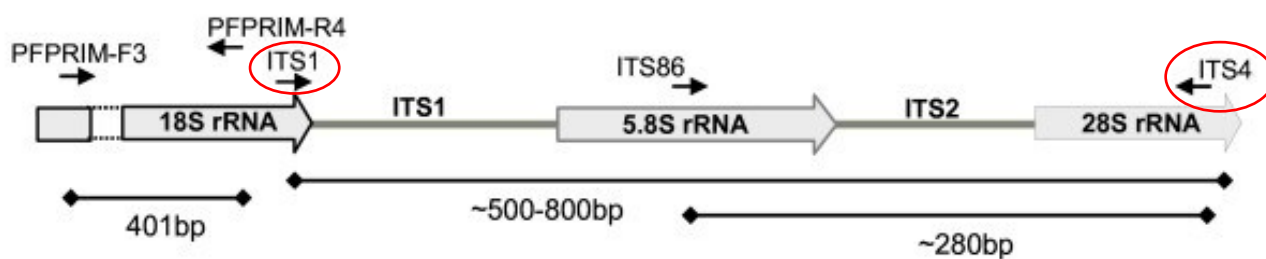


Figura 10 – Singolo cluster costituente le regioni organizzatrici del nucleolo di lievito.

Sequenze dei primer utilizzati:

primer ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTCGCG-3'

Primer ITS4: 5'-TCCTCCGCTTTATTGATATGC-3'

Si è preparata la mix così composta per ottenere un volume finale di 50 µL:

Acqua molecolare	40.9 µL
Buffer	5 µL
dNTPs (10 µM)	0.5 µL
ITS1 (50 µM)	0.5 µL
ITS4 (50 µM)	0.5 µL
Taq polimerasi	0.1 µL
DNA	2.5 µL

Le work solution dei dNTPs e dei primers sono state preparate a partire dagli stock a -20°C sfruttando l'operazione matematica:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Dove:

$C_i$ : concentrazione iniziale

Vi: volume iniziale

Cf: concentrazione finale

Vf: volume finale

Sono stati effettuati 34 cicli termici di PCR con le seguenti caratteristiche: Denaturazione a 95°C per 5 minuti seguita da un altro minuto a 94°C; annealing a 55°C per 45 secondi; allungamento a 72°C per 2 minuti; nell'ultimo ciclo la fase di allungamento a 72°C ha una durata di 10 minuti.

### ***3.3.3 Elettroforesi sul gel di agarosio***

I 202 ampliconi ottenuti sono stati separati in gel di agarosio all'1,5 g di agarosio per ogni 100 mL di tampone TBE 0.5X. Il TBE 0.5X si ottiene mediante la diluizione di 100 mL di stock di TBE 5X costituito da 54 gr/L di TRIZMAN BASE, 27,5 g/L di ACIDO BORICO, 20 mL di EDTA con 900 mL di acqua deionizzata.

Nel primo pozzetto è sempre stato caricato 3 µl di marcatore (1 Kb DNA Ladder ready to use generuler<sup>tm</sup>), nell'ultimo un controllo negativo costituito da mix senza DNA mentre in tutti gli altri sono stati caricati 8 µl di amplificato ben miscelato con 2 µl di colorante safe green.

Le condizioni della corsa elettroforetica sono state: 80 Volt per circa 1 ora. Le immagini sul gel sono state visualizzate mediante lampada UV.

### ***3.3.4 Sequenziamento***

Il sequenziamento della regione ITS è stato effettuato tramite il metodo di Sanger automatizzato (Franca et al, 2002).

Le sequenze in formato FASTA ottenute sono state confrontate con le sequenze presenti nella GenBank usando il BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) della NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) per l'identificazione del frammento.

### ***3.4 crioconservazione dei ceppi isolati***

Al fine di conservare nel tempo ogni ceppo isolato per un loro futuro utilizzo si è creata una ceppoteca utilizzando la metodica della crioconservazione rapida a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Due colonie singole per ogni ceppo isolato sono state stemperate all'interno di eppendorf da 1,5 mL contenente 500  $\mu\text{L}$  del mezzo di crioconservazione con glicerolo all'80%. Per ogni singolo ceppo sono state preparate due eppendorf.

## CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 Risultato delle conte vitali di lievito su fiori, intestino e prodotti dell'alveare

Di seguito verranno riportati i risultati delle conte vitali su WL agar ed organizzati per data di esecuzione. Seguiranno quindi una serie di tabelle ciascuna per ogni data di isolamento nelle quali nella colonna di sinistra verrà esplicitato il campione e di seguito i risultati dettagliati della conta dei lieviti e la dove è possibile anche quella relativa ai batteri ed alle muffe. In questa fase dopo opportuno periodo di incubazione le piastre sono state osservate ed effettuata una descrizione macroscopica della morfologia delle colonie anch'essa riportata in queste tabelle in funzione dell'utilizzo del terreno differenziale WL agar. In particolare, la tabella 4 riassume tutti i risultati dei vari campionamenti effettuati sui fiori.

Tabella 4 - Conte vitali su fiori.

Campione	Data	Lieviti UFC/ml	Batteri UFC/ml	Muffe UFC/ml	Morfologia colonia	ID
<i>Prunella Vulgaris</i>	24/06/21	6,9x10 <sup>5</sup>	9,4x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>	rugosa, grande, piatta, contorni regolari, simil aureobasidium	4
<i>Rubus ulmifolius</i>	24/06/21	3,36x10 <sup>5</sup>	4,95x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>3</sup>	rosa grande semilucida piatta frastagliata	7
<i>Centaurium erythraea</i>	24/06/21	9x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>3</sup>	piccola, lucida, a cupola, bordi lisci	15
<i>Echium Vulgare</i>	24/06/21	9x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>3</sup>	piccola, lucida, a cupola, bordi lisci	6
<i>Ligustrum lucidum</i>	12/07/21	1x10 <sup>3</sup>	Assenti	1x10 <sup>3</sup>	piccola, lucida, rotonda, piatta, contorni regolari	1
<i>Menta longifolia</i>	12/07/21	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	Assenti	piccola, rotonda, contorni regolari, lucida	11
<i>Lavandula officinalis</i>	12/07/21	Assenti	Assenti	2x10 <sup>3</sup>		
<i>Medicago sativa</i>	12/07/21	Assenti	Assenti	Assenti		
<i>Daucus carota</i>	24/08/21	1,2x10 <sup>5</sup>	n.d	n.d	umbonata, crema, opaca; piccola, rotonda, opaca	62 63
<i>Tauschia spp.</i>	24/08/21	7,7x10 <sup>4</sup>	n.d	n.d	piccola, rotonda, cremosa; frastagliata, bordi irregolari; piccola, rotonda, opaca, cremosa; simil aureobasidium	68 69 70 84



<i>Pentane suarrosum</i>	24/08/21	1,79x10 <sup>6</sup>	n.d	n.d	colonia rotonda, cremosa, più scura al centro;	71
					colonia rotonda, frastagliata ai bordi e regolare al centro;	64
					colonia più chiara, rotonda, cremosa;	65
					colonia piccola, rotonda, umbonata;	66
<i>Picris hieracioides</i>	24/08/21	2,4x10 <sup>5</sup>	n.d	n.d	umbonata, cremosa, leggermente più scura al centro;	74
					piccola, rotonda, contorni non troppo regolari forma ad esagono;	75
					simil-aureobasidium;	76
					umbonata, cremosa, leggermente più chiara al centro;	77
<i>Hedera helix</i>	27/09/21	3,5x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	piccola, nera, rotonda;	106
					piccola, umbonata, marrone con centro più scuro;	105
					media, rotonda, opaca, blu	104
<i>Geranium sylvaticum</i>	27/09/21	3,3x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	grande, ramificata, celeste;	102
					piccola, rotonda, umbonata, celeste;	101
					piccola, rotonda, bianco sporco;	103
					grande, ramificata, blu ghiaccio (simil aureobasidium)	128
<i>Helianthus tuberosus</i>	27/09/21	assenti	5,3x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>3</sup>		
<i>Medicago sativa</i>	27/09/21	1,4x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>3</sup>	piccola, rossa, rotonda, umbonata;	113
					grande, contorni irregolari, rugosa;	115
					piccola, chiara, centro più scuro;	116
					piccola, verdognola, contorni più chiari	114

Dopo avere dettagliatamente riportato le informazioni relative alla popolazione lievitifome presente nei fiori nel corso dei vari campionamenti nella tabella successiva saranno riportati i risultati relativi ai lieviti presenti nell'intestino e nei prodotti dell'alveare; questi risultati saranno organizzati per data di campionamento e per famiglia di origine. In particolari sono stati effettuati sette campionamenti così suddivisi: il primo campionamento effettuato in data 24/06/21 ha riguardato un campione di pane d'api per famiglia prelevato mediante l'utilizzo di un particolare strumento in commercio denominato "Beebread collector". Lo strumento seppur funzionando non si è rivelato ottimo ai fini della nostra ricerca in quanto ideato per la raccolta di pane d'api maturo con consistenza molto solida, consistenza non posseduta dai campioni di nostro interesse.

Nel mese di luglio 2021 si sono verificati due campionamenti, il primo eseguito il 12/07/21 per prelevare fiori e pane d'api il secondo invece in data 19/07/21 ha visto per la prima volta il campionamento di tre api per famiglia.

Nel mese di agosto 2021 sono stati analizzati per la famiglia celeste due campioni di pane d'api e sette api, quattro campioni di pane d'api e quattro api per la famiglia N°1 e, in assenza di pane d'api nella famiglia mandala, sono stati campionati due frammenti di propoli e due api.

Nel mese di settembre 2021 sono state campionate dalla famiglia celeste tre api, due campioni di propoli e due campioni di pane d'api; per la famiglia mandala tre api, due campioni di propoli, un campione di polline e due campioni di pane d'api; per la famiglia N°1 sei api, un campione di propoli, un campione di polline e due campioni di pane d'api.

Nel campionamento di ottobre 2021 non sono stati inclusi fiori in quanto i dati a nostra disposizione ottenuti nei mesi scorsi riguardo questa fonte sono stati ritenuti sufficienti, si è tuttavia comunque monitorato il contatto dell'ape con l'ambiente immettendo per tre minuti circa tre api bottinatrici vive per arnia all'interno di una piastra contenente WL agar senza cloranfenicolo, passati i tre minuti sono state liberate. Per quanto riguarda i prodotti dell'alveare sono stati campionati nella famiglia celeste due campioni di propoli, due campioni di polline, due campioni di pane d'api; stessi campioni sono stati prelevati dalle restanti colonie. Il campionamento delle api non era previsto ma dandosi che alcuni esemplari appartenenti alla famiglia celeste riportavano un comportamento alquanto strano simil-avvelenamento (spasmi e pungiglione estroflesso) sono stati prelevati ed analizzati in laboratorio.

A seguito dei trattamenti anti-varroa, effettuati all'inizio dell'autunno, sono stati campionati anche alcuni esemplari del parassita caduti nel fondo estraibile dell'arnia al fine di indagare come esso potrebbe interagire con l'ape e studiarne indirettamente i lieviti interni all'alveare.

Nel mese di novembre sono state campionate quattro api appartenenti alla famiglia mandala che presentavano anch'esse comportamenti anomali, in più è stata fatta camminare all'interno di piastre contenenti WL agar senza cloranfenicolo un'ape per famiglia.

I campionamenti nel mese di marzo 2022 hanno seguito cadenza settimanale e sono stati effettuati in giornate soleggiate e con temperature registrate non inferiori ai 12°C al fine di non far prendere freddo alle api. Sono state raccolte ad ogni campionamento cinque api per famiglia prelevate dall'apertura sul tetto. Dato la quasi totale assenza di microrganismi nelle api campionate il 3 si è pensato di utilizzare un “controllo positivo” (+) ovvero un'ape per ciascuna arnia che avesse del polline nelle sue corbicole in quanto nelle giornate soleggiate alcune api invernali comunque escono per cercar di bottinare i pochi fiori presenti e che quindi, in rigore di logica, avrebbero dovuto possedere più microrganismi rispetto alle api invernali all'interno dell'arnia.

NB: le conte delle api non riportate non hanno visto la crescita di nessun microrganismo in piastra.

Tabella 5 – Conte vitali su api e prodotti dell'alveare e relativa legenda, famiglia celeste: sfondo celeste in tabella; famiglia mandala: sfondo arancione in tabella; famiglia N°1: sfondo verde in tabella. LEGENDA >10<sup>4</sup>: tappeto; n.d: not detected; ape: apparato gastroenterico.

Campione	Famiglia	Lieviti UFC/ml	Batteri UFC/ml	Muffe UFC/ml	Morfologia colonia	ID
Campionamento 24/06/21						
Pane d'api	Celeste	Assenti	>10 <sup>4</sup>	n.d		
Pane d'api	Mandala	7x10 <sup>3</sup>	n.d	n.d	rugosa, bordi irregolari/frastagliati, piatta, grande, simil-aureobasidium	5
Pane d'api	N°1	Assenti	>10 <sup>4</sup>	n.d		
Campionamento del 12/07/21						
Pane d'api	Celeste	4,2x10 <sup>3</sup>	n.d	n.d	contorni irregolari, rugosa, frastagliata	8
Pane d'api	Mandala	2,2x10 <sup>3</sup>	n.d	n.d	contorni irregolari, rugosa, frastagliata grandi, chiare, mucose	2 3
Pane d'api	N°1	Assenti	Assenti	Assenti		
Campionamento del 19/07/21						
Ape	Celeste	1x10 <sup>2</sup>	n.d	n.d	rotonda, lucida, umbonata, contorni regolari	13
Ape	Celeste	Assenti	n.d	n.d		
Ape	Celeste	Assenti	n.d	n.d		
Ape	Mandala	3x10 <sup>2</sup>	Assenti	3x10 <sup>2</sup>	media, contorni irregolari, ruvida	14
Ape	Mandala	3x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	Assenti	bianco sporco, contorni irregolari, grande, opaca	86
Ape	Mandala	Assenti	Assenti	Assenti		
Ape	N°1	assenti	>10 <sup>4</sup>	assenti		
Ape	N°1	assenti	>10 <sup>4</sup>	assenti		
Ape	N°1	assenti	assenti	assenti		

Campionamento del 24/08/21						
Pane d'api	Celeste	1x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>5</sup>	>10 <sup>4</sup>	umbonata, rotonda, striscia rossa lungo il perimetro; colore crema; colore crema; umbonata, rotonda, striscia lungo il perimetro; bianca, umbonata, opaca, rotonda; piccola rotonda, opaca, celestina; bianca opaca, rotonda	82 81 78 79 22 23 24
Pane d'api	Celeste	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>3</sup>	bianca, umbonata, opaca, rotonda; piccola rotonda, opaca, celestina; bianca opaca, rotonda	22 23 24
Ape	Celeste	2x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>5</sup>	Assenti	bianca, umbonata, lucida; bianca, umbonata, opaca	26 36
Ape	Celeste	2x10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	Assenti	bianca, rotonda, umbonata, opaca; Verdi scuro, rotonde; Ruvida, contorni irregolari, grande; verde scuro tendente al nero, rotonda, lucida; bianca, umbonata, opaca, rotonda; rotonda, verde scuro al centro; bianca, umbonata, opaca, rotonda	52 53 49 50 51 37 85
Ape	Celeste	2x10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	Assenti	scura quasi nera, rotonda, lucida	16
Ape	Celeste	1x10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	Assenti	bianca, rotonda, umbonata, opaca; bianca, rotonda, umbonata, opaca; grande, verde scuro, rotonda, lucida; verde scuro tendente al nero, rotonda, lucida	48 58 47 59
Propoli	Mandala	2x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>6</sup>	Assenti	bianca, rotonda, lucida	31
Propoli	Mandala	2,4x10 <sup>5</sup>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	rotonda, bianca, lucida; bianca, ai bordi verde chiaro, scuro al centro; bianca, umbonata, rotonda	32 29 30
Ape	Mandala	5,2x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>5</sup>	Assenti	rugosa, contorni irregolari; verde scuro, rotonda, lucida; bianca, rotonda, lucida; scura, verde, rotonda, lucida; bianca, rotonda; verde, bordi irregolari, frastagliata, rugosa	19 20 18 17 35 34
Ape	Mandala	2,8x10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	Assenti	bianco sporco, contorni non troppo regolari; bianca, umbonata, liscia, rotonda; verde scuro, rotonda, lucida	39 55 54
Pane d'api	N°1	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup>	bianca, rotonda, lucida	31
Pane d'api	N°1	2x10 <sup>7</sup>	7x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>4</sup>	irregolari, ruvide, appuntite; contorni irregolari, umbonata, ruvida; irregolari, ruvide, appuntite	33 41 42
Pane d'api	N°1	2x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>2</sup>	bianca, lucida, umbonata	25
Pane d'api	N°1	3x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	>10 <sup>4</sup>	verdine, piccole, rotonde; verde chiaro, opaca, cremosa, piatta; lucida, umbonata, grande; media, lucida, rotonda, giallognola	80 83 28 27
ape	N°1	9,8x10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	Assenti	rotonda, umbonata, riga lungo tutto il perimetro; bianca, umbonata, opaca, rotonda;	72 73 67

ape	N°1	8x10 <sup>5</sup>	>10 <sup>4</sup>	Assenti	contorni irregolari, leggermente umbonata rotonde, piccole, lucide; contorni irregolari, leggermente umbonata; rotonda, lucida, verde; contorni irregolari, opaca, leggermente umbonata, verde chiaro; colonie rotondi, verdi chiare; bianca umbonata, contorni non troppo regolari, simil uovo fritto, punto nero al centro;	56 57 45 44 46 40
ape	N°1	4x10 <sup>5</sup>	>10 <sup>4</sup>	Assenti	bianca, rotonda, piccola	38
ape	N°1	6x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>5</sup>	Assenti	lucida, rotonda, verde; piccola, rotonda, bordi più chiari rispetto al centro; rugosa, contorni irregolari, grande	61 60 43
Campionamento del 26/09/21						
Pane d'api	Celeste	1x10 <sup>3</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	rotonda, bianca, contorni regolari, opaca	100
Pane d'api	Celeste	4x10 <sup>5</sup>	3,3x1 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	media grandezza, bordi irregolari, più scura al centro; rotonda, lucida, umbonata	118 119
Propoli	Celeste	1x10 <sup>4</sup>	Assenti	Assenti	bianco sporco, a vulcano, grande, rotonda	170
Ape	Celeste	3x10 <sup>4</sup>	6,6x10 <sup>6</sup>	Assenti	piccola, bianca, rotonda (sovrapposta a batteri); rotonda, contorni irregolari, bianca	99 98
Ape	Celeste	1x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>5</sup>	Assenti	bianca, rotonda, opaca, piccola (in mezzo ad un mare di bacilli)	87
Ape	Celeste	Assenti	2x10 <sup>6</sup>	Assenti		
Pane d'api	Mandala	3x10 <sup>3</sup>	6,4x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup>	bianca, piccola, rotonda, opaca	117
Pane d'api	Mandala	Assenti	2,3x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>		
Propoli	Mandala	assenti	4,8x10	2x10 <sup>3</sup>		
Polline	Mandala	4x10 <sup>4</sup>	9x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>	grande, rotonda, lucida, centro più scuro rispetto ai bordi; piccola, blu, rotonda, lucida; grande, grigia, piatta, centro più scuro rispetto ai bordi; opaca, grande, bianca	126 125 123 127
Ape	Mandala	7x10 <sup>5</sup>	7x10 <sup>5</sup>	assenti	rotonda, piccola, rosso scuro	93
Ape	Mandala	Assenti	8,4x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>		
Pane d'api	N°1	6x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	grande, bianca, contorni irregolari; rotonda, lucida, scolorita, contorni più chiari rispetto al centro; piccola, opaca, verde; simil aureobasidium (non isolato)	110 111 112
Pane d'api	N°1	5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup>	contorni irregolari e più chiari rispetto al centro, mucosa, grande; umbonata, bianco sporco, contorni irregolari	107 109
Propoli	N°1	Assenti	1,1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>3</sup>		
Polline	N°1	4x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>	grigia, umbonata, rotonda; bianco sporco, umbonata;	124 120

					piccola, blu, rugosa; simil aureobasidium	121 122
Ape	N°1	2,3x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>	assenti	bianca, contorni irregolari, grande; bianca, rotonda, piccola	94 95
Ape	N°1	1x10 <sup>2</sup>	8x10 <sup>5</sup>	assenti	piccola, rotonda, bianca	96
Ape	N°1	4x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>2</sup>	rotonda, umbonata, rugosa, bianco sporco; rotonda, umbonata, bianca; umbonata, verde con centro più chiaro rispetto ai bordi, contorni irregolari;	88 89 90
					rotonda, lucida, umbonata, piccola rotonda, piccola;	91
					leggermente umbonata, bordi più scuri rispetto al centro	92
Ape	N°1	7x10 <sup>5</sup>	7x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>2</sup>	bianca, opaca, rotonda	97
Ape	N°1	Assenti	2,2x10 <sup>6</sup>	Assenti		
Campionamento del 17/10/21						
Pane d'api	Celeste	1x10 <sup>3</sup>	assenti	2x10 <sup>3</sup>	grande, gialla, bordi irregolari, rugosa alle estremità liscia al centro	147
Polline	Celeste	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>	grande, ramificata, celeste; piccola, rotonda, umbonata, celeste; piccola, rotonda, bianco sporco; grande, ramificata, blu ghiaccio (simil aureobasidium)	102 101 103 128
Propoli	Celeste	4x10 <sup>3</sup>	assenti	assenti	ramificata, bianca, media, opaca	157
Propoli	Celeste	3x10 <sup>6</sup>	assenti	assenti	contorni irregolari, bianca, rugosa	158
Corpo	Celeste				media, rosso bordeaux, lucida, rotonda; simil-aureobasidium; piccola, rosa, rotonda	134 135 136
Corpo	Celeste				piccola, irregolare, verde	148
Corpo	Celeste				simil-aureobasidium	143
Ape	Celeste	5x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	assenti	media, bianco sporco, rotonda, lucida	154
Ape	Celeste	2x10 <sup>5</sup>	3,5x10 <sup>5</sup>	Assenti	piccola, rotonda, bianco sporco, lucida; bianca, piccola, rugosa, contorni irregolari	150 151
Ape	Celeste	Assenti	6x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>3</sup>		
Ape	Celeste	Assenti	4,8x10 <sup>5</sup>	Assenti		
Ape	Celeste	Assenti	8,1x10 <sup>4</sup>	Assenti		
Ape	Celeste	Assenti	8,1x10 <sup>5</sup>	Assenti		
Ape	Celeste	Assenti	3,6x10 <sup>5</sup>	Assenti		
Polline	Mandala	Assenti	5x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>		
Polline	Mandala	Assenti	1x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>		
Varroa	Mandala	1x10 <sup>3</sup>	Assenti	Assenti	Rotonda, opaca, media, bianca	168

Corpo	Mandala				ramificato, piccolo, piatta (simil-aureobasidium); piccola, rotonda, bianca, umbonata, opaca; piccola, rotonda, verde, opaca; piccola, rossa	129 130 131 132
Corpo	Mandala				piccola, opaca, piatta; piccola, rotonda, opaca; aureobasidium (non isolato)	144 146
Corpo	Mandala				rotonda, opaca, piccola, giallastra; rotonda, piccola, opaca, bianco sporco; simil-aureobasidium (non isolato)	141 142
Polline	N°1	4x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	Assenti	bianca, umbonata, grande, opaca; rotonda, grande, opaca, verde al centro; simil-aureobasidium	149 152 153
Pane d'api	N°1	1x10 <sup>3</sup>	Assenti	Assenti	rugosa, opaca, contorni irregolari, grande	169
Varroa	N°1	1,7x10 <sup>4</sup>	Assenti	Assenti	leggermente umbonata, rugosa, contorni irregolari, rotonda	167
Corpo	N°1				simil-aureobasidium	133
Corpo	N°1				bianca, piccola, rotonda, opaca; aureobasidium (non isolato)	161
Campionamento del 01/11/21						
Corpo	Celeste	Assenti				
Corpo	Mandala				bianca, rotonda, lucida	176
Ape	Mandala	2x10 <sup>3</sup>	5,6x10 <sup>4</sup>	assenti	bianca, rotonda, piccola opaca	174
Ape	Mandala	Assenti	Assenti	>10 <sup>4</sup>		
Ape	Mandala	Assenti	Assenti	>10 <sup>4</sup>		
Ape	Mandala	Assenti	Assenti	>10 <sup>4</sup>		
Corpo	N°1				Aureobasidium (non isolato); piccola, rossa, rotonda simil rhodotorula	177
Campionamento del 03/03/22						
Ape	Celeste	2,2x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	bianca, rotonda, piatta, opaca; bianca, rotonda, piatta, lucida	178 179
Ape	Celeste	1x10 <sup>2</sup>	assenti	assenti	bianca, rotonda, piatta, opaca	180
Ape	Celeste	1x10 <sup>2</sup>	assenti	2x10 <sup>2</sup>	rosa, rotonda, leggermente umbonata, lucida, simil rhodotorula	181
Ape	Mandala	1x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>3</sup>	bianca, rotonda, piatta, lucida	188
Ape	Mandala	1x10 <sup>2</sup>	assenti	1,9x10 <sup>3</sup>	bianca, rotonda, leggermente umbonata, opaca	182
Ape	Mandala	1,8x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	bianca, rotonda, in rilievo, opaca chiara, rotonda, piatta, molto lucida	183 184
Ape	N°1	1x10 <sup>2</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>2</sup>	bianca, rotonda, leggermente in rilievo, lucida	185
Ape	N°1	2x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	rotonda, bianca, in rilievo, opaca; rotonda, verdognola, leggermente in rilievo, opaca;	187 189
Ape	N°1	1x10 <sup>2</sup>	assenti	assenti	bianca, rotonda, in rilievo/umbonata, opaca	186
Campionamento del 22/03/22						

Ape (+)	Celeste	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	Assenti	bianca con contorni nel terreno rossi, lucida, rotonda, leggermente umbonata	192
Ape (+)	Mandala	5,3x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	bianca, umbonata, opaca, contorni regolari; bianca, leggermente umbonata, ludica, rotonda	190 193
Ape	Mandala	8x10 <sup>2</sup>	assenti	1x10 <sup>2</sup>	bianca, umbonata, opaca, contorni regolari	191
Ape	Mandala	1x10 <sup>2</sup>	assenti	assenti	bianca, rotonda, opaca, leggermente umbonata	194
Campionamento del 28/03/21						
Ape (+)	Celeste	assenti	4,3x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>2</sup>		
Ape (+)	Mandala	Assenti	2,4x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>2</sup>		
Ape	Mandala	Assenti	Assenti	1x10 <sup>4</sup>		
Ape	Mandala	9x10 <sup>2</sup>	assenti	6x10 <sup>2</sup>	bianca, rotonda, a bottone, lucida; bianca, rotonda, umbonata, a vulcano bianca opaca con centro leggermente in rilievo e di color bluastro, rotonda, contorni regolari	195 196 200
Ape	N°1	9x10 <sup>2</sup>	3,37x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>2</sup>	bianca, rotonda, piatta, opaca; bianca, con contorni rossi, rotonda, leggermente umbonata, ludica; verdognola a bersaglio, rotonda, leggermente umbonata, contorno rosso; bianca con centro verde, rotonda, leggermente umbonata contorno rosso	198 197 201 202
Ape (+)	N°1	1x10 <sup>2</sup>	assenti	3,7x10 <sup>3</sup>	bianca, in un mare di muffe	199
Ape	N°1	Assenti	5,6x10 <sup>3</sup>	Assenti		

#### 4.2 Identificazione dei lieviti isolati

Con i lieviti opportunamente identificati per data di isolamento e relativa fonte è stata costituita una ceppoteca allo scopo di contenere in collezione il numero di lieviti più rappresentativo possibile ma contemporaneamente ridurre al minimo la presenza di cloni al suo interno. A tale fine per effettuare una vagliatura razionale di tutti i 202 ceppi isolati (identificati con i sopraccitati codici ID) sono state prese in considerazione le relative lunghezze in pb della regione ITS, la morfologia della colonia su terreno differenziale, la data di campionamento e l'origine.



Tabella 6 – Profili molecolari relativi alla regione ITS di ogni ceppo isolato durante i vari campionamenti.

ID	Banda ITS	ID	Banda ITS	ID	Banda ITS	ID	Banda ITS
1	500 pb	51	700 pb	100	650 pb	155	450 pb
2	400 pb	52	650 pb	101	650 pb	156	600 pb
3	500 pb	53	750 pb	102	550 pb	157	700 pb
4	650 pb	54	900 bp	103	700 pb	158	500 pb
5	620 pb	55	750 pb	104	600 pb	159	420 pb
6	550 pb	56	900 pb	105	700 pb	160	520 pb
7	550 pb	57	500 pb	107	350 pb	161	820 pb
8	200/250 pb	58	800 pb	109	420 pb	162	650 pb
11	700 pb	59	1000 pb	110	700 pb	163	600 pb
13	750 pb	60	900 pb	111	650 pb	164	550 pb
14	900 pb	61	900 pb	112	600 pb	165	500 pb
15	520 pb	62	680 pb	113	750 pb	166	750 pb
16	600 pb	63	400 pb	114	400 pb	167	400 pb
17	850 pb	64	700 pb	115	700 pb	168	600 pb
18	750 bp	65	750 pb	117	800 pb	169	700 pb
19	450 pb	66	700/650 pb	118	550 pb	170	700 pb
20	900 pb	68	550 pb	119	500 pb	171	450 pb
21	620 pb	69	700 pb	120	700 pb	172	600 pb
22	450 pb	70	650 pb	121	700 pb	173	480 pb
23	500 pb	71	750 pb	122	700 pb	174	350 pb
24	750 pb	72	800 pb	123	700 pb	176	450 pb
25	700 pb	73	850 pb	124	700 pb	178	400 pb
26	700 pb	74	600 pb	125	700 pb	179	600 pb
27	400 pb	75	500 pb	126	350 pb	180	600 pb
28	800 pb	77	650 pb	127	850 bp	182	400 pb
29	500 bp	78	500 pb	128	600 pb	183	600 pb
30	400 pb	79	400 pb	131	300 pb	185	600 pb
31	450 pb	80	750 bp	132	500/620 pb	186	500 pb
32	450 pb	81	400 pb	133	550 pb	187	580 pb
33	200/250 pb	82	500 pb	134	500/600 pb	188	500 pb
34	500 pb	83	750 pb	135	550 pb	189	400 pb
35	750 bp	84	620 pb	136	700 pb	190	400 pb
36	350 pb	85	850 bp	138	300/350 pb	191	450 pb
37	900 pb	86	900 pb	139	550 pb	192	400 pb
38	300 pb	87	850 pb	140	550 pb	193	400 pb
39	450 pb	88	700 pb	141	650 pb	194	450 pb
40	700 pb	89	600 pb	142	600 pb	195	500 pb
41	400 pb	90	700 pb	143	550 pb	196	650 pb
42	420 pb	91	950 pb	144	720/ 650 pb	197	400 pb
43	300 pb	92	1000 pb	146	700 pb	198	450 pb
44	450 pb	93	750 pb	147	650 pb	200	600 pb
45	920 pb	94	650 pb	148	600 pb	201	400 pb
46	900/1000 bp	95	550 pb	149	550 pb	202	450 pb
47	850 pb	96	700 bp	150	600 pb		
48	650 pb	97	750 bp	151	450 pb		
49	350 pb	98	800 bp	152	750 pb		
50	900 pb	99	750 pb	154	850 pb		

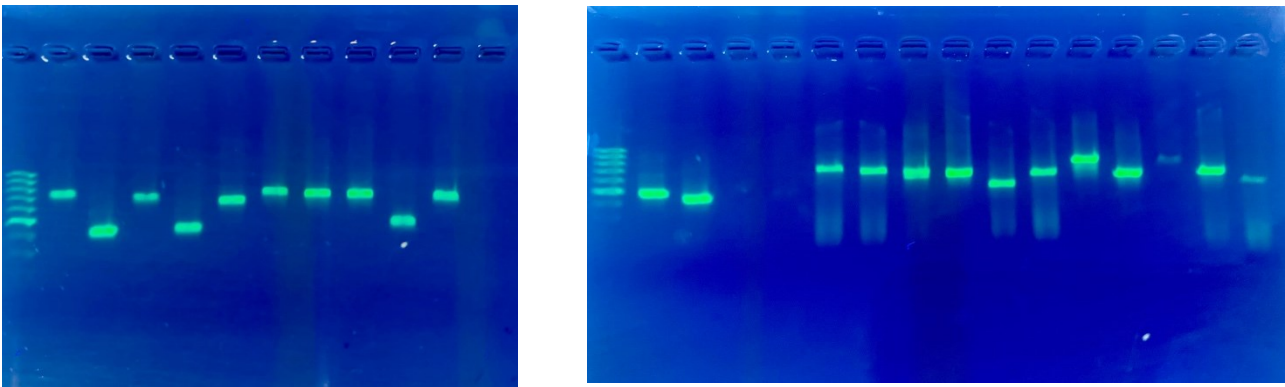


Figura 11 – Gel elettroforetico. Nel primo pozzetto di entrambi i gel è ben visibile il marcatore mentre in tutti gli altri si notano bande di altezze diverse in base alla diversa lunghezza in pb della regione ITS posseduta dai singoli ceppi analizzati. Nel 4° e 5° pozzetto del gel elettroforetico a destra (comprendendo nel calcolo anche il pozzetto contenente il marcatore) si nota l'assenza di banda dovuta all'assenza dell'amplicone a seguito dell'estrazione del DNA al calore.

Esempio di come sono stati selezionati e identificati ipotetici cloni da non includere nel sequenziamento:

CAMPIONE	MORFOLOGIA	BANDA ITS	ID	SEQ
Intestino ape 1	verde scuro, rotonda, lucida	900 pb	20	Si
Intestino ape 1	scura, verde, rotonda, lucida;	850 pb	17	No
Intestino ape 1	bianca, rotonda, lucida;	750 pb	18	Si
Intestino ape 1	bianca, rotonda	750 pb	35	No
Intestino ape 1	verde, bordi irregolari, frastagliata, rugosa	500 pb	34	Si

In questo particolare caso di sei ceppi in collezione ne sono stati sequenziati soltanto tre datosi che il 20 è identico morfologicamente al 17 e il profilo molecolare è molto simile (infatti si viene a considerare sempre un  $\pm 50$  pb nella lettura del gel elettroforetico), stesso discorso vale per il ceppo 18 e 35 mentre il ceppo 34 è diverso dai precedenti sia per morfologia che per lunghezza della regione ITS perciò non è sicuramente un clone ma una specie a sé.

Tabella 7 – Identificazione a livello di specie mediante sequenziamento dei ceppi selezionati.

CAMPIONE	MORFOLOGIA	BANDA ITS	ID	SPECIE
Intestino ape 1	verde scuro, rotonda, lucida	900 pb	20	Hanseniaspora pseudoguilliermondii
Intestino ape 1	bianca, rotonda, lucida;	750 pb	18	Meyerozyma caribbica
Intestino ape 1	verde, bordi irregolari, frastagliata, rugosa	500 pb	34	Pichia kluyveri

Sulla base di un'analisi comparativa nella quale sono stati contemporaneamente valutati: provenienza dei campioni (matrice), data di campionamento ed osservazione micromacroskopica delle colonie, dei 202 ceppi isolati solo 142 sono stati elaborati per un approfondimento molecolare mediante il sequenziamento dell'intera regione ITS. In questo modo almeno teoricamente, è stata ridotta al minimo la possibilità di analizzare cloni appartenenti allo stesso genere e specie.

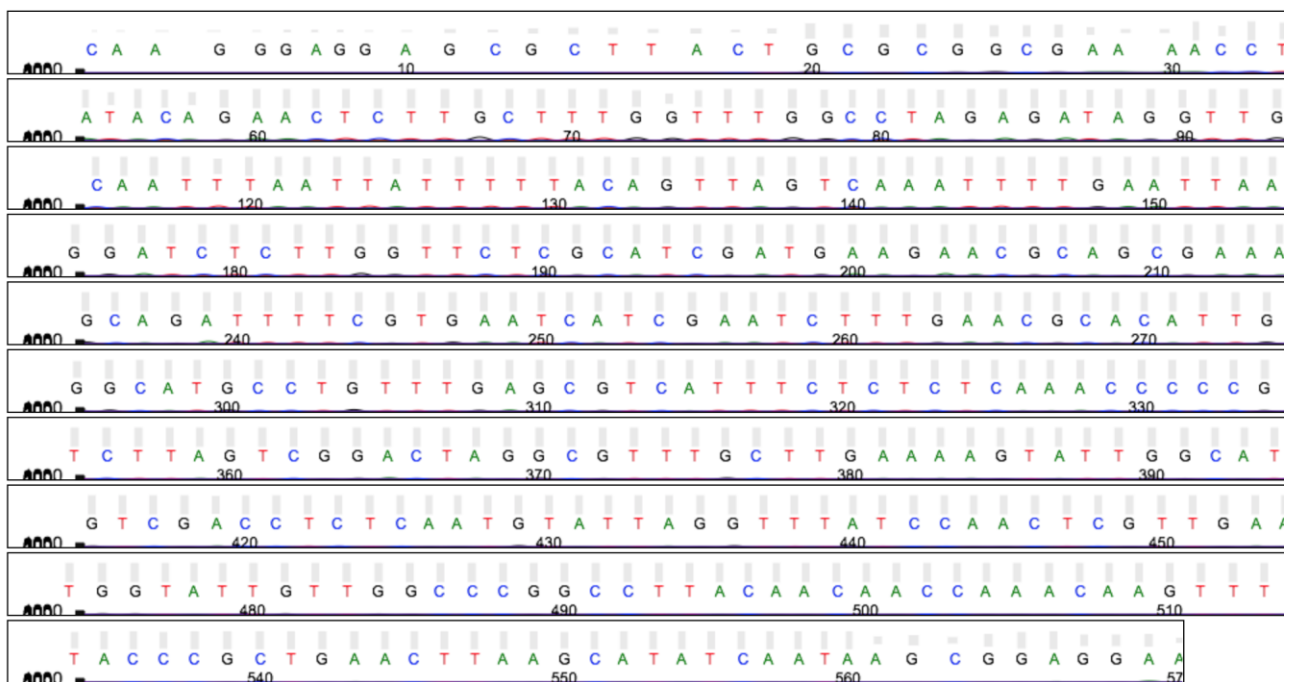


Figura 12 - Elettroferogramma di una porzione di sequenza di DNA ottenuto mediante sequenziamento di Sanger automatizzato, le bande sopra ogni singola base nucleotidica stanno ad indicare la veridicità della “chiamata” del nucleotide.

Ottenuta la sequenza della regione ITS in formato FASTA si è effettuata una ricerca nel database “internal transcribed spacer region (ITS) from fungi type and reference material” dell’NCBI mediante l’algoritmo megaBLAST allo scopo di ricercare sequenze altamente simili alla nostra query ottimo di fatti per allineare sequenze lunghe quasi uguali, le cui differenze possano derivare da errori di sequenziamento o polimorfismi (Filipponi F., 2009-2020).

The screenshot displays the NCBI BLAST search results for query RID-77RW065301N. The interface includes a search summary, a filter results section, and a table of sequences producing significant alignments.

**Search Summary:**

- Job Title: 158-ITS1\_A11.ab1
- RID: 77RW065301N (Search expires on 05-06 22:30 pm)
- Program: BLASTN
- Database: rRNA\_typestrains/ITS\_RefSeq\_Fungi
- Query ID: lcl|Query\_364391
- Description: 158-ITS1\_A11.ab1
- Molecule type: dna
- Query Length: 395

**Filter Results:**

- Organism: only top 20 will appear (exclude checkbox)
- Percent Identity: [ ] to [ ]
- E value: [ ] to [ ]
- Query Coverage: [ ] to [ ]

**Sequences producing significant alignments:**

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pichia terricola CBS 2617 ITS region: from TYPE material	<a href="#">Pichia terricola</a>	693	693	94%	0.0	100.00%	483	<a href="#">NR_153294.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> [Candida] pseudolambica CBS 2063 ITS region: from TYPE material	<a href="#">[Candida] pseudolambica</a>	375	375	80%	2e-104	87.88%	595	<a href="#">NR_153281.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Pichia sporocuriosa CBS 8806 ITS region: from TYPE material	<a href="#">Pichia sporocuriosa</a>	363	363	80%	1e-100	87.27%	496	<a href="#">NR_153293.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Pichia chibodasensis NBRC 111569 ITS region: from TYPE material	<a href="#">Pichia chibodasensis</a>	344	344	73%	5e-95	87.79%	409	<a href="#">NR_153305.1</a>

Figura 13 – Ricerca nel database “internal transcribed spacer region (ITS) from fungi type and reference material” dell’NCBI mediante l’algoritmo megaBLAST.

#### 4.3. Elaborazione delle relazioni presenti nei lieviti trovati nelle varie matrici

Dopo aver ottenuto i risultati di ciascuna delle 142 sequenze inviate, il risultato degli appaiamenti ottenuti mediante BLASTn sono stati confrontati con la fonte da cui ogni ceppo è stato isolato e la data di campionamento. Questa analisi comparativa aveva lo scopo di mettere in luce eventuali relazioni circa la presenza di lieviti nell’ambiente, la loro permanenza transitoria e stabile

nell'intestino e quindi il loro eventuale ritrovamento nei prodotti dell'alveare (polline, pane d'api e propoli).

#### 4.3.1 Lieviti nei fiori

Le 31 sequenze ottenute relative ai 31 lieviti isolati dalle quindici specie di fiori campionati durante i mesi estivi sono relative alle specie riportate in tabella 8.

Tabella 8 - Specie lievitifforme isolate dai fiori con relativo numero identificativo e data di isolamento.

SPECIE	ID	DATA	SPECIE	ID	DATA
Aureobasidium melanogenum	64	24/08/21	Metschnikowia ziziphicola	75	24/08/21
Aureobasidium melanogenum	84	24/08/21	Meyerozyma caribbica	71	24/08/21
Aureobasidium namibiae	7	24/06/21	Papiliotrema fonsecae	77	24/08/21
Buckleyzyma salicina	63	24/08/21	Papiliotrema fonsecae	74	24/08/21
Candida friedrichii	65	24/08/21	Papiliotrema perniciosus	15	24/06/21
Dothiora agapanthi	105	26/09/21	Papiliotrema pseudoalba	68	24/08/21
Dothiora phillyreae	103	26/09/21	Symmetrospora coprosmae	113	26/09/21
Filobasidium wieringae	104	26/09/21	Vishniacozyma carnescens	114	26/09/21
Filobasidium magnum	101	26/09/21	Vishniacozyma victoriae	11	27/07/21
Kabatina thujae	66	24/08/21			

È noto da circa un secolo che i fiori e più specificatamente il nettare contenuto al suo interno, in virtù delle alte concentrazioni di zucchero che lo caratterizza fornisce una nicchia ecologica ideale per la crescita e proliferazione dei lieviti (Herrera et al, 2009).

Secondo alcuni studi i segnali floreali olfattivi che la pianta crea al fine di richiamare gli insetti impollinatori sono influenzati in larga misura dalle molecole che si vengono a creare a seguito

dell'azione fermentativa dei lieviti contenuti nel nettare ed è per questo che l'attenzione si è focalizzata maggiormente sullo studio di quest'ultimi.

È stato osservato come il profilo aromatico dei fiori immaturi, caratterizzato principalmente da sesquiterpeni cambia nei fiori maturi che invece presenta una concentrazione elevata di chetoni ed alcoli a corta catena (Pozo et al, 2009), tipici composti volatili prodotti dal metabolismo dei lieviti. La differenza sostanziale tra fiori maturi e fiori immaturi sta nel fatto che i primi sono visitati dagli insetti impollinatori mentre i secondi no quindi ci sono prove massicce che effettivamente l'insetto pronube contamina i fiori con i lieviti ad esso associati che a loro volta andranno a modificare il profilo aromatico del fiore che in ultima istanza potrebbe favorire maggiormente il richiamo dell'animale a sé portando perciò ad un ulteriore potenziamento del mutualismo pianta-insetto impollinatore (Pozo et al, 2009).

Alcuni lieviti fermentanti producono vari composti organici volatili (VOCs) in grado di richiamare maggiormente gli insetti impollinatori come Rering et al, (2018) hanno dimostrato. I VOCs sono stati classificati come prodotti in fase gassosa a base di carbonio e circa 250 diversi VOCs sono stati definiti come prodotti da funghi, essi sono rappresentati da miscele di idrocarburi semplici, eterociclici, aldeidi, chetoni, alcoli, fenoli, tioalcoli e tioesteri e/o loro derivati (Oro et al, 2018).

Ad esempio, in lavori recentemente pubblicati è stato dimostrato che la produzione di 2-butanolo da parte di *M. reukaufii* presente nel nettare dei fiori ha determinato nelle api maggiori risposte antennali rispetto agli altri composti emessi da una qualsiasi delle specie testate (*Aureobasidium pullulans*, *Neokomagataea sp.* e *Asaia astilbes*) (Rering et al, 2018).

Oltre ai lieviti appartenenti al genere *Metschnikowia sp.* sono molteplici i lieviti fermentati trovati nei fiori analizzati in questo studio, tra cui anche specie appartenenti al genere dei lieviti simili *Aureobasidium sp.* aprendo l'ipotesi che gli specifici e diversi composti organici volatili prodotti creino delle guide floreali olfattivi predilette e percorse dagli insetti impollinatori e dalle api datosi che alcuni di questi lieviti sono stati ritrovati anche in altre matrici analizzate.

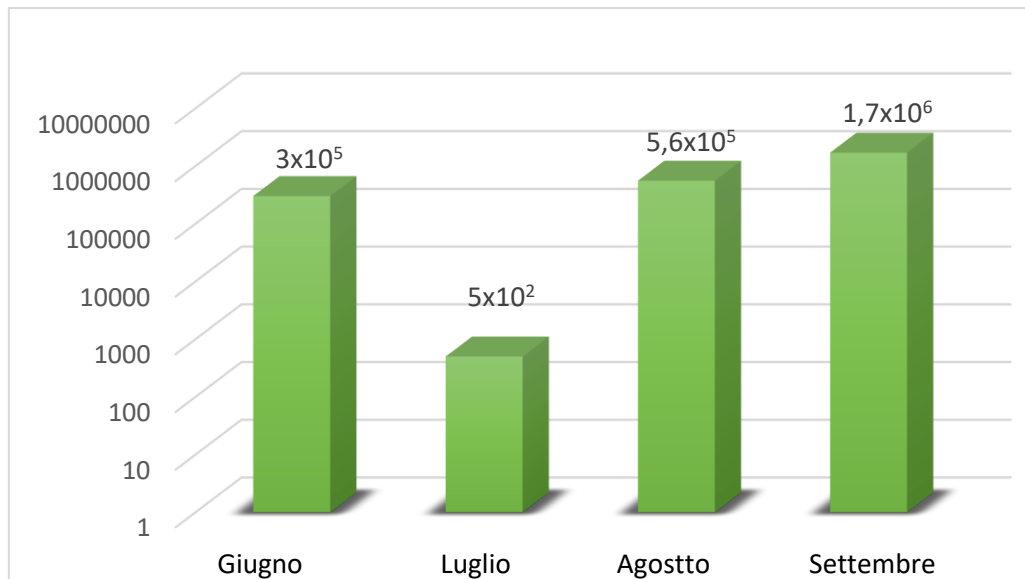


Figura 14 – Andamento temporale dei lieviti isolate nei fiori.

Da sottolineare come le alte temperature del mese di luglio associate ad assenza di pioggia abbiano portato ad un habitat all'interno del fiore inadatto per la proliferazione sia delle specie batteriche che delle specie lievitiformenti che di fatti sono state trovate in bassissima concentrazione rispetto agli altri mesi, dei quattro fiori analizzati soltanto due sono state le colonie trovate su piastra e di queste soltanto una è stata sequenziata rivelando che la specie in questione è *V. victoriae* la quale molto probabilmente è stata una delle poche a riuscire a sopravvivere in questo habitat così inospitale. Questo fatto può essere in parte collegato anche all'assenza di pane d'api nella famiglia mandala nel mese di agosto; le api bottinatrici appartenenti a questa famiglia potrebbero non aver portato polline nella colonia in quanto non attratte dal profilo aromatico alterato della pianta.

#### 4.3.2 Lieviti nel corpo dell'ape

In tabella 9 vengono riportati i risultati relativi alle 10 specie ritrovate sul corpo dell'ape, dunque esternamente rispetto alla porzione gastroenterica. Questo passaggio è stato importante per definire la relazione di passaggio dei lieviti tra l'ambiente e l'apparato gastroenterico.

Tabella 9 – Specie lievitiforimi isolate dal corpo dell'ape con relativo numero identificativo e data di isolamento.

SPECIE	ID	DATA	SPECIE	ID	DATA
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	142	17/10/21	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	136	17/10/21
<i>Debaryomyces hansenii</i>	161	17/10/21	<i>Sarocladium strictum</i>	146	17/10/21
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	138	17/10/21	<i>Starmerella kuoi</i>	176	04/11/21
<i>Rhodotorula babjevae</i>	140	17/10/21	<i>Sporobolomyces roseus</i>	134	17/10/21
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	141	17/10/21	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	148	17/10/21

Anche in questo caso nel corpo delle api sono stati ritrovati lieviti tipici del microbioma del fiore quali *Debaryomyces sp.*, *Metschnikowia sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Sporobolomyces sp.* e *Aureobasidium sp.* come prova del fatto che le api visitano anche nel mese di ottobre le fioriture disponibili.

L'origine di *S. kuoi* isolata dal corpo dell'ape a novembre, e mai isolata nei fiori, è abbastanza incerta perché se da un lato il genere *Starmerella sp.* viene ad essere ritrovato all'interno dei fiori, la specie *S. kuoi*, almeno nel nostro studio, non è stata isolata né nel polline né nei fiori ma soltanto nell'apparato gastroenterico delle api invernali. Questa fatto potrebbe essere spiegato attribuendo a *S. kuoi* un ruolo specifico all'interno dell'apparato gastroenterico delle api invernali che viene invece sostituito o mascherato da altri microrganismi che sopraggiungono nei mesi estivi.

Probabilmente *S. strictum* e *C. macerans* seppur mai isolati nei fiori potrebbero provenire dall'ambiente come ad esempio aria, terreno o acqua poiché sporadicamente ritrovati anche in campioni di polline. Da approfondire sicuramente il profilo dei composti organici volatili prodotti a seguito delle fermentazioni di questi lieviti per comprendere ancora meglio il filo invisibile che collega il mondo animale con quello vegetale all'interno di un ecosistema come il nostro in perenne in mutamento.



### 4.3.3 Lieviti nell'apparato gastroenterico dell'ape

Le specie lievitiformenti provenienti dall'apparato gastroenterico delle api caratterizzate a livello di specie sono state 63.

Tabella 10 – Specie lievitiformenti isolate dall'apparato gastroenterico dell'ape con relativo numero identificativo e data di isolamento.

SPECIE	ID	DATA	SPECIE	ID	DATA
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	188	03/03/22	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	73	26/08/21
<i>Clavispora lusitanae</i>	38	26/08/21	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	94	26/09/21
<i>Cryptococcus amyloletus</i>	189	03/03/22	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	202	28/03/21
<i>Debaryomyces hansenii</i>	99	26/09/21	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	192	03/03/22
<i>Debaryomyces maramus</i>	185	03/03/21	<i>Metschnikowia sinensis</i>	201	28/03/22
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	13	19/07/21	<i>Paragaeumannomyces bombycinus</i>	197	28/03/22
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	86	19/07/21	<i>Pichia kluyveri</i>	89	26/09/21
<i>Filobasidium wieringae</i>	67	26/08/21	<i>Pichia kluyveri</i>	43	26/08/21
<i>Hanseniaspora lachancei</i>	60	26/08/21	<i>Pichia kluyveri</i>	34	26/08/21
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	47	26/08/21	<i>Pichia kluyveri</i>	19	26/08/21
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	59	26/08/21	<i>Pichia kluyveri</i>	151	17/10/21
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	50	26/08/21	<i>Pichia kudriavzevii</i>	44	26/08/21
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	154	17/10/21	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	14	19/07/21
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	16	26/08/21	<i>Sporobolomyces roseus</i>	93	26/09/21
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	17	26/08/21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88	26/09/21
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	46	26/08/21	<i>Starmerella apicola</i>	183	03/03/22
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	90	26/09/21	<i>Starmerella apicola</i>	187	03/03/22
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	91	26/09/21	<i>Starmerella apicola</i>	186	03/03/22
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	150	17/10/21	<i>Starmerella bombicola</i>	96	26/09/21
<i>Lachancea kluyveri</i>	40	26/08/21	<i>Starmerella khaoyaiensis</i>	191	22/03/22
<i>Lachancea kluyveri</i>	72	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	174	01/11/21
<i>Meyerozyma caribbica</i>	58	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	182	03/03/22
<i>Meyerozyma caribbica</i>	26	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	178	03/03/22

<i>Meyerozyma caribbica</i>	95	26/09/21	<i>Starmerella kuoi</i>	179	03/03/22
<i>Meyerozyma caribbica</i>	18	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	180	03/03/22
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	51	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	190	22/03/22
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	85	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	193	22/03/22
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	36	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	198	28/03/22
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	48	26/08/21	<i>Starmerella kuoi</i>	194	22/03/22
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	98	26/09/21	<i>Starmerella neotropicalis</i>	195	28/03/22
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	196	28/03/22	<i>Yarrowia galli</i>	39	26/08/22
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	200	28/03/22			

Di questi 16 diversi generi (e ulteriori relative specie) che sono risultati essere in grado di sopravvivere all'habitat fornito dall'apparato gastroenterico 3 sono stati ritrovati anche nei fiori (*Filobasidium sp.*, *Metschnikowia sp.* e *Meyerozyma sp.*) e 5 nel corpo dell'ape (*Debaryomyces sp.*, *Metschnikowia sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Sporobolomyces sp.* e *Starmerella sp.*) testimonianza del fatto che effettivamente c'è un continuo scambio di microrganismi tra il mondo delle api e l'ambiente.

Lieviti trovati nell'apparato gastroenterico ma non nei fiori ma che comunque costituiscono il naturale microbioma di essi sono quelli appartenenti al genere *Sporobolomyces sp.*, *Clavispora sp.*, *Debaryomyces sp.*, *Starmerella sp.*, *Hanseniaspora sp.* e *Cryptococcus sp.* (Klaps J., 2020). I lieviti appartenenti al genere *Filobasidium sp.*, *Sporobolomyces sp.*, *Clavispora sp.* e *Lachancea sp.* molto probabilmente sono lieviti che transitano solo momentaneamente all'interno dell'apparato gastroenterico dell'ape e che non apportano alcun beneficio a quest'ultima o al microbioma batterico circostante. Tesi fatta considerando che in questo studio sono stati isolati solo una volta e nel mese di agosto, mese che nel 2021 è stato caratterizzato da una forte ripresa dell'attività delle api. Altro discorso deve essere intrapreso per quanto riguarda i lieviti del genere *Metschnikowia sp.*, *Debaryomyces sp.*, e *Meyerozyma sp.* che pur essendo lieviti endemici all'interno del fiore sembrerebbe che abbiano trovato una nicchia ecologica stabile anche all'interno dell'ape dandosi che sono stati isolati per più mesi consecutivi al suo interno e soprattutto a marzo, mese utilizzato per

ricercare eventuali lieviti stabili all'interno dell'apparato. Tuttavia, nell'apparato gastroenterico sono state isolate specie di lievito non ritrovate in nessun'altra matrice analizzata come

*B. bruxellensis*, *C. amyloletus*, *S. cerevisiae*, *H. lachancei*, *H. pseudoguilliermondi*, *H. uvarum*, *P. bombycinus*, *P. kluyveri* e *P. kudriavzevii*.

Il ritrovamento di un singolo ceppo di *S. cerevisiae* nel mese di novembre potrebbe far pensare di aver campionato erroneamente un'ape nutrice (Yun et al, 2018) anche se l'ipotesi non può essere sicuramente in questo studio portata avanti datosi il singolo ritrovamento del lievito.

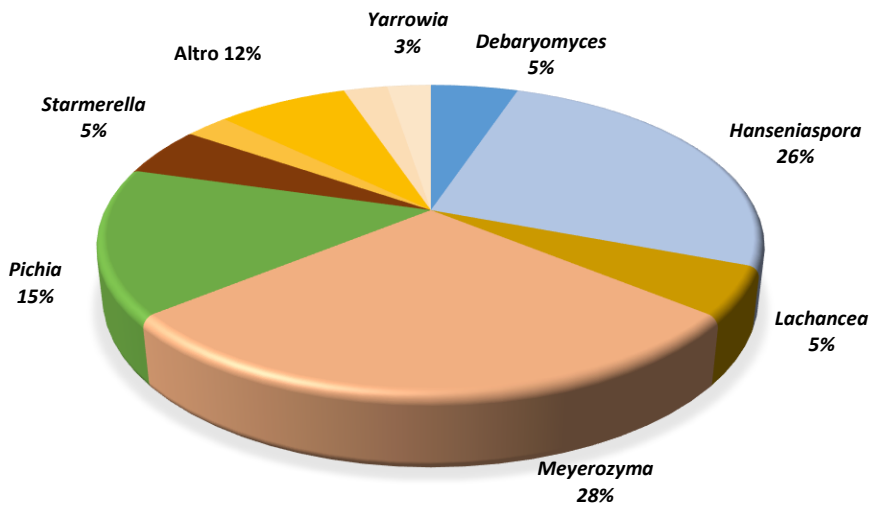
I lieviti *B. bruxellensis* e *C. amyloletus* sono stati isolati in campioni di apparato gastroenterico estratti da api invernali ma non si può assumere che quest'ultimi svolgano un ruolo attivo all'interno del microbioma in quanto ritrovati soltanto nel campionamento del 3 marzo e non negli altri due. Stesso discorso vale per *P. bombycinus* ritrovato solo nel campionamento del 28/03/22 all'interno dell'apparato gastroenterico del controllo positivo.

Il genere *Hanseniaspora sp.*, con un focus sulla specie *H. pseudoguilliermondii* invece è stato costantemente isolato in alte concentrazioni all'interno dell'apparato gastroenterico delle api estive ma non in quello delle api invernali andando ad avanzare perciò l'ipotesi che effettivamente non potrebbe far parte del micobioma stabile, se mai dovesse quest'ultimo essere definito in maniera univoca, ma comunque si potrebbe collocare all'interno di un micobioma "pseudostabile" in quanto si è visto essere in grado di stabilire un'interazione costante nel tempo con l'ape andandosi molto probabilmente a localizzare in una specifica nicchia ecologica all'interno dell'apparato esistente solo nelle stagioni estive.

Si potrebbe anche parlare di *P. kluyveri* come una specie facente parte di un micobioma pseudostabile in quanto ritrovata in tutti i mesi estivi, in api provenienti da tutte e tre le famiglie sottoposte allo studio ma non nelle api campionate di inverno.

a

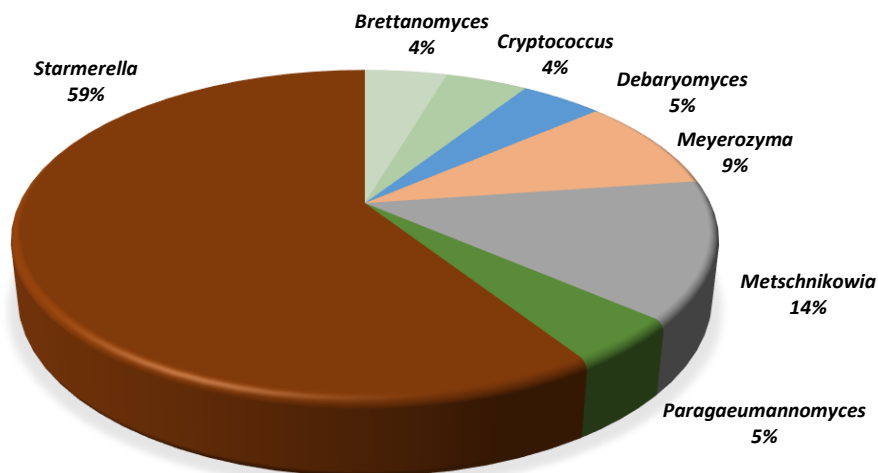
## API ESTIVE



Altro	
<i>Sporobolomyces</i>	3%
<i>Filobasidium</i>	2%
<i>Pseudozyma</i>	3%
<i>Saccharomyces</i>	3%
<i>Clavispora</i>	2%

b

## API INVERNALI



<i>Starmerella</i>	
<i>kuoi</i>	64%
<i>apicola</i>	22%
<i>khaoyaiensis</i>	7%
<i>neotropicalis</i>	7%

Figura15 – Grafico a torta relativo ai generi lievitiforimi isolati in: a) apparato gastroenterico di api campionate in estate; b) apparato gastroenterico di api campionate nel mese di marzo.

Alla luce dei risultati ottenuti si prestano perfettamente come ipotetici candidati di un microbioma stabile i lieviti appartenenti al genere *Debaryomyces sp.*, e *Meyerozyma sp.* In virtù del loro costante isolamento sia durante l'estate 2021 sia durante i tre campionamenti nel mese di marzo 2022. L'insieme delle specie *S. bombicola*, *S. apicola* e *S. kuoi* hanno rappresentato in questo studio il 59% dei lieviti isolati nell'apparato gastroenterico delle api invernali avanzando perciò anche per

quest'ultimi l'ipotesi che effettivamente possano far parte del microbioma stabile dell'ape essendo lieviti nutrizionalmente specializzati già conosciuti come simbionti specifici degli apodi (Detry et al, 2020) ed in grado di produrre molecole biologicamente attive quale il soforolipide.

Anche i lieviti appartenenti al genere *Hanseniaspora sp.* e *Pichia sp.* pur non essendo stati isolati nell'apparato gastroenterico delle api invernali, potrebbero avere un ruolo non ancora approfondito durante il periodo estivo come effettivamente è stato dimostrato per il microbioma batterico transitorio (Callegari et al, 2021) e per tale ragione sono stati comunque inclusi nell'analisi metabolica.

Tabella 10 - Profilo fermentativo dei lieviti maggiormente isolati. +: positivo w: lentamente; w/-: lentamente o negativo; -: negativo; s: positivo ma lento; v: variabile (Kurtzman et al, 2011).

	Glucosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Raffinosio	Trealosio
<i>D. hansenii</i>	w/-	w/-	w/-	w/-	w/-	w/-	w/-
<i>H. pseudoguilliermondii</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. guilliermondii</i>	+	v	+	-	-	+	+
<i>M. chrysoperlae</i>	+	v	-	-	-	-	-
<i>P. kluyveri</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. apicola</i>	+/s	-	-	-	-	+/s	-
<i>S. bombicola</i>	+	-	+	-	-	v	-
<i>S. luoi</i>	w	-	w	-	-	w	-

Il Mannosio, l'arabinosio, il raffinosio, il galattosio ed il lattosio sono zuccheri rari indigeribili per l'ape e potenzialmente tossici mentre il trealosio rappresenta la principale riserva energetica degli insetti paragonabile al glicogeno per i mammiferi (Waldan et al, 2016). La capacità di assimilare questi carboidrati più esotici dipende dall'avere i trasportatori e gli enzimi appropriati, posseduti in combinazione, come mostrato dalla tabella 10 da svariati lieviti isolati all'interno dell'apparato gastroenterico.

Diversi studi hanno rilevato come i lieviti benefici per l'ape sono coloro in grado di produrre beta-glucosidasi, xilanasi, cellulasi, peptidi antimicrobici, vitamine, amminoacidi e capaci di degradare sostanze xenobiotiche e glicani.

I lieviti appartenenti al genere *Hanseniaspora sp.*, *Debaryomyces sp.*, *Starmerella sp.*, *Metschnikowia sp.* e *Pichia sp.* hanno tutti attività  $\beta$ -glucosidasi determinando perciò l'idrolisi di glicani con il conseguente rilascio sia della porzione aromatica volatile sia della porzione saccaridica che può essere in questo modo o assorbita dall'ape o utilizzata dai microrganismi stessi come fonte di carbonio (De Vero et al, 2018).

*D. hansenii* e *M. guilliermondii* sono in grado di utilizzare come fonte di carbonio lo xilosio contenuto negli arabinosilani possedendo perciò attività xilanasica.

Per quanto riguarda invece l'attività di biodegradazione xenobiotica si è considerata la capacità di produrre salicinasasi, enzima espresso costantemente da *H. pseudoguilliermondii*, *M. guilliermondii* ed in maniera variabile da *P. kluyveri* e *S. apicola* (Dwdp et al, 2005).

Vitamine ed amminoacidi sono essenziali per l'ape soprattutto nel periodo invernale dove l'unica alimentazione a disposizione è il miele che possiede solo in tracce questi elementi.

*S. apicola* e *M. chrysoperlae* possiedono nel loro genoma tutti i pathway necessari per la sintesi dei ventuno amminoacidi mentre *S. bombicola*, *P. kudriavzevii* e *M. caribbica* sono in grado di crescere in terreni in assenza di vitamine sottintendendo perciò la loro intrinseca capacità biosintetica.

Per quanto riguarda la capacità dei vari lieviti di produrre molecole bioattive il presente studio si è focalizzato sul dimostrare sperimentalmente questa determinata caratteristica nei lieviti appartenenti al genere *Starmerella sp.* e più specificatamente nelle specie *S. apicola*, *S. bombicola* e *S. kuoi* in virtù della loro capacità in determinate condizioni di produrre il soforolipide.

I lieviti del genere *Starmerella sp.* non sono gli unici a produrre molecole bioattive, il genere *Metschnikowia sp.* è in grado di produrre proteasi acide, pulcherrimina e diversi composti organici volativi (VOCs) in grado di inibire la crescita fungina e batterica mediante diversi meccanismi tra cui il sequestro del ferro contenuto nel mezzo tramite la secrezione extracellulare di pulcherrimina, fondamentale microelemento per il giusto sviluppo microbico (Sipiczki M., 2022).

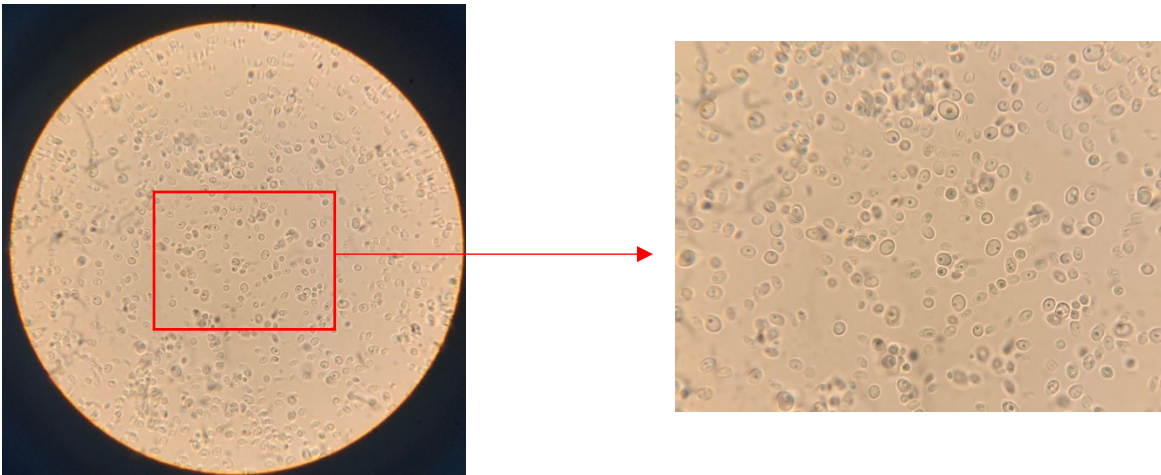


Figura 16 – Vista microscopica 100x ed ingrandimento di *M. chrysoperlae*. Da notare gli accumuli intracellulari di pulcherrimina complessata a ioni  $Fe^{++}$ .

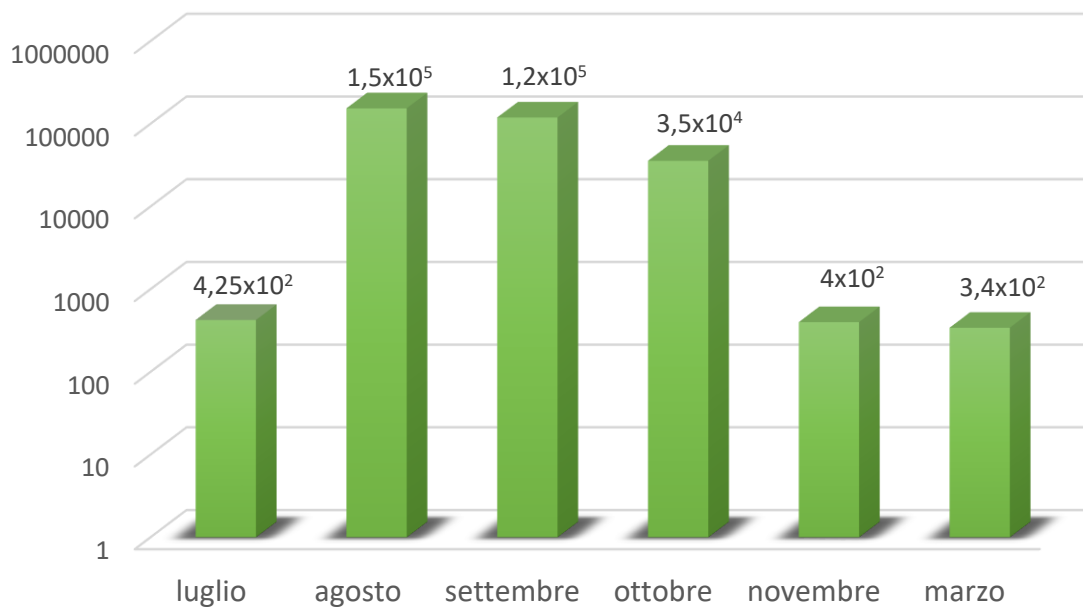


Figura17 – Andamento temporale dei lieviti isolati nell'apparato gastroenterico.

Nella figura 17 sono riportate le concentrazioni in scala logaritmica delle UFC di lieviti isolati all'interno dell'apparato gastroenterico durante i vari mesi in cui questo studio si è articolato. Il dato ottenuto nel mese di luglio è sottostimato in quanto è proprio tramite questo risultato che è stato messo a punto il protocollo di rottura delle pareti gastroenteriche al fine di rilasciare nel mezzo i microrganismi contenuti al suo interno. Tralasciando perciò il mese di luglio negli altri mesi si osserva

un andamento delle specie lievitifforme fedele a quanto riportato anche da Ludvigsen et al, (2021) che mostra la massima concentrazione di lieviti nel mese di agosto diminuisce di poco nel mese di settembre ed ottobre e cala invece drasticamente nei mesi invernali. Questo andamento è dovuto senza dubbio al diverso contatto che ha l'ape con l'ambiente esterno; di fatti nei mesi di agosto, settembre e, per quanto riguarda questo specifico studio, ottobre 2021 il flusso delle api bottinatrici è stato massimo e con esso anche quello dei lieviti all'interno dell'apparato gastroenterico arrivando ad una media di circa 100000 UFC/ape mentre nei mesi di novembre e marzo quando le condizioni meteorologiche non consentivano alle api di uscire ed andare a bottinare fiori le UFC sono scese vertiginosamente fino ad arrivare ad un range di 1000 UFC per ape.

#### ***4.3.4 Lieviti nel polline***

Il polline in questo caso è un alimento che viene ad essere trasportato dal fiore all'alveare dove subirà processi fermentativi controllati al fine di renderlo microbiologicamente stabile e di migliorarne le sue caratteristiche biochimiche.

Dai campioni di polline raccolti nel mese di settembre ed ottobre sono stati isolati 23 ceppi di lievito di cui 17 selezionati per l'identificazione molecolare (sulla base della rappresentatività).



Tabella 11 – Specie lievitiforimi isolate da campioni di polline con relativo numero identificativo e data di isolamento.

SPECIE	ID	DATA	SPECIE	ID	DATA
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	122	26/09/21	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	155	17/10/21
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	162	17/10/21	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	156	17/10/21
<i>Filobasidium chernovii</i>	166	17/10/21	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	159	17/10/21
<i>Filobasidium wieringae</i>	125	26/09/21	<i>Naganishia bhutanensis</i>	152	17/10/21
<i>Filobasidium oeirense</i>	124	26/09/21	<i>Sarocladium strictum</i>	164	17/10/21
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	127	26/09/21	<i>Starmerella apicola</i>	173	17/10/21
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	165	17/10/21	<i>Starmerella apicola</i>	149	17/10/21
<i>Metschnikowia cibodasensis</i>	171	17/10/21	<i>Starmerella apicola</i>	160	17/10/21
<i>Metschnikowia maroccana</i>	126	26/09/21			

Anche in questo caso i risultati sono congrui con quanto riportato in letteratura, molti dei lieviti isolati sono tipici dell'ambiente floreale. Decisivo sotto questo aspetto anche il ritrovamento di *M. reukaufii*, noto lievito fermentante fondamentale per impartire il giusto profilo aromatico al fiore al fine di attirare il maggior numero di api. Il polline ed il suo prodotto di fermentazione, il pane d'api, sono dei campioni di analisi discriminanti in quanto potrebbero essere visti come substrati che collegano due diversi ecosistemi microbiologici; i rispettivi micobiomi infatti sono un mosaico di lieviti floreali e lieviti appartenenti al mondo delle api che interagiscono gli uni con gli altri creando sempre nuove combinazioni ed apportando variabilità ecologica in uno e nell'altro mondo in armonia con le condizioni ambientali circostanti che fungono sempre da filtro selettivo.

#### 4.3.5 Lieviti nel pane d'api

I ceppi isolati dal pane d'api ed identificati a livello di specie sono stati 26.

Tabella 12 – Specie lievitiforimi isolate da campioni di pane d'api con relativo numero identificativo e data di isolamento.

SPECIE	ID	DATA	SPECIE	ID	DATA
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	147	17/10/21	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	22	26/08/21
<i>Bullera alba</i>	119	26/09/21	<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	82	26/08/21
<i>Debaryomyces hansenii</i>	83	26/08/21	<i>Starmerella batistae</i>	23	26/08/21
<i>Debaryomyces hansenii</i>	25	26/08/21	<i>Starmerella bombicola</i>	2	12/07/21
<i>Debaryomyces hansenii</i>	24	26/08/21	<i>Starmerella bombicola</i>	3	12/07/21
<i>Filobasidium chernovii</i>	80	26/08/21	<i>Starmerella floricola</i>	27	26/08/21
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	118	26/09/21	<i>Starmerella khaoyaiensis</i>	81	26/08/21
<i>Filobasidium oeirense</i>	111	26/09/21	<i>Starmerella khaoyaiensis</i>	8	12/07/21
<i>Lachancea thermotolerans</i>	21	26/08/21	<i>Ustilago shanxiensis</i>	169	17/10/21
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	112	26/09/21	<i>Yarrowia galli</i>	33	26/08/21
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	100	26/09/21	<i>Yarrowia galli</i>	41	26/08/21
<i>Metschnikowia cibodasensis</i>	107	26/09/21	<i>Yarrowia galli</i>	42	26/08/21
<i>Metschnikowia cibodasensis</i>	109	26/09/21	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	117	26/09/21
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	22	24/08/21			

Dal momento in cui il pane d'api è il frutto di un laborioso processo fermentativo a partire dal polline non ci si è stupiti delle somiglianze a livello di popolazione lievitiforime osservate confrontando i risultati ottenuti. Sono stati infatti ritrovati in entrambe le matrici il genere *Metschnikowia sp.*, *Starmerella sp.*, *Meyerozyma sp.*, *Filobasidium sp.* e *Aureobasidium sp.* anche se in diversa concentrazione. Non sembrano passare invece il filtro naturale esercitato dal diverso habitat generato a seguito della fermentazione il genere *Cystofilobasidium sp.*, *Sarclocladium sp.*, e *Naganisha sp.* che non sono ritrovati nel pane d'api ma solo nel polline.

Tuttavia, il pane d'api non sembrerebbe essere un habitat troppo inospitale dandosi che supporta la crescita di altri generi di lievito oltre a quelli citati sopra come *Zygosaccharomyces sp.*, *Yarrowia sp.*, *Lachancea sp.*, *Ustilago sp.*, *Bullera sp.* e *Debaryomyces sp.*

Questi sei generi sono stati isolati soltanto in campioni di pane d'api molto probabilmente perché è l'ape stessa che "contamina" il polline con i microrganismi contenuti all'interno della propria borsa melaria durante le fasi iniziali del processo di produzione dell'alimento. A conferma di questo il genere *Lachancea sp.*, *Yarrowia sp.* e *Debaryomyces sp.* sono stati isolati esclusivamente dall'apparato gastroenterico dell'insetto.

*Ustilago* è un genere di funghi Basidiomiceti. Comprende più di 200 specie, parassite di piante erbacee. Alcune specie attaccano i cereali, causando la malattia conosciuta come "carbone" (Kurtzman et al, 2011; Wada et al, 2021). Anche il genere *Ustilago sp.*, è stato ritrovato all'interno dell'apparato gastroenterico dell'ape ma nella sua forma vegetativa a riproduzione asessuata: *Pseudozyma sp.*

Il genere *Bullera sp.* e *Zygosaccharomyces sp.* invece non sono stati trovati, almeno in questo studio, in nessun'altro campione se non quello di pane d'api per quanto riguarda il genere *Zygosaccharomyces sp.* anche se ci sono prove in cui alcuni lieviti appartenenti a tale genere (Detry et al, 2020), sono stati effettivamente trovati nell'apparato gastrointestinale dell'ape mentre la specie *B. alba* oltre ad essere un componente importante della fillosfera è stata isolata anche in escrementi di insetto ipotizzando perciò la sua eventuale presenza anche nell'apparato gastroenterico dell'ape (Kurtzman et al, 2011).

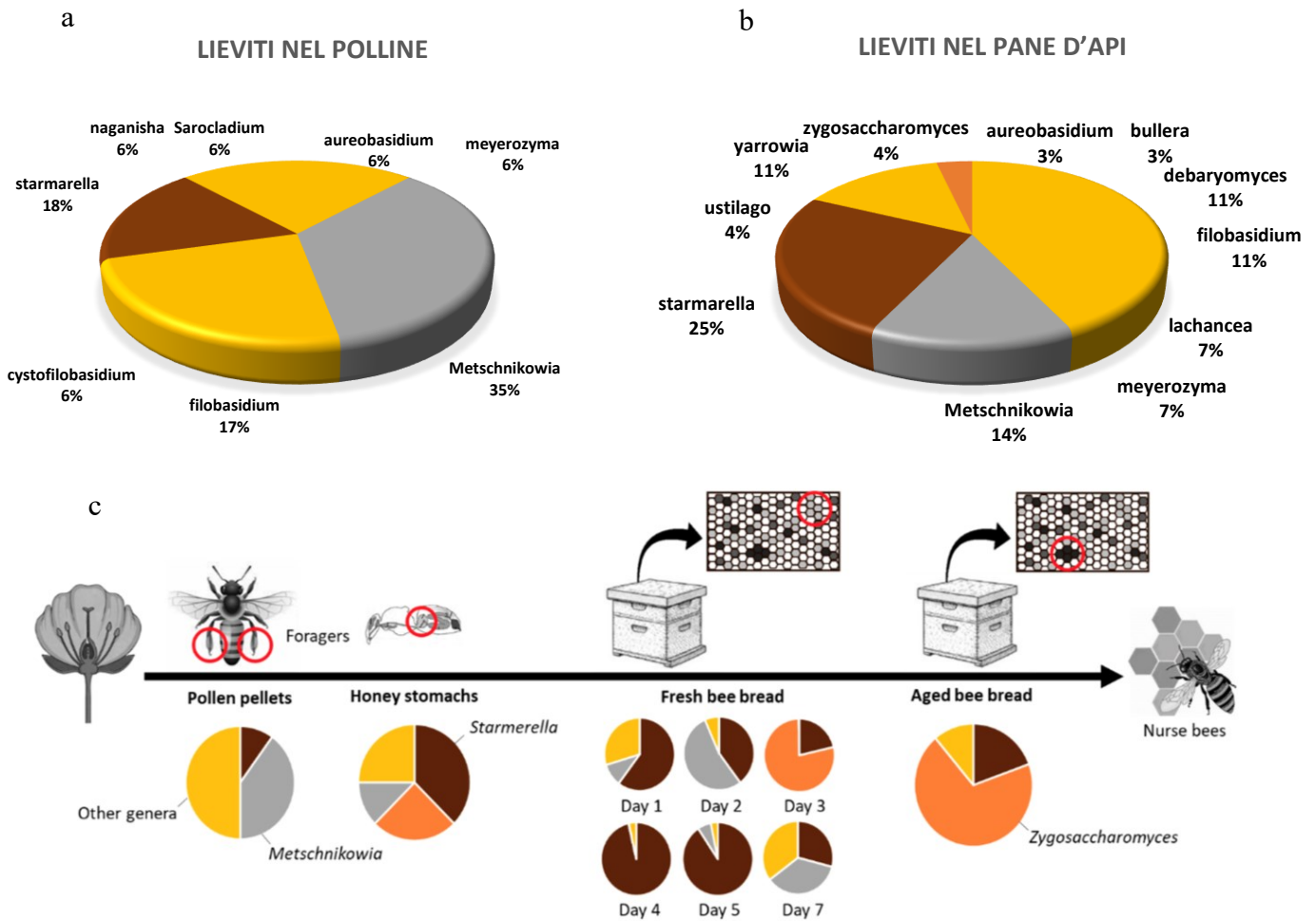


Figura 18 - Confronto tra i risultati ottenuti e quelli ottenuti da un altro studio. a) lieviti e relative concentrazioni nei campioni di polline; b) lieviti e relative concentrazioni nei campioni di pane d'api analizzati; c) immagine presa da Detry et al, (2020) che mette in relazione i generi *Metschnikowia sp.*, *Starmerella sp.*, e *Zygosaccharomyces sp.* e le loro rispettive concentrazioni in campioni di polline d'api, stomaco e pane d'api a diversa maturazione.

Sono stati confrontati i lieviti isolati nel presente studio rispettivamente nel polline e nel pane d'api con quelli ottenuti da Detry et al, (2020) sulle stesse matrici. I nostri risultati sono mostrati mediante un diagramma a torta ed i colori relativi ai diversi generi di lievito sono stati ripresi, per una più facile comprensione, dallo studio sopra citato.

Detry et al, (2021) mette in relazione le principali specie lievitiforimi isolate nel pane d'api a diversi giorni di maturazione con quelle trovate invece nel polline e nella sacca melaria dell'ape concludendo che il genere maggioritario nel polline è *Metschnikowia sp.* seguito dai lieviti appartenenti al genere *Starmerella sp.*, nel pane d'api fresco a dominare è principalmente il genere *Starmerella sp.*, in quello invecchiato invece è il genere *Zygosaccharomyces sp.*

Inoltre, si può notare come c'è un andamento molto simile in quanto nel polline il genere *Metschnikowia sp.* è effettivamente quello trovato in maggiori concentrazioni (35%) seguito poi dai lieviti del genere *Starmerella sp.* (18%); trend che viene ad essere invertito a livello di pane d'api dove si assiste ad una concentrazione dei lieviti appartenenti al genere *Starmerella sp.* che raggiungono il 25% dei ceppi isolati ed una diminuzione invece del genere *Metschnikowia sp.* che viene ad essere ritrovato in una concentrazione del 14%. Da sottolineare una leggera discrepanza per quanto riguarda i lieviti del genere *Zygosaccharomyces sp.* in cui nel nostro studio sono stati trovati in bassissime concentrazioni, è di fatti stato isolato un unico ceppo di *Z. rouxii*. Questa anomalia potrebbe essere riconducibile al fatto che i campionamenti di pane d'api sono stati eseguiti nei mesi estivi dove c'è un rapido consumo di quest'ultimo all'interno dell'alveare limitando fortemente le probabilità di poter trovare pane d'api invecchiato nei favi considerando inoltre la stagione di carestia che le api hanno dovuto fronteggiare.

Altri lieviti ritrovati sia nel polline che nel pane d'api in concentrazioni rispettivamente del 6% e 7% appartengono al genere *Meyerozyma sp.* Osservando l'andamento delle UFC dello stesso genere di lievito tra il polline e il pane d'api si può osservare come i generi appartenenti al mondo floreale come *Filobasidium sp.* e *Aureobasidium sp.* scendano di concentrazione intuendo perciò un loro ruolo, se presente, prettamente marginale mentre il genere *Meyerozyma sp.* si concentra nel pane d'api avanzando perciò l'ipotesi che effettivamente possa avere, insieme a *Metschnikowia sp.* e *Starmerella sp.* un ruolo attivo all'interno del processo.

Ricerche sulla fisiologia e biochimica delle singole specie appartenenti ai generi *Metschnikowia sp.*, *Starmerella sp.*, *Meyerozyma sp.* e *Zygosaccharomyces sp.* ritrovate nel pane d'api mostrano come la maggior parte di loro, ad esclusione di *M. guillermondi*, non sono in grado di crescere in terreni contenenti DL-Lattato come unica fonte di carbonio avvalorando ancora di più l'ipotesi che questi generi lievitiforimi, non interferendo sulla conservazione dell'alimento, vadano a far parte delle specie microbiche attive durante la fermentazione eterolattica. Un'ulteriore prova di quanto detto è data anche dalla capacità che hanno tutte le singole specie del genere *Meyerozyma sp.* e *Metschnikowia sp.*

di produrre cellulobiasi fondamentali per la degradazione della cellulosa, principale ostacolo al rilascio di nutrienti da parte del polline. *S. bombicola* e *M. pulcherrima* sono in grado di crescere in un terreno senza la presenza di amminoacidi e *Y. galli* invece in un terreno in assenza di vitamine, elementi che possono perciò essere sintetizzati ed apportati nel mezzo per essere poi o utilizzati dai batteri lattici o assimilati dall'insetto (Kurtzman et al, 2011).

#### 4.3.6 Lieviti nella propoli

Sono stati 7 i ceppi di lievito isolati nella propoli e 5 sono stati caratterizzati a livello di specie.

Tabella 13 – Specie lievitiformenti isolate da campioni di propoli con relativo numero identificativo e data di isolamento.

SPECIE	ID	DATA
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	170	26/09/21
<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	29	24/08/21
<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	31	24/08/21
<i>Pichia terricola</i>	158	17/10/21
<i>Saccharothecium rubi</i>	157	17/10/21

Il ritrovamento di cinque specie diverse nei campioni polline è stato abbastanza inaspettato considerando che la propoli è da sempre conosciuta per le sue caratteristiche antibatteriche ed antifungine dovute a particolari molecole naturali presenti nelle resine delle piante da cui questo prodotto deriva (Dias et al, 2008). Il ritrovamento dei lieviti del genere *Meyerozyma sp.*, *Metschnikowia sp.* e *Pichia sp.* potrebbe essere ricollegato alle modalità con cui essa viene ad essere prelevata dall'ambiente, trasportata nell'alveare ed al suo interno ulteriormente lavorata. Le gemme di resine vegetali vengono ad essere letteralmente staccate mediante le mandibole dell'ape, trasportate poi nelle stesse modificazioni anatomiche dove normalmente vengono posizionate le palline di polline amalgamate con secrezioni salivari e nell'alveare nuovamente rimaneggiate. In tutti e tre i

passaggi l'ape può contaminare la futura propoli infatti le mandibole fanno parte dell'apparato boccale e quindi tutti i microrganismi che in qualche modo vi transitano possono potenzialmente essere immessi nelle gemme durante la raccolta, nelle corbicole utilizzate per trasportare il polline probabilmente alcuni lieviti potrebbero essere rimasti sulla zampa dell'animale andando perciò a trasferirsi nel nuovo materiale lì stoccato ed infine l'ultima modalità di contaminazione è il rimodellamento della propoli all'interno dell'alveare da parte delle api cementatrici. Effettivamente *M. ziziphicola* è stata ritrovata sia in un fiore che nel pane d'api confermando l'idea che essa si sia trasferita nella propoli nel momento in cui è stata poggiata nelle corbicole mentre la modalità di passaggio di *M. guilliermondii* nel prodotto cementizio potrebbe essere stata quella tramite il contatto delle api stesse e dei loro apparati boccali essendo, questo specifico lievito, isolato molte volte all'interno dell'apparato gastroenterico. La specie *P. terricola* invece non è stata ritrovata in nessun'altro campione analizzato ma il genere *Pichia sp.* sembrerebbe essere abbastanza presente nel microbioma gastroenterico dell'ape riconducendo a questa fonte l'ipotetica origine.

Altro lievito isolato solo in questa matrice è *S. rubi* quindi si potrebbe avanzare l'idea che sia un lievito ambientale che già era presente nelle gemme resinose ancor prima che l'ape decidesse di utilizzarle per produrre propoli come confermato dal suo ritrovamento in piante di corbezzolo associato ad altri funghi ambientali come *A. pullulans*, *Aspergillus carbonarius*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium brevicompactum* (Domingues et al, 2021).

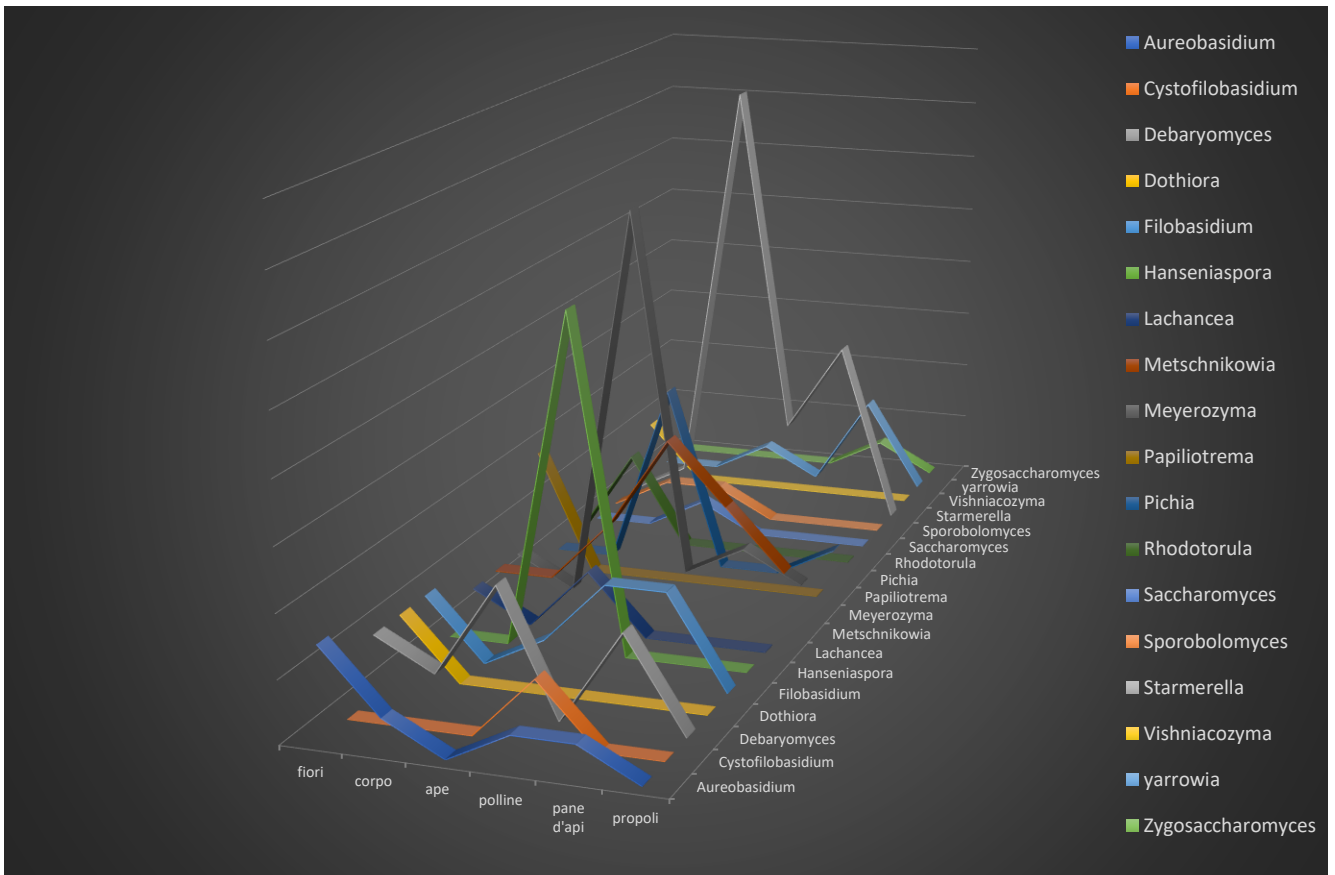


Figura 19 – Flusso dei generi lievitiforimi maggioritari nell’ambiente.

La figura 19 rappresenta un quadro generale di come i diversi generi di lievito si distribuiscono nell’ambiente ponendo particolar enfasi a come lo stesso genere può colonizzare stabilmente gli ambienti più diversi a partite dal fiore e sopravvivere fino ad arrivare all’apparato gastroenterico dell’ape grazie all’enorme variabilità metabolica che caratterizza da sempre le specie fungine.



## CAPITOLO 5: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Le api rappresentano da sempre l'emblema del mondo naturale ed il loro studio rappresenta un mezzo per monitorare l'ambiente in cui esse vivono. A testimonianza della stretta dipendenza dell'ape ad un ecosistema sano si è visto negli ultimi decenni un deperimento delle colonie in tutto il mondo causato da uno stile di vita umano totalmente errato e non sostenibile. In questo studio è stato analizzato il celato mondo microbiologico, con particolare attenzione a quello dei lieviti, che governa ogni essere vivente e le sue interazioni con l'ambiente che lo circonda. Il ruolo dei lieviti all'interno del mondo delle api fino ad ora è stato poco indagato concentrandosi diversamente da quanto invece pubblicato sui batteri. Tuttavia, anche le specie lievitiformenti sono parte integrante di un corretto equilibrio ape ambiente; a conferma di ciò è noto come i lieviti all'interno del nettare producano mediante il loro metabolismo fermentativo essenziali molecole volatili (VOCs) che arricchiscono il profilo aromatico generato dalle piante entomofile stesse al fine di richiamare gli insetti impollinatori tra cui l'*A. mellifera*.

Nel presente studio sono stati isolati lieviti nei fiori nettariiferi che possiedono questa importante caratteristica ed è stato inoltre visto come è presente un profondo e continuo scambio di questi tra l'ape e l'ambiente. È stato poi osservato come alcuni di questi lieviti ambientali nel corso di scale temporali stagionali abbiano sviluppato meccanismi adattativi per integrarsi stabilmente nel sistema sociale che caratterizza l'ape fino ad instaurare con quest'ultima un rapporto simbiotico. Il primo ruolo esercitato dai lieviti nel mondo dell'ape è senza dubbio quello di intervenire attivamente nel processo fermentativo di conversione del polline a pane d'api, prodotto fondamentale per un giusto sviluppo della colonia.

Diverse specie di lievito sono state ritrovate anche a livello di apparato gastroenterico, molte delle quali solo transitoriamente presenti e specchio della comunità lievitiformenti di quel momento temporale e spaziale. Studi di ecologia ambientale perciò possono essere fatti andando a studiare i lieviti presenti all'interno dell'apparato gastroenterico di api stanziate in diversi luoghi nel mondo

escludendo da questa indagine invece quelle specie che sembrerebbero aver trovato un ambiente stabile in cui proliferare instaurando un rapporto, a favore dell'ape, sia con il core gut microbioma batterico che con l'ape stessa. Alla luce dei risultati ottenuti i migliori candidati che potrebbero rivestire questo ruolo sono lieviti appartenenti al genere *Debaryomyces sp.*, *Meyerozyma sp.*, *Metschnikowia sp.*, *Hanseniaspora sp.*, *Pichia sp.* e *Starmerella sp.* in quanto ritrovati costantemente in diversi periodi dell'anno nell'apparato gastroenterico di api non appartenenti alla stessa famiglia, molto probabilmente attivi nel processo di fermentazione del polline, isolati nella propoli che per le sue caratteristiche intrinseche non favorirebbe la loro crescita avanzando perciò l'idea che abbiano evoluto nel tempo dei pattern molecolari in grado di renderli resistenti alle molecole antifungine presenti a seguito della loro stretta e perpetua presenza all'interno dell'alveare ed infine rinvenuti anche in due campioni di *Varroa d.* Il ritrovamento di *M. cibodasensis* e *S. khaoyaiensis* sulla superficie corporea del parassita ci da un'ulteriore prova indiretta della costanza di questi lieviti all'interno dell'alveare e quindi di un loro ipotetico ruolo attivo.

Tramite questo studio ecologico sono state rilevate alcune delle conseguenze del cambiamento climatico e come esso abbia perturbato la popolazione apistica direttamente ed indirettamente. L'anno 2021 è stato caratterizzato da mesi invernali relativamente caldi seguiti da una terribile gelata tardiva nel mese di maggio che ha portato alla perdita dei fiori di acacia (*Robinia pseudoacacia*), fondamentale fonte nettarifera necessaria per una giusta preparazione della colonia alla stagione estiva. I mesi di giugno e luglio hanno registrato temperature ben superiori alla media accompagnate da totale assenza di pioggia nel mese di luglio come testimoniato anche dall'indice SPI-12 relativo alla regione Marche (fonte ASSAM report 2021) tanto che i fiori analizzati risultarono essere parzialmente sterili con conseguenze drastiche anche per le api che non hanno importato abbastanza nettare e polline, importanti più che mai per sostenere una covata della portata dei mesi estivi, e con essi neanche tutti i microrganismi che anche se per lo più transitori, si è visto essere in grado di contribuire positivamente alla salute dell'insetto. Per chiarire quanto la stagione estiva 2021 sia stata

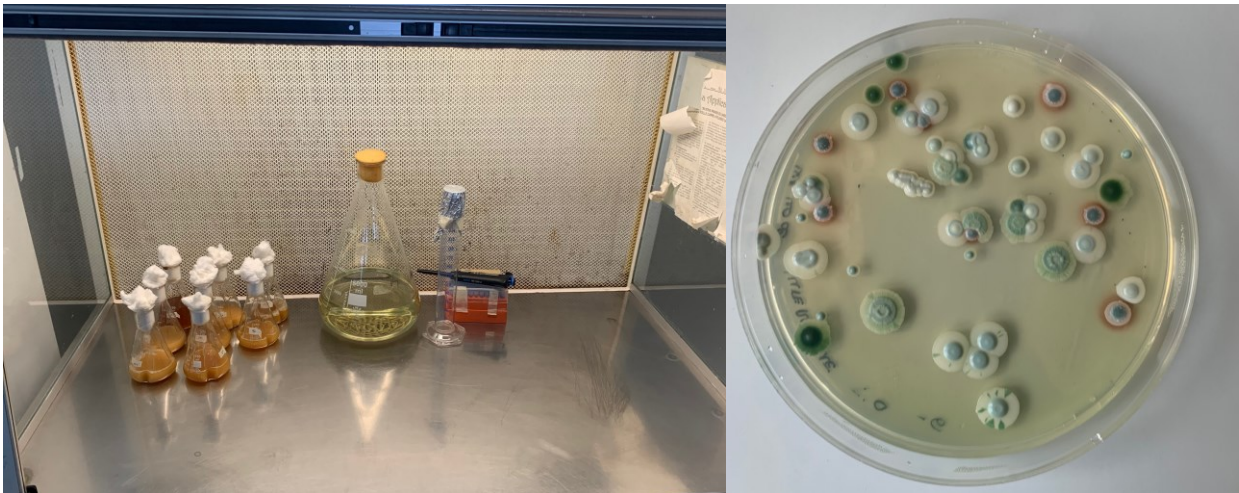
pessima molte famiglie non sostenute mediante alimentazione artificiale dagli apicoltori sono giunte a morte.

Come testimonianza di una graduale ma effettiva transizione da un clima tipico della macchia mediterranea ad un clima sub-tropicale è anche il ritrovamento di alcune specie di lievito caratteristiche dei climi tropicali come *M. caribbica* che prende il proprio nome dai Caraibi, luogo dove per la prima volta è stata isolata, *S. neotropicalis* e una variante di *A. pullulans* denominata *A. namibiae* il quale nome deriva, anche in questo caso, dal deserto del Namib un'ecoregione desertica della Namibia dove per primo è stato isolato.

In conclusione, da questo studio sono emerse informazioni riguardo il flusso di specie lievitiformenti all'interno dell'ambiente sottolineando come mondi apparentemente diversi come quello vegetale ed animale siano invece collegati strettamente tra loro ed interdipendenti l'uno dall'altro. È stato palesata anche la complessa variabilità ecologica di cui il nostro ecosistema è munito ma anche come essa è facilmente perturbabile a seguito di diversi fattori abiotici e biotici come l'utilizzo di pesticidi in agricoltura ed il surriscaldamento globale. Senza dubbio i lieviti, grazie all'enorme ventaglio di patterns metabolici che possiedono e alla loro capacità di sopravvivere e proliferare in ambienti non permissivi come quelli caratterizzati da alte pressioni osmotiche sono un supporto importante per l'ape fino ad oggi sottovalutato perciò questo studio potrebbe aprire le porte a nuove ricerche sia in questo specifico ambito ma anche in ambito biotecnologico ed umano sfruttando le singole specie lievitiformenti come potenziali probiotici.

## PROSPETTIVE FUTURE

Alla luce di un potenziale ruolo positivo dei lieviti all'interno dell'apparato gastroenterico dell'ape paragonabile a quello esercitato dal *core gut microbioma* si è idealmente ipotizzato di formulare un supporto microbico a base di lieviti vivi da somministrare alle famiglie di api attraverso l'alimentazione artificiale effettuata nei mesi primaverili, con lo scopo di unire esigenze nutrizionali addizionali e implementare la microflora lievitifforme del microbioma, sfruttando le conoscenze assunte dopo questo studio.



## BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Pérez S., Lievens B., Fukami T. (2019) Yeast–Bacterium Interactions: The Next Frontier in Nectar Research.
- Callegari M., Crotti E., Fusi M., Marasco R., Gonella E., De Noni I., Romano D., Borin S., Tsiamis G., Cherif A., Alma A. and Daffonchio D. (2021) Compartmentalization of bacterial and fungal microbiomes in the gut of adult honeybees.
- Characterization of the Kenyan Honey Bee (*Apis mellifera*) Gut Microbiota: A First Look at Tropical and Sub-Saharan African Bee Associated Microbiomes.
- CONAPI, (2015) Gli apicoltori di CONAPI sul treno verde di legambiente.
- Contessi A. (2016) Le api. Biologia, allevamento, prodotti. Edizione Edagricole-new business media.
- De Clercq V., Roelants S.L.K.W., Castelein M.G, De Maeseneire S.L. e Soetaert W.K. (2021) Elucidation of the Natural Function of Sophorolipids Produced by *Starmerella bombicola*.
- De Vero L., Bonciani T., Verspoh A. e Giudici P., (2018) Screening dell'attività  $\beta$ -glucosidasica in ceppi di *Saccharomyces* spp. isolati da mosto.
- Detry R., Simon-Delso N., Bruneau E. e Daniel H-M. (2020) Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation.
- Dias S.M.D.; Gomes R.T.; Santiago W.K.; Paula A.M.B.; Cortés M.E. e Santos V.R., (2008) Antifungal activity of commercial ethanolic and aqueous extracts of Brazilian propolis against *Candida* spp.
- Domingues J., Delgado F., Goncalves J.C., Santos Pintado C. (2021) Essential Oils of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* as Antifungal Agent against Fungi from Strawberry Tree Fruit.
- Dowd P.F., Vega F.E, (2005) The Role of Yeasts as Insect Endosymbionts.
- Draft Genome Sequence of a Basidiomycetous Yeast, *Ustilago shanxiensis* CBS 10075, Which Produces Mannosylerythritol Lipids (2021) Keisuke Wada Hideaki Koike, Tomotake Morita.

- El Khoury S., Rousseau A., Lecoeur A., Cheaib B., Bouslama S., Mercier P., Demey V., Castex M., Giovenazzo P., e Derome N. (2018) Deleterious Interaction Between Honeybees (*Apis mellifera*) and its Microsporidian Intracellular Parasite *Nosema ceranae* Was Mitigated by Administrating Either Endogenous or Allochthonous Gut Microbiota Strains.
- Engel P., Bartlett K.D., Moran N.A. (2015) The Bacterium *Frischella perrara* Causes Scab Formation in the Gut of its Honeybee Host.
- Filippini F. (2009-2020) Allineamento di sequenze di DNA e proteine: possibilità, limiti ed interpretazione.
- Flávia K Tobaldini-Valerio, Patricia S Bonfim-Mendonça, Helen C Rosseto, Marcos L Bruschi, Mariana Henriques, Melyssa Negri, Sonia Silva & Terezinha IE Svidzinski (2016) Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections.
- Franca L. T. C, Carrilho E. Tarso B. L. Kist (2002) A review of DNA sequencing techniques.
- Guilliermond A. 1920. The yeasts. Translated by Tanner FW. London: Chapman and Hall.
- Hamba Tola Y., Wahura Waweru J., D. D. Hurst G.D.D., Slippers B., e Paredes J.C., (2020) Presence of yeasts in floral nectar is consistent with the hypothesis of microbial-mediated signaling in plant-pollinator interactions.
- Hector F., Castro H.F., Classen A.T., Austin E.E., Norby R.J. e Schadt C. W. (2010) Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers.
- Heintz-Buschart A. e Paul Wilmes P. (2017) Human Gut Microbiome: Function Matters *Anna*.
- Herrera C.M., De Vega C., Canto A. e María I. Pozo M.I. (2009) Yeasts in floral nectar: a quantitative survey.
- J. D. Ackerman, Abiotic pollen and pollination: Ecological, functional, and evolutionary perspectives, in *Plant Systematics and Evolution*, vol. 222, n. 1-4, 2000, pp. 167–185.
- Jones A.K., Raymond-Delpech V., Thany S.H., Gauthier M. e David B. Sattelle D.B (2006) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*.

- Kakumanu M.L., Reeves A.M., Anderson T.D., Rodrigues R.R., e Williams M.A. (2016) Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures.
- Klaps J., Bart Lievens B., Álvarez-Pérez S. (2020) Towards a better understanding of the role of nectar-inhabiting yeasts in plant–animal interactions.
- Knop M. (2011) Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations.
- Kurtzman C.P., Jack W., Boekhout T. (2011) The Yeasts, a Taxonomic Study.
- Loglio G. Campionare il pane d’api per uso alimentare o per esami di laboratorio, numero 3/2018 argomenti.
- Ludvigsen, J., Andersen Å., Hjeljord L. e Rudi K. (2021) The Honeybee Gut Mycobiota Cluster by Season versus the Microbiota which Cluster by Gut Segment. (Ludvigsen, J., 2021).
- Navajas M., Le Conte Y. (2008) Climate change: Impact on honey bee populations and disease *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics).
- Nectar-inhabiting microorganisms influence nectar volatile composition and attractiveness to a generalist pollinator (2017) Rering C., Beck J., Hall G.W., McCartney M., Vannette R.
- Nicolson S.W. (2011) Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two.
- Oro L., Feliziani E., Ciani M., Romanazzi G. e Comitini F. (2018) Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries.
- Parachnowitsch A.L., Manson J.S., Sletvold N. (2019) Evolutionary ecology of nectar.
- Pozo M.I., De Vega C., Canto A. e Herrera C.M. (2009) Presence of yeasts in floral nectar is consistent with the hypothesis of microbial-mediated signaling in plant-pollinator interactions.
- Raymann K., Shaffer Z. e Moran N.A. (2017) Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees.

- Reitmayer C.M., Ryalls J.M.W., Farthing E., Jackson C.W., Girling R.D. e Newman T.A. (2019) Acute exposure to diesel exhaust induces central nervous system stress and altered learning and memory in honey bees.
- Rering C.C., Beck J.J., Hall G.W., McCartney M.M. e Vannette R.L. (2018) Nectar-inhabiting microorganisms influence nectar volatile composition and attractiveness to a generalist pollinator.
- Rinnan R., Michelsen A., Bååth E., Jonasson S., (2006) Fifteen years of climate change manipulations alter soil microbial communities in a subarctic heath ecosystem.
- Sandhu D.K. e Waraich M.K. (1985) Yeasts Associated with Pollinating Bees and Flower Nectar.
- Santos M.T., e Yokoya, F. (1993) Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of fermentation and bioengineering*.
- Silli V., Bellucci V. (2019) il ruolo delle api per l'uomo e l'ambiente. Istituto superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale.
- Simone-Finstrom M., Marla Spivak M., (2010) Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees.
- Sipiczki M., (2022) Taxonomic Revision of the pulcherrima Clade of *Metschnikowia* (Fungi): Merger of Species.
- Szczesna, T. Honeybee-Collected Pollen. *J. Apic. Sci.* 2007, 51, 15–22.
- Tauber J.P., Nguyen V., Lopez D. Evans J.D. (2019) Effects of a Resident Yeast from the Honeybee Gut on Immunity, Microbiota, and *Nosema* Disease.
- Urcan A.C., Criste A.D., Dezmirean D.S., Mărgăoan R., Caeiro A. e Campos M.G. (2018) Similarity of Data from Bee Bread with the Same Taxa Collected in India and Romania
- Vega, F. E. & Dowd, P. F. (2005) *The role of yeasts as insect endosymbionts.* (Oxford University Press.
- Wada K., Koike H. e Morita T. (2021) Draft Genome Sequence of a Basidiomycetous Yeast, *Ustilago shanxiensis* CBS 10075, Which Produces Mannosylerythritol Lipids.



Waldan K. Kwong and Nancy A. Moran (2016) Gut microbial communities of social bees.

Yun J., Mi-Ja Jung M., Pil Soo Kim P.S., e Bae J-W., (2018) Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee.

Zheng H., Powella E., Steelea M., Dietrichb C., and Morana N. (2017) Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling.

Zuluaga C.M., Serrato J.C. e Quicazan M.C. (2015) Chemical, Nutritional and Bioactive Characterization of Colombian Bee-Bread.

## **RINGRAZIAMENTI**

*Ringrazio di cuore tutta la mia famiglia, la mia migliore amica ed il mio fidanzato che sempre hanno trovato il modo di sostenermi. Ringrazio inoltre tutti i membri del gruppo di ricerca con cui ho avuto la fortuna e l'onore di lavorare, con un ringraziamento speciale alla Professoressa Francesca Comitini senza la quale questa tesi non sarebbe esistita ed alla Dottoressa Alice Agarbati che mi ha insegnato tutto.*