

DOTT. GIORGIO CELLI - PROF. GIULIA GIORDANI

Assistente nell'Istituto di Entomologia dell'Università di Bologna - Assistente nell'Istituto di Zooculture
dell'Università di Bologna

Ricerche sull'attività del *Bacillus thuringiensis* Berliner in riguardo all'*Apis mellifera* L.

I° Contributo (1)

(Studi del Gruppo di lavoro del C.N.R.
per la lotta integrata contro i nemici animali delle piante. IV)

Notizie introduttive.

Nel quadro vastissimo degli studi sui metodi atti a combattere i fitofagi dannosi un posto di rilievo occupa, da una ventina di anni a questa parte, la cosiddetta « lotta microbiologica ».

L'idea di limitare il numero degli insetti ricorrendo a specifici microrganismi patogeni è in realtà tutt'altro che nuova e nella letteratura si trovano descritti, a partire dalla fine del secolo scorso (2), numerosi tentativi del genere, i quali rimasero però sostanzialmente finì a sè stessi e non oltrepassarono le mura dei laboratori per trovare applicazioni pratiche di effettivo interesse. Presumibilmente questi mezzi di lotta potenziali furono trascurati anche e soprattutto per il formidabile successo degli insetticidi chimici che ad un certo momento, tra il 1940 ed il 1950, sembrarono avere risolto in pieno e felicemente tutti i problemi del settore. Allorchè tali ottimistiche ed incaute previsioni furono smentite dai fatti, l'attenzione degli studiosi si accentrò sul nuovo strumento a disposizione, che prometteva favorevoli sviluppi. Si ebbe così un grande impulso di quella branca relativamente giovane della Entomologia che è la patologia degli insetti, intesa soprattutto come ricerca e sfruttamento dei microrganismi ausiliari dell'uomo in quanto agenti di distruzione della entomofauna nociva.

I microrganismi sperimentati allo scopo sono sistematicamente suddivisi in sei gruppi, appartenenti al mondo vegetale ed animale: Virus, Ric-

(1) Le indagini istopatologiche sono opera della prof.ssa G. GIORDANI; le prove di mortalità e le esperienze di campo e di serra sono state condotte dal dott. G. CELLI.

(2) I primi barlumi dell'idea si possono addirittura rintracciare nel famoso lavoro di AGOSTINO BASSI sul « calcino », uscito nel 1834.

kettsie, Batteri, Funghi, Protozoi e Nematodi⁽¹⁾. A questi vanno aggiunte alcune Alghe. Oggi sono in complesso note 250 specie di Virus, 20 di Rickettsie, 80 di Batteri, 460 di Funghi, 250 di Protozoi ed oltre 100 di Nematodi in grado di uccidere gli insetti ospiti. Di queste solo il 9% sono state provate sul campo, con alterne vicende: il che illustra a sufficienza a quale ricco serbatoio sia possibile attingere e conforta nella speranza di ottenere in futuro gli ottimi risultati preconizzati con eccessivo e forse intempestivo entusiasmo nel recente passato, e finora non raggiunti.

I Batteri sono indubbiamente ed obiettivamente i più importanti, per molteplici ragioni: non ultima quella che possono essere agevolmente coltivati in substrati sintetici e prodotti industrialmente, sì da essere disponibili, a prezzi ragionevoli se non modesti, nella quantità desiderata e nella forma appropriata, al momento opportuno. Proprio deficienze del genere sembrano essere i maggiori ostacoli allo sfruttamento su larga scala delle virosi, considerate da taluno i migliori agenti potenziali di trattamento microbiologico.

Tra i numerosi batteri associati agli esapodi, gli unici presi in considerazione per l'impiego sul campo sono taluni sporigeni, appartenenti al gen. *Bacillus*. Essi si possono dividere, con criteri utilitari, in due categorie: quelli affini al *B. popilliae* Dutky e quelli affini al *B. cereus* Frankland e Frankland e al *B. thuringiensis* Berliner.

I primi provocano una setticemia letale, la così detta « milky disease », del nefasto Coleottero Scarabeide *Popillia japonica* Newman e di altri Scarabeidi allo stato larvale. La loro utilizzazione, secondo una tecnica appositamente messa a punto, costituisce l'esempio più brillante di duraturo successo che l'uomo possa vantare nella battaglia condotta contro gli insetti mediante germi entomopatogeni.

Il *B. cereus*, comune saprofita del suolo, è stato spesso isolato da insetti ammalati ma le poche prove in campagna sono apparse ampiamente deludenti. Da rilevare, tuttavia, che esso è risultato patogeno per *Pristiphora erichsonii* Hartig (HEIMPEL, 1954, 1955, 1961), primo caso di Imenottero sensibile a questo bacillo.

Ben altra importanza riveste il *B. thuringiensis*, capostipite dei così detti « Batteri cristalliferi », che sono stati isolati solo da insetti e le cui vittime di elezione sono le larve di Lepidotteri.

Sulla posizione tassonomica di *B. cereus* e *B. thuringiensis*, nonchè di vari ceppi analoghi isolati nel tempo da diversi Autori, esistono una certa confusione e disparità di vedute. Secondo alcuni (TOUMANOFF, 1952; TOUMANOFF e COLL., 1955; TOUMANOFF e LE COROLLER, 1959), tutti questi bacilli non sono che varietà di *B. cereus*, mentre per altri (STEINHAUS e JERREL, 1954;

⁽¹⁾ È chiaro che i Nematodi non sono microrganismi; per comodità tuttavia si suole annoverarli, seguendo la terminologia anglosassone, tra gli agenti della lotta microbica.

DELAPORTE e BEGUIN, 1955; HEIMPEL e ANGUS, 1958, 1960 a, b; KRIEG, 1961) *B. thuringiensis* costituisce una specie a sé stante, cui si debbono attribuire le varietà *thuringiensis* Berliner, sotto Ishawata, *alesti* Toumanoff e Vago, *dendrolimus* Talalaev, i ceppi « Mattes », « Anduze », ecc., e cui è strettamente correlata la specie *B. entomocidus* Heimpel e Angus con le sue varietà.

Quest'ultima nomenclatura è la più generalmente accettata e si fonda sulla caratteristica produzione, da parte degli organismi interessati, di inclusioni cristalline, proprietà non posseduta da *B. cereus* (¹). Da un punto di vista strettamente formalistico, e secondo la legge della priorità vigente in tassonomia, si dovrebbe forse adottare il nome di *B. sotto*, apparso nella letteratura fin dal 1908 (STEINHAUS, 1961), ma per ragioni di chiarezza si è preferito mantenere *B. thuringiensis*.

Il *Bacillus thuringiensis* e le sue applicazioni.

Come riferisce STEINHAUS (1961), il bacillo fu isolato per la prima volta nel 1901 e 1902 in Giappone da ISHAWATA che, notando la rapidissima paralisi e la morte subitanea indotte nei filugelli (*Bombix mori* L.), parlò di bacillo « sotto ». In giapponese « sotto » significa infatti « collasso improvviso ». Lo stesso Autore osservò, in una serie di lavori successivi, che le colture vecchie apparivano assai più letali di quelle giovani, reperto confermato nel 1915 da altri due giapponesi, AOKI e CHIGASACHI, ai quali è comunemente e forse erroneamente attribuita la denominazione binomiale scientifica di *Bacillus sotto*.

Quasi contemporaneamente un ricercatore tedesco, BERLINER (1911, 1915), isolò in Turingia un batterio sporigeno agente di una grave malattia della tignola della farina (*Anagasta kühniella* Zeller), cui diede il nome di *Bacillus thuringiensis*. Più tardi MATTES (1927) reisolò il batterio e lo fece oggetto di ulteriori studi. Dal 1928 al 1936 in alcuni Paesi europei, e segnatamente in Ungheria, Jugoslavia e Francia, si registrarono parecchi tentativi di usare tale agente microbico nella lotta contro *Ostrinia nubilalis* Hübner ed altri Lepidotteri fitofagi, tentativi abbandonati per lo scoppio della Seconda Guerra Mondiale. Qui termina, si può dire, la prima fase di questa storia affascinante, fase caratterizzata dalla persistente ignoranza sul meccanismo di azione del germe.

La seconda fase ha inizio nel 1949 quando, per puro caso, STEINHAUS (1951) riprese felicemente le ricerche negli Stati Uniti su un Lepidottero dell'erba medica, *Colias philodice eurythene* Boisduval. Nel 1951, TOUMANOFF e VAGO isolarono da bachi da seta morenti per una sorta di « flaccidezza » la forma oggi nota come *B. thuringiensis* var. *alesti* (dalla regione di Alés) e ne descrissero gli effetti (1953).

(¹) Nel 1962 DE BARJAC e BONNEFOI proposero una nuova revisione della nomenclatura, basata sul sierotipo, che la Scuola francese ha adottato: *B. thuringiensis* sierotipo I, II, ecc.

A questo punto sono intervenuti, a portar luce nell'intricato problema della patogenicità, i ricercatori canadesi. Con una serie di lavori magistrali (HANNAY, 1953, 1956; HANNAY e FITZ-JAMES, 1955; ANGUS, 1954, 1956 a, b, c; FITZ-JAMES e Coll., 1958; HEIMPEL e ANGUS, 1958, ecc.) essi hanno potuto stabilire che l'azione letale del microrganismo, in tutte le varietà conosciute, è strettamente legata alle inclusioni cristalline, già notate da BERLINER (1915) e MATTES (1927) senza attribuirvi importanza. Le inclusioni si formano soltanto al momento della sporulazione, da cui il nome di « corpi parasporali ». È stato così chiarito un fenomeno che aveva posto in imbarazzo generazioni di sperimentatori i quali, pur postulando ovviamente la presenza di qualche sostanza tossica, non sapevano rendersi conto della vera ragione per cui soltanto le colture vecchie sporulate costituivano la forma virulenta.

Le ricerche, moltiplicatesi nei laboratori nord-americani ed europei, hanno portato alla scoperta di nuove varietà e ceppi di *B. thuringiensis* e ad una conoscenza abbastanza intima dei corpi parasporali. Essi sono costituiti da proteine afosforate, i cui aminoacidi non differiscono in quantità e qualità da quelli delle comuni proteine batteriche, e vengono sintetizzati a spese di due sorgenti: cellula vegetativa e mezzo nutritivo. L'elaborazione, assai rapida, precede la maturazione dell'endospora, accanto a cui i cristalli — di forma prevalentemente romboedrica (a diamante) — compaiono e rimangono fino alla disgregazione della parete cellulare: essi si sciolgono soltanto in ambiente alcalino (pH 9-10,5 o superiore) (HEIMPEL e ANGUS, 1960 a, ANGUS, 1962). Secondo studi recenti, il cristallo rappresenta praticamente una protossina che, a contatto dei succhi digestivi dell'ospite, libera per idrolisi enzimatica la vera frazione tossica: ciò almeno per quanto riguarda *Pieris brassicae* L. (MARTOURET, 1960; LECADET e MARTOURET, 1962, 1964, 1965). Per altri insetti si è parlato del cristallo come del precursore di un enzima che, in condizioni favorevoli, attacca un substrato identificato, in via ipotetica, nella membrana cellulare (HEIMPEL e ANGUS, 1960 a; FAST e ANGUS, 1965).

Il fatto che sole sospensioni di cristalli, senza spore, risultino spesso attive conferma l'importanza dei corpi parasporali. Dalla maggioranza delle ricerche si è quindi tratta la conclusione che il *B. thuringiensis* non provoca, come si riteneva all'inizio (MATTES, 1927), una semplice infezione setticemica, ma essenzialmente una tossiemia: non è un agente di malattia, ma un vero e proprio insetticida chimico di origine microbica. Agisce infatti soprattutto in virtù di veleni preformati nel substrato di coltura e non di tossine elaborate nel corpo della vittima, quali sottoprodotti del suo sviluppo e della sua moltiplicazione.

Tale interpretazione, valida sul piano generale, deve essere accettata *cum grano salis*. Il potenziale biochimico del batterio non si esaurisce infatti nella endotossina termolabile connessa alle spore. Esso possiede almeno altre cinque componenti tossiche, di cui due esotossine isolate e ben identificate: la fosfolipasi C (lecitinasi C), proteina moderatamente termolabile, che

fa parte del normale bagaglio enzimatico della cellula vegetativa (TOUMANOFF, 1953; HEIMPEL, 1955; VANKOVA, 1957; HEIMPEL e ANGUS, 1960 a, b), ed una frazione ancora chimicamente non ben definita, idrosolubile e termostabile, tossica per iniezione e per via orale, prodotta su qualunque substrato durante il periodo di accrescimento vegetativo rapido (MC CONNELL e RICHARDS, 1959; TAMASHIRO, 1960; BURGERJON e DE BARJAC, 1960; KRIEG, 1961). Esistono poi altri enzimi idrolitici e sostanze di tipo diverso, come antibiotici, sulla cui azione non si può dire nulla di certo, ma che hanno probabilmente il loro peso⁽¹⁾.

Come accennato, il *B. thuringiensis* è soprattutto patogeno per i Lepidotteri, ed in particolare per le larve, che sembrano essere il solo stadio colpito. Sporadici, trascurabili e contraddittori casi di virulenza sono segnalati in insetti appartenenti ad altri ordini: Ortotteri, Ditteri, Coleotteri ed Imenotteri (KRIEG, 1961). In totale, più di 200 specie sono risultate a tutt'oggi sensibili in laboratorio (METCALF, 1965), contro il centinaio cui si faceva riferimento qualche anno fa (HEIMPEL e ANGUS, 1960 a; KRIEG, 1961).

Sulle modalità di azione non si può generalizzare, anche perchè la recettività varia enormemente da specie a specie ed è differenziale, nel senso che certe specie sono recettive solo o soprattutto a certe varietà del bacillo. Occorre inoltre tener conto dei numerosissimi fattori intrinseci ed estrinseci che intervengono a modificare il comportamento degli esapodi e la tossicità dei cristalli, nonchè delle relativamente poche specie studiate in dettaglio e dei diversi meccanismi in possesso del batterio. Nel 1959 HEIMPEL ed ANGUS divisero i Lepidotteri suscettibili, secondo la loro risposta, in tre gruppi. Le larve di tipo I (pochi esemplari di cui è particolarmente rappresentativo il *Bombix mori*) soggiacciono ad una paralisi generale e muoiono nel breve lasso di 1-7 ore; le larve di tipo II (che comprendono la massa delle specie sperimentate) mostrano una subitanea paralisi intestinale, non si alimentano più e muoiono in 2-4 giorni; le larve di tipo III (il cui solo rappresentante è per ora *Anagasta kühniella*) muoiono in 2-4 giorni senza alcun sintomo di paralisi. Al contrario delle larve di tipo I e II, non sono uccise dai soli cristalli, ma debbono essere presenti anche le spore, il che suggerisce un'azione concomitante dei due elementi. La Scuola francese ha proposto un IV gruppo (formato in prevalenza da Nottuidi), sensibile all'esotossina termostabile anzichè all'endotossina.

Spore e cristalli di *B. thuringiensis* si dimostrano estremamente resistenti al tempo: le prime rimangono vitali e capaci di produrre mortalità dopo 10 anni (STEINHAUS, 1960); i secondi sono attivi per almeno 7 anni (HEIMPEL e ANGUS, 1960 c).

Secondo ripetute indagini, il microrganismo non danneggia le piante e sarebbe innocuo per gli insetti utili (comprese le Api mellifiche), per l'uomo,

⁽¹⁾ Recentemente (1966) SMIRNOFF e BERLINGUET hanno isolato da preparati commerciali (Thuricide) una cosiddetta « esotossina labile », attiva su larve di Tentredinidi.

gli animali domestici, i pesci e gli uccelli. (STEINHAUS, 1951, 1957, 1959; FISHER e ROSNER, 1959, ecc.).

I batteri cristalliferi pertanto, e il *B. thuringiensis* in particolare, possiederebbero in teoria tutti gli attributi dell'agente ideale di lotta microbica: virulenza elevata e stabile; azione rapida e presumibilmente persistente; una certa resistenza ai fattori fisici; specificità di azione; mancanza di residui tossici; facilità di coltura in laboratorio e di produzione in massa.

Per dette ragioni si decise ben presto di passare all'applicazione pratica e sono stati messi a punto prodotti commerciali usabili in campo, se non in competizione con gli insetticidi chimici, certo come validi mezzi integrativi degli stessi. Il primo insetticida biotico di questo tipo, apparso negli Stati Uniti nel 1958, fu seguito da parecchi altri, fabbricati nel Nord America ed in Europa (Francia, Germania, Cecoslovacchia, URSS), da somministrare sotto forma di polverizzazioni, irrorazioni, sospensioni oleose, con aggiunta di sostanze diluenti ed adesive (bentonite, silicato di alluminio, pirofillite, ecc.).

Oggi, dopo 8 anni di sperimentazione in campagna, i risultati hanno corrisposto solo in piccola parte alle attese ed alle speranze e sono tanto modesti da sfiorare nel complesso il fallimento, anche se non mancano parziali successi (HALL, 1963).

Forse il passaggio dalla fase teorica a quella applicativa è stato troppo rapido e molte ricerche di base sono ancora necessarie per essere in grado di sfruttare a fondo le capacità potenziali del microrganismo e renderlo, in mano ai tecnici ed agli agricoltori, quello strumento efficace che esso appare nelle mani degli scienziati nei laboratori. Non si può fare a meno di notare a questo punto, riferendosi anche alla osservazione fatta sopra, che il *B. thuringiensis* non è un semplice produttore di cristalli — e di conseguenza un semplice agente passivo di avvelenamento — come sembra essere stato soprattutto considerato al momento dell'impiego pratico. I moderni studi tendono infatti ad esaltare le altre entità tossiche, specie la esotossina termostabile, che probabilmente contribuiscono assai più di quanto non si ritenesse alla virulenza complessiva, agendo sinergicamente o meno con i cristalli. Così come determinante appare, in certi casi, l'attività setticemica vera e propria.

Nè si deve dimenticare che ci troviamo di fronte a materiale vivente, con tutte le limitazioni e gli inconvenienti che esso comporta dal punto di vista soggettivo e sotto l'aspetto oggettivo, intendendo con questo l'atteggiamento psicologico degli agricoltori che, adusati all'azione fulminea dei composti sintetici, rimangono perplessi di fronte ad un insetticida che impiega qualche giorno per uccidere i fitofagi che insidiano le loro colture.

Al contrario che in altri Paesi europei, in Italia il *B. thuringiensis* non ha mai suscitato un eccessivo interesse, sia dal lato scientifico che da quello pratico e, prima di passare a trattare delle nostre ricerche personali, ci è parso valesse la pena di inquadrare l'argomento nel più vasto ed illuminante contesto della situazione generale.

Tra i vari preparati commerciali a base di *B. thuringiensis*, solo il Bak-

thane L69 fu introdotto, alcuni anni fa, in Italia, ove la lotta microbiologica è stata oggetto di alcune sperimentazioni di campo, contro larve di Lepidotteri (PROTA, 1960; NIZI, 1962, 1963; CELLI, 1963; GIAMMANCO, MILITELLO e MINEO, 1965). CELLI ha impiegato il prodotto con buoni risultati contro le larve di un Lepidottero Gelechide, la *Depressaria marcella* Rebel, che si evolvono a spese dell'infiorescenza della Carota coltivata per la produzione del seme. Il periodo delicato, la piena fioritura, cioè, nel quale è necessario intervenire per contenere efficacemente il fitofago, pone con urgenza il problema della selettività dei prodotti impiegati per evitare gravissime falcidie nelle popolazioni degli insetti pronubi. Onde la presente ricerca, tendente a valutare l'eventuale attività dannosa del Baktthane L69 su uno dei pronubi più comuni e benemeriti, l'*Apis mellifera* L.

Dobbiamo ancora ricordare in questa sede che il *B. thuringiensis* (e in generale la lotta microbiologica), in vista delle sue possibilità di agire selettivamente, rispettando quanto più è possibile i predatori e parassiti presenti nell'ambiente, utili non solo per limitare la densità di specie di interesse economico, ma per contenere quella di altre specie potenzialmente dannose, è inseribile come un importante elemento operativo nel quadro della « lotta integrata », ed è, infatti, già stato utilizzato in tal senso (GRISON, 1962).

Attività del *B. thuringiensis* su *Apis mellifera* L.

1. ESAME BIBLIOGRAFICO.

Il problema della selettività, relativo alla innocuità per gli insetti pronubi e, in special modo, per api eventualmente bottinanti sulle colture in piena fioritura, soggette a trattamenti di *B. thuringiensis*, è andato acquistando, da qualche anno a questa parte, una importanza sempre maggiore, dando adito a numerose sperimentazioni, in diversi paesi, con risultati, però, spesso contrastanti. KAESER (1957), KRIEG e FRANZ (1959), FISHER e ROSNER (1959) e AYYAR (1961) non segnalano alcuna attività dannosa del *B. thuringiensis* sulle api. WILSON (1962) effettuò una serie di esperienze, impiegando diversi prodotti commerciali, tra cui il Baktthane L69. L'Autore trattò ripetutamente i favi con sospensioni dei prodotti biologici e, inoltre, nutrì le api o irrorò l'interno degli alveari con soluzioni zuccherine miste a polvere batterica. Gli adulti, le larve e le pupe non rivelarono, ai controlli, sintomi di intossicazione o anormalità. Anche la produzione di miele si presentò buona. WILSON concludeva, dunque, con un giudizio di piena innocuità dei preparati a base di *B. thuringiensis* per le api.

Tuttavia si erano già profilati risultati nettamente contrastanti, ancora in attesa di una interpretazione atta a giustificarli. GUKASJAN (1958) aveva, infatti, constatato una forte mortalità, in laboratorio, di api alimentate con elevate dosi (2×10^9 cellule vegetative/cc) di *B. thuringiensis* varietà den-

drolimus. LECOMTE e MARTOURET (1959) erano giunti a conclusioni simili. Essi avevano condotto, su api adulte, due sperimentazioni parallele, una in laboratorio e l'altra in serra, impiegando il *B. thuringiensis* var. *alesti*, ceppo « Anduze ». Le esperienze di laboratorio misero in luce che la mortalità delle api alimentate con candito misto al preparato biologico, per forti dosi (50.000-80.000 UB ⁽¹⁾ per gr di cibo) raggiungeva, dopo sette o sei giorni di regolare ingestione valori, rispettivamente, dell'80,4% e del 100%. D'altra parte, dosi inferiori (20.000 UB per gr), dopo sette giorni di somministrazione, provocarono delle mortalità trascurabili (11,4%). La sperimentazione in serra fu condotta irrorando una coltura di colza, fatta precocemente fiorire, con una sospensione del preparato batterico, nelle dosi di 12 gr per litro di acqua (pari a 6000 UB). Nel corso dei controlli, effettuati giornalmente per 7 giorni, gli Autori non rilevarono l'insorgenza di fenomeni anormali, nè incrementi di mortalità, tra la popolazione bottinante sui fiori di colza, per cui essi concludevano che il *B. thuringiensis*, attivo sulle api a forti dosi in laboratorio, in condizioni prossime a quelle naturali mostra una pressochè totale innocuità.

Altri Autori, in seguito, hanno aggredito il problema, pervenendo spesso a risultati di notevole interesse. KRIEG ed HERFS (1962) hanno paragonato le diverse var. di *B. thuringiensis*, e cioè, *thuringiensis*, *dendrolimus*, *sotto*, *alesti*, ed *euxoae*, somministrandole in soluzione zuccherina ad api adulte. Dopo 9 giorni dall'inizio dell'esperimento, il controllo stabilì che la mortalità del 100% era provocata dalla var. *thuringiensis* alla concentrazione più elevata, e cioè di 3×10^6 spore/ape/giorno. Alle stesse concentrazioni le var. *sotto* ed *euxoae* raggiungevano, invece, percentuali di mortalità aggirantisi sul 50%. Con dosi inferiori 10 volte, corrispondenti a 3×10^5 spore/ape/giorno, tutte le var. di *B. thuringiensis* non producevano mortalità statisticamente significative rispetto a quelle del testimone. Successivamente KRIEG ed HERFS (1963) sperimentarono di nuovo le varietà sopra menzionate, discriminando, però, l'attività imputabile: al complesso spore-endotossina, alle cellule vegetative, alla sola esotossina.

I preparati biologici, somministrati in soluzioni al 50% di saccarosio ad api adulte appena sfarfallate, dimostrarono una diversa attività. Il controllo generale effettuato dopo 9 giorni dall'inizio dell'esperimento, rivelò che il

⁽¹⁾ BURGERJON (1959) ha elaborato un metodo di titolazione biologica, la cui unità di misura è l'UB (o unità biologica). Tale metodo consiste nella comparazione delle mortalità ottenute con un preparato batterico da titolare e un altro scelto come campione, su larve di *Pieris brassicae* L., rigorosamente nelle stesse condizioni di sviluppo. Le mortalità, ottenute volta per volta sperimentalmente, sono corrette sui valori della curva standard di mortalità del preparato campione. Il rapporto $10.000/X \cdot Y^1/Y$ esprime le UB di un preparato batterico. (10.000 è un coefficiente di diluizione; X, Y¹, Y indicano i mg della DL50, rispettivamente del preparato da titolare, del preparato campione, della curva standard del preparato campione. Lo scarto tra Y e Y¹ indica lo stato fisiologico delle larve sottoposte all'esperimento e deve, ovviamente, essere minimo).

complesso spore-endotossina, alle dosi di 10^8 spore per cc di soluzione zuccherina, aveva provocato, per tutte le varietà, delle percentuali di mortalità statisticamente significative. Le più alte mortalità erano imputabili alla var. *thuringiensis*, seguita, in ordine decrescente, dalle var. *alesti*, *dendrolimus*, *sotto*, *euxoae*. Concentrazioni inferiori (10^6 - 10^7 spore/cc) provocarono mortalità trascurabili, così come la somministrazione di cellule vegetative (10^7 cellule/cc). L'esotossina, d'altra parte, per le var. *thuringiensis* e *dendrolimus* produsse delle mortalità significative, mentre per le var. *sotto* ed *euxoae* non manifestò che una scarsa attività. Gli Autori concludevano opinando che l'efficacia di certi preparati americani sulle Api e sui Ditteri (BRIGGS, 1960) fosse imputabile principalmente al loro elevato tenore di esotossina, dovuto a particolari modalità di preparazione industriale. Riguardo all'impiego dei preparati a base di *B. thuringiensis* sulle colture in fiore, KRIEG ed HERFS, in assenza di una loro sperimentazione specifica, si limitarono a fare alcune deduzioni. Se (come è parere di BOTTCHE, 1952) un insetticida per ingestione la cui DL50 sia superiore a 100 γ /ape deve essere considerato completamente innocuo per le bottinatrici, il *B. thuringiensis*, la cui DL50, riferita al complesso spore-endotossina della var. *thuringiensis*, si aggira sui valori di 70-110 γ /ape/giorno, deve essere annoverato tra gli insetticidi pressochè non pericolosi e ogni preoccupazione circa il suo impiego sarebbe priva di fondamento. Inoltre KRIEG (1964) dopo aver sperimentato su api adulte, non dei preparati biologici di laboratorio, bensì alcuni preparati commerciali ⁽¹⁾ (Biotrol BTB, Biospor 2802, Thuricide 30B, Thuricide 90T) non poté verificare, con dosi di 10^7 - 10^8 spore/cc, alcuna significativa mortalità. L'Autore, oltre a proporre un ulteriore innalzamento della DL50, concludeva mettendo in relazione la tossicità dei prodotti impiegati al loro basso tenore in esotossina.

Anche STUTE (1963) ha ottenuto risultati simili, somministrando in laboratorio ad api adulte due preparati batterici industriali (l'Hoe 2802 e l'Hoe 2802 conc.) nelle dosi del 0,2%. L'Autore ha anche effettuato una sperimentazione in serra, su piante molto visitate dalle api, come la *Phacelia tenacetifolia* Bent. Le piante, in piena fioritura, sono state trattate due volte, in tempi successivi, con dosi rispettivamente del 0,2% e del 2%. In presenza di un buon numero di bottinatrici (densità: 10 api/m²) STUTE non poté accertare alcun sensibile danneggiamento della popolazione ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Numerosi sono i preparati commerciali a base di *B. thuringiensis*, quali, ad esempio, il « Thuricide », il « Larvatrol 25 W », l'« Agratrol », il « Biotrol BTB 25W », il « Bakthane L69 » (USA); il « Bactospeine IP 54 », il « Plantibac » (Francia); il « Biospor 2802 » (Germania); l'« Entobacterine-3 e 32 » (URSS); ecc. (GRISON, 1963).

⁽²⁾ Anche POLTEV (1963) aveva sperimentato in laboratorio due preparati commerciali: « Dendrobaciline » (a base di *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*) ed « Entobacterine-3 » (a base di *B. thuringiensis* var. *galleriae*) senza rilevare effetti nocivi alle api. LESKOVA e KULIKEV (1963), invece, avevano segnalato la tossicità sulle api, in laboratorio, del « Thuricide » a dosi di 3×10^9 spore al cc di sciroppo, somministrato per 9 giorni.

Recentemente, però, altri reperti sono venuti a ribadire l'attività su *A. mellifera* non solo dell'esotossina, ma del complesso spore-endotossina. MARTOURET ed EUVERTE (1964) hanno messo a confronto due preparazioni commerciali di *B. thuringiensis*, l'una a base di spore-endotossina, l'altra con in più una tossina termostabile. Ambedue i preparati batterici, addizionati da un veicolo inerte, la bentonite, e mescolati a candito, vennero somministrati in laboratorio ad api adulte. Onde discriminare l'eventuale azione del veicolo inerte, la bentonite è stata mescolata al candito e somministrata alle api anche da sola. I risultati hanno permesso di accertare che il primo preparato, nelle concentrazioni del 2,5-5% (pari a 25×10^3 e 50×10^3 PTU⁽¹⁾ per gr di candito) provoca una mortalità statisticamente significativa dal sesto giorno di regolare ingestione in poi. L'altro preparato la provoca, invece, già dal quinto giorno. L'ingestione di bentonite (a dosi del 2,5-5%) fa scattare significanze al nono giorno, ma l'attività ad essa imputabile è molto inferiore a quella esplicita dai preparati biologici.

Per concludere questa rassegna bibliografica, che verrà discussa in seguito, ricordiamo che recentemente CANTWELL, KNOX e MICHAEL (1964) hanno sperimentato su api adulte e su larve⁽²⁾ esclusivamente l'esotossina di *B. thu-*

(1) BURGERJON (1962) ha elaborato un nuovo metodo di titolazione biologica, a suo parere più rapido e preciso, la cui unità di misura non è più la UB, ma la PTU (o unità tossicologica pieride). Il metodo si basa sul presupposto, ampiamente accertato, che le larve di *P. brassicae*, come quelle di numerosi altri insetti, a seguito dell'ingestione di preparati a base di *B. thuringiensis*, cessano di nutrirsi, e che il fenomeno si verificherà tanto più rapidamente quanto più elevata sarà la quantità di preparato batterico presente sull'alimento, nel caso nostro su una foglia di cavolo di peso e superficie note. BURGERJON ha ideato una apparecchiatura, composta fondamentalmente di una cellula fotoelettrica, in grado di calcolare agevolmente la superficie di cavolo consumata o no da un numero dato di larve. Una preparazione tecnica di *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* è stata arbitrariamente scelta come campione di riferimento. Un mg di questo prodotto equivale a 1000 PTU. Se in un esperimento la DRC70 (dose che provoca il 70% di riduzione nell'alimentazione di larve di *P. brassicae*, rispetto alla totale consumazione di una egual porzione di cavolo da parte delle larve del testimone) è risultata eguale a X per il preparato da titolare e a Y per il preparato campione, il titolo del preparato sarà $Y/X \cdot 1000$ PTU.

(2) Rispetto all'attività, sulle larve di *A. mellifera*, del *B. thuringiensis*, SHIMANUKI ed HARTMANN (1963) hanno nutrito delle larve di 16, 24, 32 ore di vita con una dose di 1700 spore. Si è notato, inizialmente, che solo le larve più giovani venivano rimosse in misura anormale. Non è stato appurato, tuttavia, se tali larve morissero per l'attività del *B. thuringiensis*. Dato il breve periodo di suscettibilità delle api all'azione del batterio, esso, riguardo al suo impiego, non desta, secondo gli Autori, eccessive preoccupazioni. A parte che, aggiungono SHIMANUKI ed HARTMANN, probabilmente una somministrazione protratta nel tempo, invece che una sola somministrazione, può finire per indurre effetti indesiderabili nella covata.

Si sa che l'interesse per il *B. thuringiensis*, in rapporto alle api, è collegato per molti Autori (KRIEG e FRANZ, 1959; JOHANSEN, 1962, ecc.) alla possibilità o meno di controllare batteriologicamente il Lepidottero *Galleria mellonella* L.

ringiensis var. *thuringiensis*. Una sola somministrazione di esotossina, a forti concentrazioni (100-200 mg/10 cc) produce elevate mortalità in ambedue gli stadi di sviluppo ⁽¹⁾.

Dall'esame bibliografico emerge, dunque, che il *B. thuringiensis* (nella forma di complesso spore-endotossina, cellule vegetative, esotossina) somministrato in laboratorio, con forti concentrazioni, a larve ed adulti di *A. mellifera*, ha provocato, nella maggior parte dei casi, elevate percentuali di mortalità. Più avanti, nel corso della discussione dei nostri reperti, cercheremo di suggerire, o per meglio dire, di emettere qualche ipotesi che spieghi le contraddizioni esistenti tra alcuni dei risultati degli Autori. Solo per quanto riguarda le sperimentazioni condotte in campo, o in condizioni prossime a quelle naturali, gli Autori concordano nel constatare la innocuità, per le api bottinanti, dei preparati biologici sparsi sulle colture. La ragione di ciò viene all'unisono indicata nella improbabilità che le api, durante le loro visite ai campi trattati, possano ingerire un quantitativo di preparato batterico così cospicuo da risultare dannoso o, anche, letale.

2. ESPERIENZE DI LABORATORIO

PROVE DI MORTALITÀ.

Materiale e metodo.

Abbiamo usato un preparato biologico commerciale ⁽²⁾ a base principalmente di spore-cristalli di *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* con veicolo inerte costituito da bentonite.

Il campione da noi ricevuto, utilizzato per le esperienze di laboratorio, di campagna e di serra, dimostrava, al conteggio indiretto, di contenere almeno 12 miliardi di spore germinabili in substrato solido per grammo. L'esame microscopico ha però messo in evidenza che il prodotto presenta degli aggruppamenti di spore e non è escluso quindi che il dato prima riportato in realtà sia superiore ⁽³⁾.

Le api da sottoporre all'esperienza sono state prelevate a caso da un alveare situato nel giardino dell'Istituto di Zoocolture dell'Università di Bologna. Tale alveare è soggetto a periodici controlli e la popolazione si presenta

⁽¹⁾ Ancora più recentemente CANTWELL e COLL. (1966) hanno rilevato nuovamente la tossicità dell'esotossina di *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* sulle api; constatando, inoltre, una significativa mortalità in laboratorio di api nutrite con soluzioni zuccherine contenenti alte dosi (fino a $1,67 \times 10^9$ /spore/ape.) di spore della stessa varietà.

⁽²⁾ Il Bakthane L69.

⁽³⁾ Gli esami batteriologici sono stati eseguiti nell'Istituto di Microbiologia agraria e tecnica dell'Università di Bologna. Il substrato nutritivo impiegato ha la seguente composizione: Casitone 15 g = Estratto di lievito (DIFCO) 5 g = Glucosio 20 g = Agar 20 g = Acqua distillata fino a 1000 ml.

del tutto esente da malattie e da infestazioni parassitarie. Le api, anestetizzate in ambiente confinato mediante l'immissione di CO_2 , sono state contate e poste in arnie di legno (fig. I). Il preparato batterico è stato somministrato in miele ⁽¹⁾ e candito. I testimoni hanno ricevuto, invece, cibo non trattato.

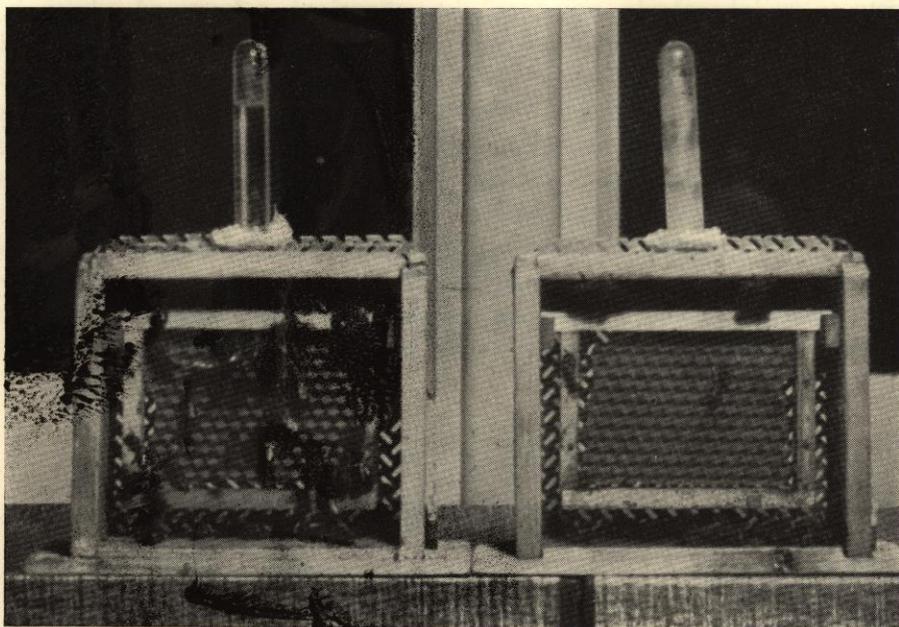


FIG. I.

Arnie usate nelle sperimentazioni di laboratorio.

Sono stati effettuati in laboratorio 2 esperimenti preliminari e un terzo conclusivo. Il terzo esperimento è stato condotto in camera climatica, in presenza di una temperatura costante di 28°C e di una umidità relativa oscillante attorno ai valori del 70-75%. Le arnie venivano opportunamente schermate, per cui le api restavano, tranne il breve tempo necessario ai controlli, permanentemente nell'oscurità.

La prima sperimentazione è stata effettuata su un numero complessivo di 1500 api adulte. Le tesi erano 3, compreso il testimone; il numero di arnie utilizzate 15, ciascuna popolata da 100 individui (le ripetizioni risultavano, dunque, 5 per tesi). Le api sono state nutrite con candito (testimone)

⁽¹⁾ Si è preferito mescolare il preparato batterico al miele, anziché a una soluzione al 50% di saccarosio, in quanto esso tende a sedimentare; l'elevata densità del miele puro stabilizza, invece, a sufficienza il miscuglio. Il candito è stato formato impastando miele e zucchero raffinato.

o con candito più il preparato (tesi 1 e 2), nella dose ⁽¹⁾ di gr 0,0025 di preparato batterico per gr di alimento. Le api della tesi I ricevettero il candito trattato in continuazione; nella tesi 2, dal quinto giorno in poi, si sostituì il candito trattato con candito puro.

La seconda sperimentazione fu effettuata su un numero complessivo di 500 api adulte. Le tesi erano 2, compreso il testimone; il numero delle arnie 10, ciascuna popolata da 50 individui. (Le ripetizioni erano, dunque, 5 per tesi). Le api sono state nutrite con miele puro (testimone) e con miele più il preparato (tesi 1), nella dose di gr 0,0036 per cc di miele (equivalente a gr 0,0025 per gr di miele).

La terza sperimentazione fu effettuata su un numero complessivo di 1500 api adulte. Le tesi erano 6, comprese le 2 testimoni; il numero delle arnie 30, ciascuna popolata da 50 individui (le ripetizioni erano dunque, 5 per tesi). Le api sono state alimentate con miele (testimone 1) e con candito (testimone 2); oppure con miele più il preparato (tesi 1), nella dose di gr 0,0036 per cc di alimento, o con candito più il preparato (tesi 2), nella dose di gr 0,0025 per gr di alimento. Onde discriminare l'effetto del preparato biologico da quello eventuale del veicolo inerte, e cioè della bentonite, le api della tesi 3 venivano alimentate con miele misto a bentonite, nelle solite dosi di gr 0,0036 per cc di alimento; quelle della tesi 4 con candito misto a bentonite, nelle dosi di gr 0,0025 per gr di alimento.

I controlli delle mortalità venivano effettuati a periodi di 24 ore.

Risultati.

TABELLA N. 1. — *Primo esperimento.*

Tesi:	Percentuali di mortalità %							
	ore: 24	48	72	96	120	144	168	192
Tesi 1	0,20	3,40	4,40	17,80	71,00	96,00	97,40	100,00
Tesi 2	0,25	1,00	1,00	17,00	76,70	93,00	97,70	100,00
Testim.	0,20	1,20	1,60	5,40	11,80	24,60	32,00	32,00

I risultati del primo esperimento sono stati riassunti nella tabella n. 1 (fig. II). Per le tesi 1 e 2 le percentuali di mortalità sono cominciate a diventare statisticamente significative (D.M.S. — al 0,01 — 8,7), rispetto al testimone, dal quarto controllo in poi, e cioè dopo 96 ore di regolare ingestione di preparato batterico. Dopo 192 ore, in ambedue le tesi, la mortalità ha rag-

⁽¹⁾ La dose era simile a quella impiegata da CELLI (1963) per combattere in pieno campo le larve di *Depressaria marcella* Rebel.

giunto valori del 100%. Nella tesi 2, la somministrazione di candito trattato è cessata dopo 120 ore, a un livello di mortalità del 76,70%. A seguito di ciò, come si vede, non si è avuto alcun decremento di mortalità.

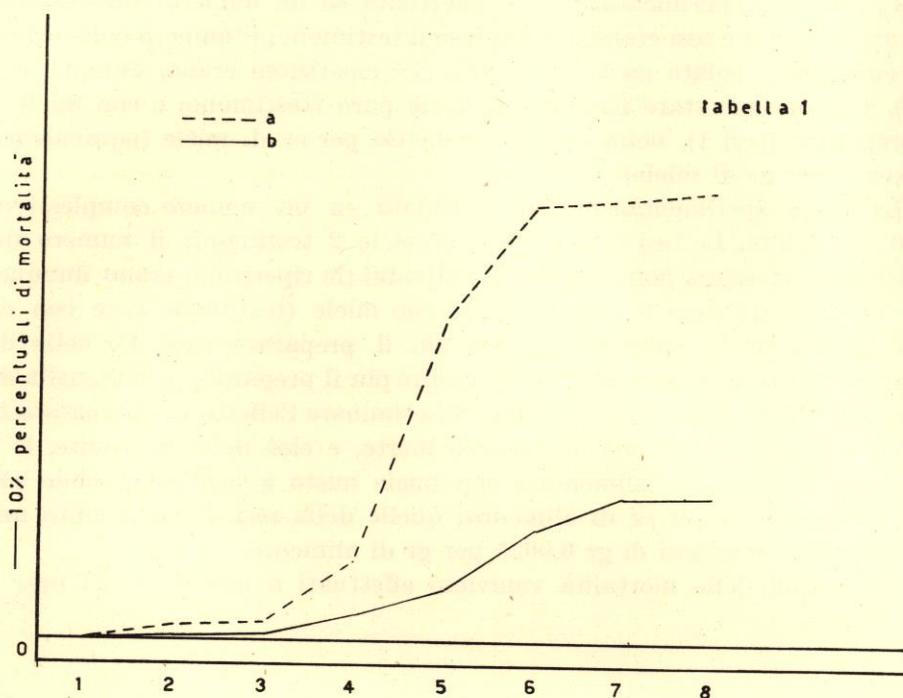


FIG. II.

Prima esperienza di laboratorio. a: tesi 1; b: testimone.

TABELLA N. 2. - Secondo esperimento.

Tesi:	Percentuali di mortalità %							
	ore: 24	48	72	96	120	144	168	192
Tesi 1	0,40	0,40	1,20	5,20	38,40	72,80	98,00	100,00
Testim.	—	—	—	0,80	2,40	8,40	14,00	16,00

I risultati del secondo esperimento sono stati riassunti nella tabella n. 2.

Per la tesi 1 le percentuali di mortalità sono cominciate a diventare statisticamente significative (D.M.S. — al 0,01 — 17,82), rispetto a quelle del testimone, dal quinto controllo in poi, e cioè dopo 120 ore di regolare ingestione di miele trattato. La mortalità del 100% è stata raggiunta in 192 ore.

TABELLA N. 3. — Terzo esperimento.

Tesi:	Percentuali di mortalità %							
	ore: 24	48	72	96	120	144	168	192
Tesi 1	0,40	0,80	0,80	2,00	20,00	82,80	99,60	100,00
Tesi 2	0,40	0,80	1,60	2,00	18,00	69,60	99,00	100,00
Tesi 3	0,80	0,80	1,20	1,60	2,00	4,40	12,00	40,00
Tesi 4	0,40	0,40	0,80	2,00	2,00	4,40	7,60	20,00
Test. 1	—	0,40	0,40	1,20	2,00	2,40	6,80	10,00
Test. 2	0,80	1,20	1,20	1,20	2,80	5,60	6,80	16,00

I risultati del terzo esperimento sono stati riassunti nella tabella n. 3 (fig. III).

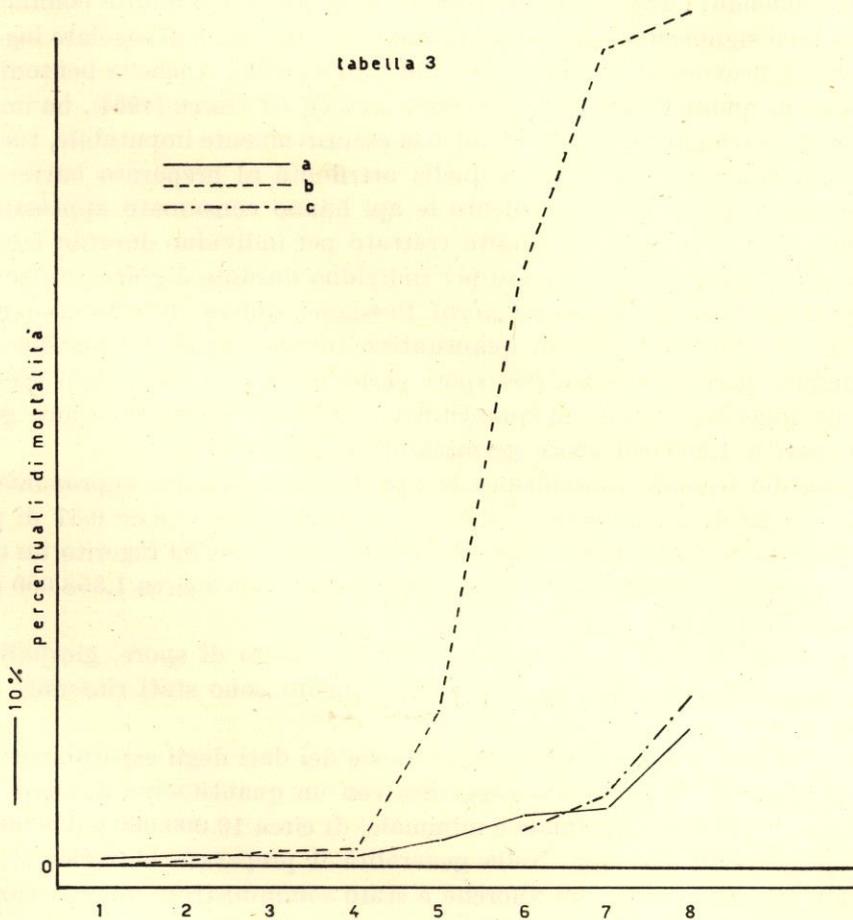


FIG. III.

Terza esperienza di laboratorio. a: testimone 2; b: tesi 2; c: tesi 4.

Per le tesi 1 e 2 le percentuali di mortalità sono cominciate a diventare statisticamente significative rispetto a quelle dei testimoni, nonché alle tesi 3 e 4, (D.M.S. — al 0,01 — 3,91), dal quinto controllo in poi, e cioè dopo 120 ore di regolare ingestione di alimento trattato. Le tesi 3 e 4 non erano nè significative tra di loro, nè significative rispetto al testimone. Al sesto controllo (144 ore) si è verificata una significanza (D.M.S. — al 0,01 — 4,30) fra le tesi 1 e 2; al controllo successivo era sparita (D.M.S. — al 0,01 — 3,79). Al settimo controllo, dopo 168 ore di ingestione di bentonite mescolata a miele, la tesi 3 presentava una mortalità statisticamente significativa rispetto a quella dei due testimoni (D.M.S. — al 0,05 — 2,60). All'ottavo controllo, dopo 192 ore di ingestione di candito misto a bentonite, anche la tesi 4 mostrava una significanza (D.M.S. — al 0,05 — 4,45), rispetto al testimone 1.

La mortalità del 100% è stata raggiunta nelle tesi 1 e 2 dopo 192 ore di regolare somministrazione di cibo trattato.

Riassumendo: l'attività del preparato batterico su api adulte comincia ad estrinsecarsi significativamente dal quarto o quinto giorno di regolare ingestione in poi e provoca la mortalità del 100% in 8 giorni. Anche la bentonite, in accordo con quanto segnalato da MARTOURET ed EUVERTE (1964), ha manifestato, dopo 7 o 8 giorni, un'azione ad essa esclusivamente imputabile, tuttavia molto più ritardata e ridotta di quella attribuita al preparato batterico.

Nel corso del primo esperimento le api hanno consumato approssimativamente: tesi 1, gr 0,22 di candito trattato per individuo durante 7 giorni; tesi 2, gr 0,20 di candito trattato per individuo durante 5 giorni; testimone, gr 0,30 di candito puro durante 8 giorni. Possiamo, quindi, arguire che ogni ape della tesi 1 abbia ingerito un quantitativo totale di almeno 6.600.000 spore germinabili, pari a circa 942.000 spore germinabili al giorno. Ogni ape della tesi 2 ha ingerito, invece, un quantitativo totale di 6.000.000 spore germinabili, pari a 1.200.000 spore germinabili al giorno.

Nel corso del secondo esperimento le api hanno consumato approssimativamente cc 0,22 di miele trattato durante 7 giorni (tesi 1) e cc 0,37 di miele puro durante 8 giorni (testimone). Ogni ape della tesi 1 ha ingerito un quantitativo totale di circa 9.504.000 spore germinabili, pari a circa 1.358.000 spore germinabili al giorno.

I consumi di miele e candito (nonchè il numero di spore, giornalieri e totali, ingerite per ape) del terzo esperimento sono stati riassunti nella tabella n. 4.

Come si può vedere, tenendo conto anche dei dati degli esperimenti 1 e 2, la mortalità del 100% è stata raggiunta con un quantitativo di spore compreso tra gli estremi, massimale e minimale, di circa 10.000.000 e di 6.000.000 spore germinabili per ape. Nella generalità il preparato batterico si è dimostrato più attivo sulle api allorchè è stato somministrato misto a candito, invece che a miele. Il contrario è avvenuto per la bentonite.

TABELLA N. 4. — Terzo esperimento; consumi di miele e candito; numero di spore germinabili e gr di bentonite ingeriti.

Consumo totale di miele e candito per tesi (7-8 giorni).	Numero di spore germinabili o gr di bentonite per cc di miele o gr di candito.	Consumo di miele e candito al giorno per ape.	Spore germinabili ingerite al giorno per ape.	Consumo totale di miele e candito per ape.	Numero di spore germinabili totali e gr complessivi di bentonite ingeriti per ape.
Tesi 1 (7 giorni) cc 59,30	43.200.000/cc	cc 0,032	1.382.000	cc 0,23	9.936.000
Tesi 2 (») gr 51,00	30.000.000/gr	gr 0,028	840.000	gr 0,20	6.000.000
Tesi 3 (8 giorni) cc 93,3	gr 0,0036/cc	cc 0,046		cc 0,37	gr 0,0013
Tesi 4 (») gr 88,5	gr 0,0025/gr	gr 0,043		gr 0,35	gr 0,0009
Testim. 1 (») cc 99,3		cc 0,048		cc 0,39	
Testim. 2 (») gr 89		gr 0,043		gr 0,35	

Nei primi giorni di ingestione del *B. thuringiensis* le api si nutrono regolarmente e non presentano perturbazioni evidenti. Dal quarto o quinto giorno di normale ingestione in poi, le api cominciano ad agitarsi, diventano aggressive, manifestano talora fenomeni dissenterici. L'addome delle api morte si presenta notevolmente inffiaccidito.

INDAGINI ISTOPATOLOGICHE.

L'istopatologia è stato uno dei mezzi d'indagine impiegati dall'inizio, seppure su scala ridotta, perchè, tra le centinaia di ricerche concernenti il *B. thuringiensis*, si possono contare sulle dita quelle che prendono in considerazione questo aspetto. Comunque, dal 1915 al 1965, disponiamo di una serie di reperti in base ai quali si è anche tentato di costruire teorie sulle modalità di azione del microrganismo. Ad onor del vero tali reperti non contribuiscono troppo a chiarire la situazione, in quanto appaiono non di rado contraddittori e sempre piuttosto vaghi: ma bisogna altresì sottolineare che si è lavorato su insetti diversi, sottoposti a varietà diverse del bacillo, sicchè la cosa non meraviglia.

Ricordiamo i lavori di BERLINER (1915) e MATTES (1927) su *Anagasta kühniella* Zeller; di TOUMANOFF e VAGO (1953) ed HEIMPEL ed ANGUS (1959) su *Bombix mori* L.; di TANADA (1953) su *Pieris rapae* L.; di HOOPINGARNER e MATERU (1964) su *Galleria mellonella* L., e di MARTOURET e COLL (1965) su *Pieris brassicae* L.. A dispetto delle differenze di interpretazione, tutti gli Autori concordano sul fatto che l'organo colpito è il mesointestino, soggetto a vistose alterazioni morfologiche, la descrizione delle quali non differisce troppo nei diversi casi.

Ci è parso di conseguenza conveniente sottoporre a prove del genere le api.

Materiale e metodo.

Nel corso del terzo esperimento di laboratorio, al sesto giorno, quando già la mortalità era elevatissima, sono state prelevate 10 api vive per tesi, e cioè 2 per ciascuna arnietta delle sei tesi. Previa uccisione con etere, gli intestini degli insetti sono stati sfilati e sottoposti ai procedimenti della normale prassi istologica, con fissazione in liquido di Bouin e successivo passaggio nella serie degli alcoli, fino alla sparaffinatura. Si è poi proceduto al taglio, in sezioni seriali di 6 μ , ed alla colorazione con ematossilina-eosina.

Risultati.

Già ad una grossolana osservazione macroscopica il mesenteron delle api trattate con *B. thuringiensis* si presenta anormale. Esso è bianco, anziché del consueto colore giallo-bruno, eccessivamente sottile, con pareti appiattite e pressochè prive dei caratteristici cordoni in rilievo disposti trasversalmente: le estremità anteriore e posteriore appaiono come svuotate e trasparenti ed i tubi malpighiani appena visibili. Il quadro è simile a quello caratteristico delle api colpite da talune malattie dell'apparato digerente.

L'esame dei preparati istologici ha confermato le osservazioni preliminari.

L'epitelio mesointestinale appare profondamente alterato, e tale da non potere più normalmente assolvere alle sue funzioni di digestione e di assorbimento del cibo. Le lesioni variano in gravità e, nei casi estremi, giungono fino ad una completa disorganizzazione ed erosione della parete, ridotta ad un ammasso informe di cellule degenerate (Tav. II, figg. 1, 2).

La regolare disposizione della parete sana, con pieghe uniformemente susseguentesi e ben delineate (Tav. I, fig. 1), è quasi ovunque scomparsa, così come la massa gelatinosa, che forma uno strato più o meno continuo sopra il bordo dell'epitelio e fra una piega e l'altra (Tav. I, fig. 3).

Anche laddove la forma è grossolanamente rimasta e sono visibili tracce della sostanza gelatinosa, colpisce, a parte gli altri fenomeni, la spiccata riduzione in volume delle cellule (Tav. I, fig. 4; Tav. III, fig. 1). La membrana peritrofica, con la sua regolare disposizione stratificata (Tav. I, figg. 1, 2, 3) è scomparsa (Tav. I, fig. 4; Tav. II, figg. 1, 2; Tav. III, fig. I) o ne rimangono i resti, a mo' di reticolo che racchiude fra le sue maglie il contenuto intestinale (Tav. II, figg. 3, 4). Il lume intestinale contiene talvolta una quantità abnorme di cellule epiteliali in disgregazione, nucleate o meno (Tav. II, fig. 4; Tav. III, figg. 2, 3). Sulla parete, infine, non sono infrequenti vere e proprie zone necrotiche, con sorta di « croste » nere, quali si riscontrano anche in intestini di api affette da particolari malattie come « paralisi » e « melanosi » (Tav. III, figg. I, 2).

Quantità rilevanti di batteri sono state notate, e non in tutti i casi, soprattutto nelle api che avevano ricevuto il preparato tossico misto a candido (Tav. II, fig. 3; Tav. III, figg. 3, 4). Non avendo eseguito degli isolamenti,

riesce ovviamente impossibile determinare se si tratti dell'agente inoculato o della proliferazione di qualche componente della flora microbica normale dell'intestino dell'ape.

In complesso si direbbe che l'alterazione delle cellule proceda in senso centripeto, e cioè dall'esterno verso l'interno, e che interessi, almeno primariamente, il citoplasma piuttosto che i nuclei. Inoltre, la mancata presenza di una flora batterica abbondante e costante nel tubo digerente — pur con tutte le riserve dettate dalla possibilità, ancora da noi non investigata, che allo stadio in cui le api sono state prelevate la massa dei batteri fosse già passata nell'emocele — parlerebbe a favore di un processo di intossicazione. Con tale ipotesi potrebbe altresì concordare la vistosa contrazione in volume degli elementi cellulari.

Il tenue sembra sostanzialmente normale, benchè spesso il lume sia eccessivamente pieno di detriti, di prodotti catabolici vari e talvolta di batteri, il che è un'evidente conseguenza delle citate turbe morfologiche e funzionali del ventricolo. Tutto apparentemente regolare nel retto.

Il tubo digerente delle api trattate con bentonite non mostra, al momento preso in considerazione, particolarità degne di nota.

I reperti istologici hanno messo in evidenza dei cambiamenti che sono manifestazioni visibili di eventi biochimici, ma non ne offrono una spiegazione soddisfacente. D'altra parte, abbiamo impiegato una colorazione generica come quella all'ematossilina-eosina proprio allo scopo di avere una prima visione generica dei fatti.

DISCUSSIONE.

Dai nostri esperimenti di laboratorio emerge un forte tossicità del preparato batterico in riguardo delle api adulte tenute in claustrazione dentro arnie sperimentali.

I risultati collimano solo in parte con quelli di alcuni Autori (LECOMTE e MARTOURET, 1959; KRIEG ed HERFS, 1962, 1963; LESKOVA e KULIKOV, 1963; MARTOURET ed EUVERTE, 1964; CANTWELL e Coll., 1964, 1966) e sono in contrasto con quelli di altri (POLTEV, 1963; KRIEG, 1963; STUTE, 1963), che hanno operato in condizioni apparentemente simili alle nostre.

I primi, infatti, riconoscono che i prodotti a base di *B. thuringiensis* esercitano un effetto notevole, ma soltanto a dosi in alcuni casi accertabilmente superiori alle dosi da noi impiegate, mentre per i secondi tali prodotti sarebbero sostanzialmente innocui.

A questo punto occorre precisare che, al di là delle banali apparenze, le ricerche hanno avuto in comune soltanto un elemento: essere state condotte su api adulte chiuse in gabbiette e sottoposte ad una alimentazione forzata. Tutte le altre condizioni sono estremamente variabili. Si sono infatti usate varietà e ceppi diversi del bacillo; colture pure e lavate, ottenute in labora-

torio con metodi differenti, oppure formulazioni commerciali, fabbricate secondo differenti tecniche; colture giovani e colture sporulate; semplici complessi spore-endotossina, complessi spore-endotossina + esotossina, oppure esotossina purificata e così via. Conoscendo quanto ognuno dei suddetti fattori incida, di per sè stesso ed in rapporto con gli altri, sull'intensità dell'azione patogena, è chiaro che i dati non sono strettamente comparabili.

Lo stesso materiale di sperimentazione, le api, non può certo considerarsi omogeneo perchè chi ha impiegato insetti appena sfarfallati e chi insetti di età ignota, raccolti a caso dall'alveare; chi api di una razza e chi di un'altra.

I raffronti riescono ancor più difficili essendo gli Autori ricorsi, per la titolazione dei rispettivi materiali, a due metodi diversi come il numero di spore per grammo e le Unità Biologiche o Tossicologiche.

Da sottolineare che la varietà *thuringiensis*, da cui è composto il preparato batterico impiegato, è risultata, nelle sperimentazioni degli Autori, la più tossica per le api e che le formulazioni commerciali in genere sono presumibilmente le più pericolose perchè, oltre alle spore, ai cristalli ed alla esotossina termostabile, contengono residui vegetativi, enzimi idrolitici, sottoprodotti catabolici e scorie diverse concentrate durante il processo di raccolta, nonché materiali inerti: nel caso nostro la bentonite.

Sia questa o no la ragione, certo è che abbiamo riscontrato una mortalità del 100% con dosi di circa 840.000-1.380.000 spore germinabili al giorno per ape, laddove KRIEG ed HERFS (1962), somministrando colture pure della varietà *thuringiensis* sotto forma di spore-endotossina o di sola esotossina termostabile, hanno osservato una analoga azione letale con una dose unitaria di 3 milioni di spore al giorno. Gli stessi Autori (1963) fanno salire la concentrazione necessaria a provocare una mortalità statisticamente significativa a 100 milioni di spore per cc. di soluzione zuccherina, superiore di circa due volte ai 43 milioni di spore per cc di miele da noi impiegati con esito positivo (tab. n. 4).

In una prova successiva KRIEG (1964), usando vari preparati commerciali a base di *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (1), alla stessa concentrazione sopra accennata (100 milioni di spore per cc), non ha ottenuto una mortalità statisticamente significativa rispetto al testimone, dopo 9 giorni di ininterrotto trattamento. La sua conclusione, che la non tossicità dei prodotti impiegati sia attribuibile al loro basso tenore in esotossina contraddice fra l'altro quanto egli stesso, in collaborazione con HERFS, aveva precedentemente messo in luce: e cioè che, a dosi così massicce, anche il solo complesso spore-endotossina risulta fortemente attivo.

Nel corso delle prove qui descritte abbiamo soltanto inteso di saggiare la tossicità del prodotto per le api (come del resto ci consta abbiano fatto tutti

(1) Fra questi non figura il Bakthane L69.

gli altri Autori), senza preoccuparci di esplorarne il modo di azione, se non con esami istologici. Siamo quindi in grado di affermare che, nelle condizioni sperimentali di laboratorio, le api muoiono in seguito alla ingestione di Bakthane L69, ma non possiamo dire perchè muoiono. Ignoriamo, in altri termini, quale dei numerosi meccanismi che contribuiscono alla virulenza di *B. thuringiensis* intervenga nel caso dei nostri imenotteri.

Come abbiamo visto, le ricerche sulle api, di ordine generale, non offrono a questo proposito che dei suggerimenti indiretti. D'altra parte, i riferimenti alla vasta e contrastante bibliografia specifica hanno un valore relativo, in quanto essa concerne quasi esclusivamente insetti di un altro ordine ed in stadio larvale: e ben si sa quanto influiscano, nei processi tossico-infettivi, le condizioni fisiologiche e biochimiche dell'ospite.

Un indiscusso punto fermo è comunque che i cristalli non si sciolgono a un pH di almeno 9-10,5, talchè la concentrazione ionica del succo intestinale determina la suscettibilità o meno all'endotossina. Poichè il pH del mesenteron delle api è di 5,6-6,3 (HOSKINS e HARRISON, 1934), questo solo fatto dovrebbe automaticamente scagionare i corpi parasporali. Nelle api, inoltre, non si è notata quella inibizione della alimentazione e quella paralisi intestinale che costituiscono i sintomi più caratteristici ed evidenti di questo tipo di intossicazione. Nè i preparati istologici hanno messo in luce la separazione delle cellule fra loro e con la membrana basale ed il rilassamento dei muscoli, chiaramente indicati da HEIMPEL ed ANGUS (1959) e da altri come conseguenze dell'azione endotossica.

In linea di massima, l'ambiente potrebbe essere favorevole alla fosfolipasi C, il cui optimum di attività oscilla tra pH 6,5 e 7,5. La scomparsa della membrana peritrofica, descritta da HEIMPEL (1955) in larve di *Pristiphora erichsonii* Hartig attaccate da *B. cereus* ed attribuita alla fosfolipasi C, trova riscontro nei nostri preparati istologici, ma si tratta di un dato comune in quasi tutti i casi di turbe mesointestinali. Da notare piuttosto che, per le larve dei citati imenotteri, sono risultate patogene solo le specie batteriche capaci di produrre lecitinasi.

In quanto all'esotossina termostabile, si sa che essa agisce lentamente e senza provocare inibizione dell'alimentazione: ciò concorda con i nostri reperti e con quelli degli altri ricercatori. La morte delle api, che avviene quasi improvvisamente dopo alcuni giorni, senza essere preceduta da manifestazioni esterne apprezzabili, presenta una certa analogia con quanto BURGERJON e DE BARJAC (1960) hanno notato per le larve di *Malacosoma* sp., nella cui uccisione si ritiene coinvolta soprattutto la suddetta tossina. A parte queste osservazioni personali, da una disamina dei lavori dedicati alle api si trae la netta impressione che la sostanza giuochi un ruolo assai importante. Parecchi Autori infatti (KRIEG ed HERFS, 1963; CANTWELL e Coll., 1964, 1966; MARTOURET ed EUVERTE, 1964; ecc.) hanno dimostrato sperimentalmente, in via più o meno diretta, che essa è attiva contro le api adulte, seppure spesso a dosi estremamente elevate.

Vale la pena di sottolineare qui che l'esotossina termostabile è stata trovata soprattutto in *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (MC CONNELL e RICHARDS, 1959), il più nocivo alle api. Nessuno ha tuttavia potuto provare che l'esotossina sia l'unica componente dannosa alle api, opinione contro cui anzi stanno la asserita attività anche dei soli complessi spore-endotossina e talvolta delle semplici cellule vegetative. L'azione della esotossina a livello cellulare è ancora oscura, sicchè le prove istologiche non sono per ora di aiuto.

Ciò premesso, nulla permette di escludere l'intervento di qualche altra frazione tossica nè, ovviamente, l'azione diretta dei batteri che, al citato pH mesointestinale, trovano condizioni assai adatte per la germinazione delle spore e la moltiplicazione delle cellule vegetative, con eventuale e probabile setticemia.

Allo stato attuale delle nostre ricerche non possiamo che limitarci alle considerazioni obiettive di cui sopra, che tuttavia ci sembrano di interesse non trascurabile, almeno come punto di partenza per i futuri esperimenti. La ipotesi di una azione preminente della esotossina, forse esaltata in modesta misura dalla bentonite, è suggestiva e giustificata, ma sfortunatamente manca un dato fondamentale per sostenerla: la conoscenza dell'effettivo contenuto del Bakthane L69 in tale principio.

3. ESPERIENZE DI CAMPO.

Secondo BERAN (1958), è sempre necessario distinguere la « tossicità » per le api di un dato insetticida (osservata e valutata secondo la metodologia più acconcia in laboratorio) dalla sua « pericolosità » e cioè dal suo effetto in condizioni di utilizzazione pratica. Una volta accertata la tossicità per le api del preparato batterico da noi usato, ci siamo quindi preoccupati di valutarne la pericolosità in pieno campo.

Materiale e metodo.

Due alveari, trasportati nella notte del 30 giugno in località S. Paola (Cesena), sono stati opportunamente sistemati in prossimità di una coltura di Carota da seme (varietà Nantese), già abbondantemente fiorita (fig. IV), che occupava una lunga striscia di terreno di circa 6.000 m². Per proteggere le api dalle elevate temperature dei mesi di luglio e di agosto, si è preferito collocare gli alveari sotto gli ombrosi rami di due ciliegi (fig. V), alla distanza di una trentina di metri dal campo, anzichè in mezzo a quest'ultimo. Tra la coltura di Carota e gli alveari il terreno era occupato da un lussureggiante medicaio da seme (fig. IV).

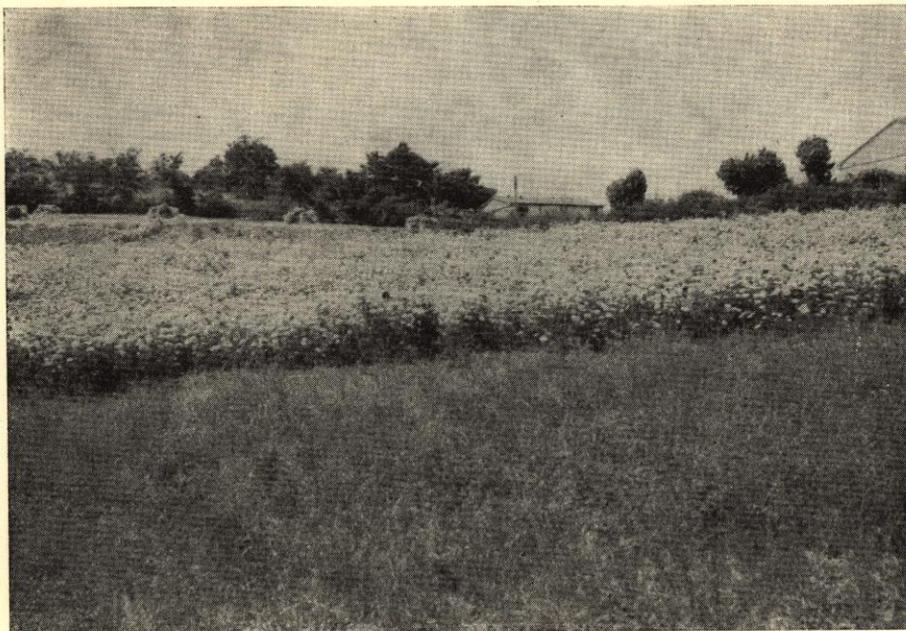


FIG. IV.

Veduta d'insieme del campo sperimentale. Sul fondo: campo di Carote da seme in fiore. In primo piano il medicaio.



FIG. V.

I due alveari soggetti all'esperienza.



FIG. VI.
Alveare con annessa trappola di Gary.

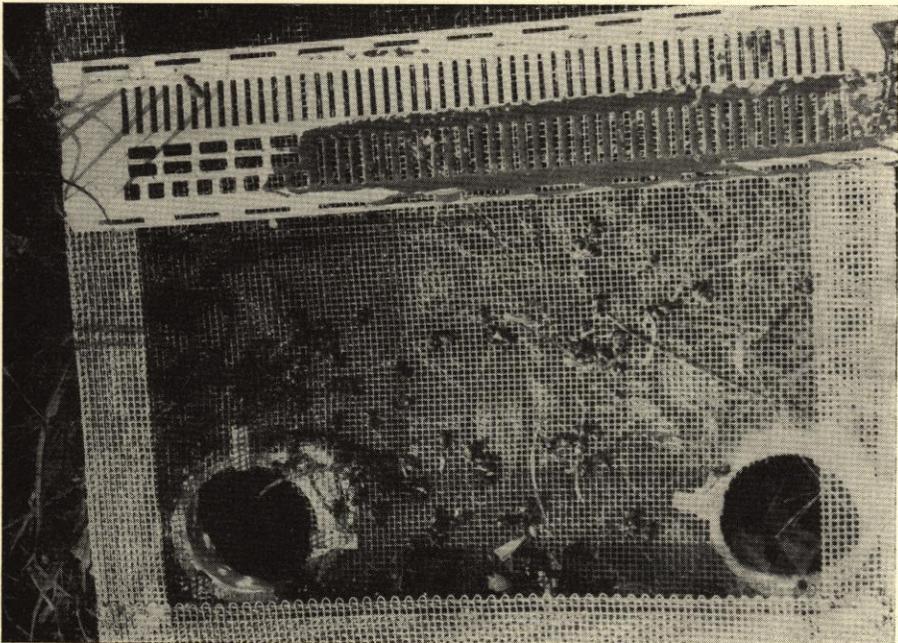


FIG. VII.
Particolare di trappola di Gary con api morte.

Le api sono state lasciate in sito per una quindicina di giorni prima del trattamento, onde permettere loro di assuefarsi all'ambiente e di compiere i necessari voli di orientamento. Nel frattempo, si sono raccolti dati sulla mortalità naturale degli alveari e sulla normale attività di bottinamento degli insetti, per seguire le eventuali modificazioni ad opera di un trattamento del preparato batterico sui fiori visitati dalle bottinatrici.

Per la mortalità, davanti agli alveari sono state applicate le così dette « trappole » di GARY (1960), sorta di reticelle in cui si raccolgono le api morte o comunque morenti, di cui è così consentita la osservazione ed il periodico conteggio (figg. VI, VII). Tre prelievi pre-trattamento sono stati compiuti, il 5, 10 e 14 luglio (tab. n. 5).



FIG. VIII.

Api bottinanti su una infiorescenza di Carota.

In quanto al bottinamento, le infiorescenze della Carota da seme sono ombrelle di un bel colore bianco, molto grandi ed aromatiche. Una coltura in pieno fiore costituisce un imponente substrato di attrazione per numerose specie di insetti, comprese le api (fig. VIII). Il giorno 5 luglio, quando la fioritura era ottima (40 piante: 258 ombrelle in fiore e 53 in allegazione), abbiamo compiuto rilievi sul campo nel periodo presumibilmente migliore per la visita delle api, dalle 11,30 alle 12,30. Onde cercare di quantificare in qualche modo le osservazioni, abbiamo adottato un « conteggio a tempo », nel senso di contare, a diverse distanze dagli alveari e quindi a profondità diverse del campo, il numero di api intente a bottinare, in un tempo stabilito, nel nostro caso « in un minuto ».

La frequenza delle bottinatrici era tanto maggiore quanto più vicine erano le infiorescenze agli alveari, ciò che rientra nella perfetta normalità. Riassumendo: a 30-60 m circa dagli alveari si è osservata in un minuto una media di

39 bottinatrici; tale cifra scendeva a 37 bottinatrici a 60-80 m circa e scendeva ulteriormente a 10 bottinatrici a 100-150 m dagli alveari. A distanza di 30-60 m dagli alveari si riscontrava una densità di 10 api al m².

Il trattamento fu eseguito il 14 luglio e, essendo nel frattempo fiorito anche il medicaio, che le api visitavano attivamente, si pensò di estenderlo anche a questa coltura. Su di una superficie di ettari 1,5 furono distribuiti, mediante atomizzatore, Kg 5,6 di preparato batterico (nelle dosi di 250 gr di prodotto commerciale per 100 litri di acqua, e nello stesso quantitativo di sospensione per ha impiegata da CELLI, 1963, contro *Depressaria marcella* Rebel).

Risultati.

Le api non hanno manifestato alcuna repellenza per il prodotto. Direttamente colpite dalle irrorazioni si alzavano in volo, ma riprendevano a bottinare subito dopo sulle infiorescenze ancora grondanti. Prima della applicazione insetticida, si sono contate in media e in un minuto, sulle infiorescenze di Carota situate in prossimità degli alveari (30-60 m), 30 api; 36 api sul medicaio (zona compresa tra la coltura di Carota e gli alveari). Due ore appresso il trattamento, tali valori erano rispettivamente 32 e 30. Abbiamo controllato soltanto la zona più prossima agli alveari, in quanto chiaramente la più frequentata dalle api.

TABELLA N. 5.

Controlli n:	Medie di mortalità giornal. prima e dopo il trattamento								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Prima del trattamento	32	22	24						
Dopo il trattamento				29	31	23	24	21	18

Nel periodo successivo al trattamento furono eseguiti 6 controlli sulla mortalità, prelevando le api dalle gabb'e d' Gary nei giorni 18, 20 e 25 luglio ed 1, 8 e 19 agosto. Essendo l'intervallo di tempo tra l'uno e l'altro prelievo non costante, come già fatto nel caso dei controlli preliminari si è calcolata la « mortalità media giornaliera », dividendo il numero di api morte reperite ad un dato prelievo per il numero di giorni intercorsi da quello precedente (tab. n. 5). I valori non si discostano dai valori precedentemente calcolati come « mortalità naturale » degli alveari (fig. IX) ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ L'andamento della curva riportata nella fig. IX sembrerebbe quasi indicare un qualche effetto del trattamento, nel senso di un incremento di mortalità. Ammettiamo pure che la media del primo controllo, 32 (tab. 5), sia stata più elevata rispetto alle due successive per un aumento della mortalità indotto dalle operazioni di trasferimento degli alveari. Ne deriverà che i valori medi 29 e 31 del quarto e quinto controllo potrebbero essere opera par-

A visite interne successive le famiglie apparivano normali, compresa la covata. A fine stagione, il raccolto di miele si rivelò molto scarso, ma indagini

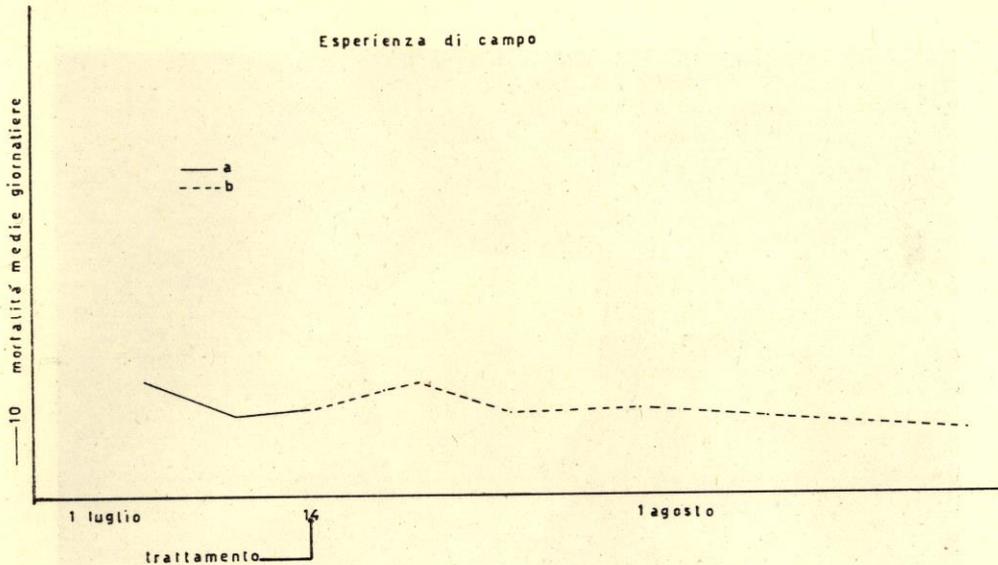


FIG. IX.

Andamento delle mortalità medie giornaliere. a: prima del trattamento; b: dopo il trattamento.

condotte sulla produzione 1965 di miele in Romagna, in particolare nelle zone finitime, dimostrarono trattarsi di un fenomeno generale, e quindi non imputabile a qualche effetto secondario del trattamento.

Appendice: Prove in serra.

Una prova preliminare è stata effettuata nella seconda metà di agosto in una serra di nylon (dimensioni m 3 × 2 × 9) sistemata su un medicaio in fiore. All'interno sono stati collocati due nuclei contenenti circa 200 api, con regina (fig. X): l'erba medica è stata irrorata con preparato batterico, nella concentrazione di 250 gr per 100 litri di acqua. Dopo il trattamento le api hanno continuato a visitare regolarmente i fiori, e per 5 giorni non si è osservato alcun fenomeno di intossicazione o di anormale mortalità, neppure sui teli di nylon opportunamente distesi sotto ai nuclei.

zialmente del trattamento. Tuttavia, riferendoci alla media di mortalità naturale più bassa, 22, e a quella valutata come più alta dopo il trattamento, 31, ne deriva che l'incremento di mortalità, dovuto al preparato batterico, sarebbe di 9 api giornaliere. Il numero è del tutto trascurabile quando si pensi che la popolazione normale di un alveare nel periodo preso in considerazione oscilla fra i 40.000 e i 50.000 individui.

Sfortunatamente a questo punto l'esperienza ha dovuto essere interrotta per il verificarsi improvviso ed inopinato di condizioni atmosferiche sfavorevoli.

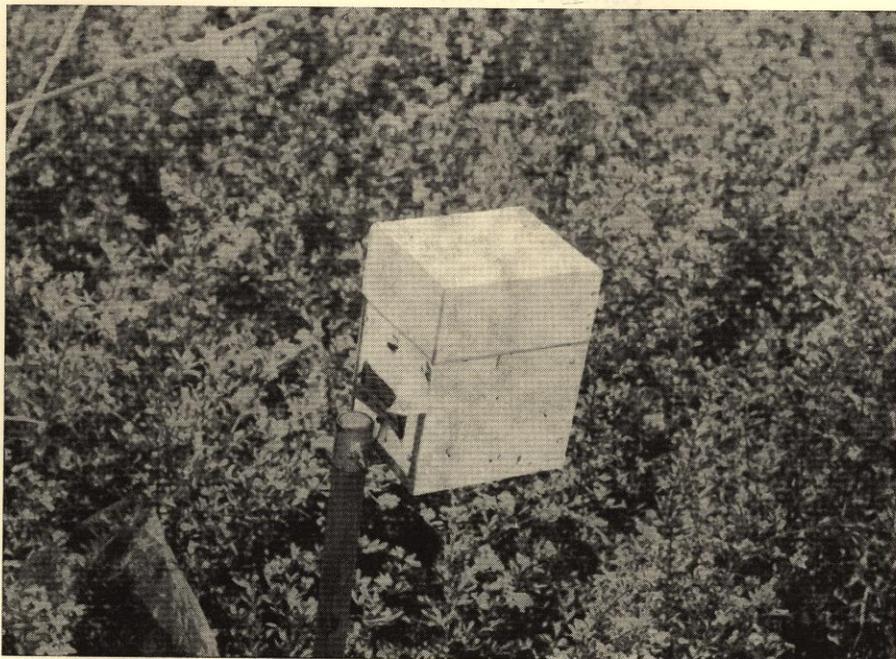


FIG. X.

Nucleo popolato di circa 200 api con regina, utilizzato per le esperienze in serra.

4. CONCLUSIONI.

Mentre in laboratorio il preparato batterico è risultato tossico per le api, nessun effetto nocivo è stato messo in luce dalle prove di campo, eseguite su pochi alveari ma pur sempre su qualche decina di migliaia di insetti, con i metodi di valutazione ritenuti più idonei in simili casi.

A conclusioni analoghe sono pervenuti tutti i ricercatori che ci hanno preceduto, compresi coloro che ammettono l'azione letale, in laboratorio, dei prodotti a base di *Bacillus thuringiensis*. Questi ultimi, per giustificare il fenomeno, affermano che è praticamente impossibile che le api riescano ad assorbire volontariamente sui fiori trattati la quantità di insetticida loro propinata forzosamente nelle arnie ed alcuni mettono in risalto che in campagna non si applicano mai preparati così concentrati come quelli usati nelle loro esperienze (CANTWELL e COLL, 1964).

È intuitivo infatti che la quantità di prodotto complessivamente assorbita dalle api bottinatrici sarà sempre minore di quella che gli insetti sono obbligati ad ingerire in arnetta: sia perchè soltanto una parte del preparato va a contaminare il polline ed il nettare, e viene inoltre diluito dal nettare stesso; sia perchè non c'è continuità di somministrazione nel tempo (in campagna ci si limita infatti ad un unico trattamento, mentre in laboratorio il trattamento è ininterrotto per alcuni giorni; e la mortalità, si noti, scatta solo al 4^o-6^o giorno).

Di un altro fattore occorre poi tenere conto. Come ben noto, le api defecano soltanto durante il volo: in condizioni di pieno campo, con ogni probabilità, esse eliminano regolarmente e rapidamente la sostanza ingerita, incapace di attaccare subito, come un insetticida chimico, i loro tessuti ed i loro sistemi. Al contrario, in condizioni di claustrazione rigidissima, l'accumulo ed il ristagno della materia fecale nel tubo digerente concede al batterio tutto il tempo di esplicare la sua azione a carico, per di più, di un organismo sottoposto ad alterazioni metaboliche, che ne indeboliscono le difese.

La netta contraddizione tra i risultati di laboratorio e di campo è pertanto spiegabilissima e sembrerebbe logico ritenere che la mancata tossicità dei preparati a base di *B. thuringiensis* per le api in campagna dipenda da due elementi principali: le dosi necessariamente non troppo massive che gli insetti ingeriscono e la possibilità di eliminarle rapidamente, avanti che intervengano fenomeni di intossicazione.

Fermo restando l'interesse squisitamente scientifico di indagare più a fondo sulle api, onde stabilire come agisca su di esse il bacillo quando trova un ambiente favorevole, sotto l'aspetto pratico i risultati ottenuti in campo sono certamente significativi ed una volta di più tranquillizzanti, in perfetto accordo con quanto è stato scritto dagli altri Autori.

R I A S S U N T O

Il *Bacillus thuringiensis* Berliner, da poco più di un decennio, sta riscuotendo, ai fini della moderna lotta microbiologica contro gli insetti dannosi alle piante coltivate e alle derivate, notevole interesse, facendo promuovere innumerevoli ricerche atte a mettere in luce i complessi meccanismi di azione tossica e patogena e i limiti e le condizioni di applicabilità dei vari prodotti commerciali nella pratica.

Uno degli aspetti che attualmente polarizza l'interesse di numerosi ricercatori riguarda l'innocuità o meno del *B. thuringiensis* per gli insetti pronubi, ed in particolare per *Apis mellifera* L., in relazione alla visita delle bottinatrici a piante sottoposte al trattamento in piena fioritura. Sull'argomento molti e, talora contrastanti, reperti sono stati raccolti in vari Paesi, ad opera di diversi Autori. Tra di essi, alcuni sono concordi nell'attribuire al *B. thuringiensis* un'attività nociva su api adulte, o allo stato di larva, qualora queste vengano forzatamente alimentate in laboratorio con cibo mescolato con alte dosi di preparato batterico; altri Autori, invece, in condizioni simili, constatano una completa innocuità. Controversi, inoltre, sono i punti di vista sul ruolo che giocherebbero, in rapporto alle api, il complesso spore-endotossina, le cellule vegetative, o anche la sola esotossina. Gli Autori concordano,

però, nel segnalare l'innocuità sia per le bottinatrici che per le api di casa e la covata, delle irrorazioni di preparati batterici effettuate su coltivazioni in fiore, in campo come in serra.

In questo I° Contributo si riportano i risultati di alcune prove di laboratorio condotte su api adulte, e di prove in campo e in serra, portate a termine utilizzando un preparato commerciale a base di *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, il Bakthane L69, da qualche anno introdotto in Italia. A dosi inferiori (840.000-1.382.000 spore germinabili/ape/giorno) a quelle riportate dagli Autori per altri preparati commerciali, è stata raggiunta, in 7-8 giorni di regolare ingestione di candito o miele misto al preparato, la mortalità del 100% delle api adulte soggette alla sperimentazione di laboratorio. In campo, d'altra parte, con alveari muniti di trappole di Gary, o in serra, ma limitatamente a 5 giorni di osservazione, non si poté rilevare alcun effetto nocivo conseguente al bottinamento delle api su Carote da seme o su Medica in piena fioritura, previamente irrorate con una sospensione del preparato batterico (250 gr/hl).

Sono state, infine, messe in luce vistose alterazioni istopatologiche a carico dell'apparato digerente (scomparsa della membrana peritrofica, riduzione della grandezza delle cellule, erosione della parete meso-intestinale, presenza di « croste », ecc.) di api sottoposte in laboratorio all'ingestione continuata di miele e candito misti al preparato batterico.

Nella discussione delle esperienze di laboratorio e nelle conclusioni si è creduto di individuare alcune delle ragioni che possano spiegare la disparità dei reperti degli Autori, ricercabile in primo luogo nella eterogeneità dei materiali e dei metodi impiegati.

S U M M A R Y

During the last ten years or so, *Bacillus thuringiensis* Berliner has aroused a remarkable interest, for the purpose of the modern microbiological control of insect pest injuring field crops and food-stuffs. A number of investigations have then been started to enlighten the complicated modes of its toxic and pathogenic action, and the limits and conditions of practical use of the several commercial products.

The attention of many workers is to day focused on the problem whether *B. thuringiensis* is either harmless or more or less toxic to pollinating insects, particularly to *Apis mellifera* L., with relation to the foragers which visit plants treated when in full blossom. On this subject, many Authors have collected in various countries a great deal of sometimes contradictory information. Some of them agree on attributing to *B. thuringiensis* a toxic effect on bees, in the adult or larval stage, when high doses are supplied in the laboratory mixed with food; other Authors, instead, in similar conditions remark a complete harmlessness. Moreover, there is some discussion on the role played on the honey bees by the spore-endotoxin complex, vegetative cells, or even by exotoxin only.

There is, however, general agreement on the harmlessness to foraging bees, hive bees and brood, of bacterial preparations sprayed on crops in blossom, in the field or in greenhouses.

This 1st Contribution illustrates the results of some laboratory tests performed on adult bees and of experiments in the field and greenhouse, carried out making use of Bakthane L69, a commercial preparation containing *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, introduced into Italy a few years ago. At levels lower (840.000 to 1.382.000 spores/bee/day) than those reported by other Authors for different commercial products, a 100 per cent mortality of adult bees has been reached in 7 to 8 days in laboratory, feeding regularly the insects with sugar candy or honey added with the preparation. In the field, on the other side, making use of hives equipped with Gary traps, or in greenhouse, taking into account only five days observation, we were unable to remark any toxic effect resulting from the foraging of the bees on seed carrots or alfalfa in full blossom, previously sprayed with a suspension of the bacterial preparation (250 grams in 100 liters).

Finally, considerable histopathological injuries of the digestive tract (disappearance of the peritrophic membrane, reduction in size of the cells, erosion of the mid-gut wall, presence of « crusts », etc.) were quite evident in bees fed some days in the laboratory with a mixture of either sugar candy or honey and Bakthane.

In the discussion of the laboratory experiments and in the conclusion we tried to individuate the reasons which might explain the conflicting findings of the different researchers, to be firstly ascribed to the heterogeneity of the materials and methods used.

BIBLIOGRAFIA

- ANGUS T. A. - *A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae.* - *Nature*, 1954, vol. 173, pag. 545.
- *General characteristics of certain insect pathogens related to B. cereus.* - *Can. J. Microbiol.*, 1956 (a), vol. 2, pp. 111-121.
- *Association of toxicity with protein crystalline inclusion of Bacillus sotto Ishawata.* - *Can. J. Microbiol.*, 1956 (b), vol. 2, pp. 122-131.
- *Extraction, purification and properties of Bacillus sotto toxin.* - *Can. J. Microbiol.*, 1956 (c), vol. 2, pp. 416-426.
- *The biochemistry and mode of action of Bacillus thuringiensis Berliner and its varieties.* - *Coll. Int. Pathol. Insectes*, Paris 1962, pp. 165-173.
- AOKI K. e CHIGASACHI T. - *Über die Pathogenität der sog. Bacillus sotto (Ishawata) bei Seidenraupen.* - *Mitt. Med. Faklt. Kais. Univ. Tokio*, 1915, vol. 13, pp. 419-420.
- AYYAR G. R. - *Preliminary trials with an entomogenous bacterium, Bacillus thuringiensis Berliner, new to India.* - *Curr. Sci.*, 1961, vol. 30, pp. 29-30.
- BERAN F. - *Anwendung von Pflanzenschutzmitteln und Bienenschutz.* - *Anz. Schädling.*, 1958, vol. 31, pp. 97-101.
- BERLINER E. - *Über die Schlafsucht der Mebelmottenraupe.* - *Z. ges. Cetreidew.*, 1911, vol. 3, pp. 63-70.
- *Über die Schlafsucht der Mebelmottenraupe (Ephestia kuehniella Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis, n. sp.* - *Z. Angew. Ent.*, 1915, pp. 29-56.
- BOTTCHER F. K. - *Die Gefährdung der Bienen durch den Pflanzenschutz.* - *Z. Angew. Ent.*, 1952, vol. 33, pp. 348-358.
- BRIGGS J. D. - *Reduction of adult house-fly emergence by the effects of Bacillus spp. on the development of immature forms.* - *J. Ins. Path.*, 1960, vol. 2, pp. 418-432.
- BURGERJON A. - *Titrage et definition d'une unité biologique pour les preparations de Bacillus thuringiensis Berliner.* - *Entomophaga*, 1959, vol. 4, pp. 201-206.
- *Relations entre l'intoxication provoquée par Bacillus thuringiensis Berliner et la consommation chez Pieris brassicae L.* - *Ann. Ephyph.*, 1962, vol. 13, pp. 59-72.
- BURGERJON A. e DE BARJAC H. - *Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par Bacillus thuringiensis Berliner.* - *C. R. Academ. Scien.*, 1960, vol. 251, pp. 911-912.
- CANTWELL G. E., KNOX D. A. e MICHAEL A. S. - *Mortality of honey bees, Apis mellifera Linnaeus, fed exotoxin of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner.* - *J. Ins. Path.*, 1964, vol. 6, pp. 532-536.
- CANTWELL G. E., KNOX D. A., LEHNERT T. e MICHAEL A. S. - *Mortality of the honey bee, Apis mellifera, in colonies treated with certain biological insecticides.* - *J. In. Path.*, 1966, vol. 8, pp. 228-233.
- CELLI G. - *Prime notizie su trattamenti sperimentali effettuati negli anni 1961-63, contro la Depressaria marcella Rebel, Lepidottero Gelechide dannoso alla Carota da seme.* - *Atti gior. fitopat.*, Bologna, 1963, pp. 127-135.

- DELAPORTE B. e BÉGUIN S. - *Etude d'une souche de Bacillus pathogène pour certains insects identifiables à Bacillus thuringiensis Berliner.* - Ann. Inst. Pasteur, 1955, vol. 89, pp. 632-643.
- FAST P. G. e ANGUS T. A. - *Effects of parasporal inclusions of Bacillus thuringiensis var. sotto Ishawata on the permeability of the gut wall of Bombyx mori (Linnaeus).* - J. Inver. Path., 1965, vol. 7, pp. 29-32
- FISHER R. e ROSNER L. - *Toxicology of the microbial insecticide, Thuricide.* - J. Agric. food. Chem. Whasington, 1959, vol. 7, pp. 686-688.
- FITZ-JAMES P. C., TOUMANOFF C. e YOUNG E. J. - *Localisation of a toxicity for silk-worm larvae in the parasporal inclusion of Bacillus cereus var. alesti.* - Can. J. Microbiol., 1958, vol. 4, pp. 385-392.
- GARY N. E. - *A trap to quantitatively recover dead and abnormal honey bees from the hive.* - J. Ec. Ent., 1960, vol. 53, pp. 782-785
- GIAMMANCO G., MILITELLO M. e MINEO G. - *Prove di lotta contro il Prays citri Mill. per mezzo di Bacillus thuringiensis.* - Boll. Ist. Ent. Agr. e Oss. Fitop. Palermo, 1965, vol. 6, pp. 1-16.
- GRISON P. - *L'utilisation des germes entomopathogènes en préparations mixtes ou en programme de lutte intégrée.* Rev. Zool. Agric., 1962, vol. 61, pp. 60-68.
- *La lutte biologique contre les Ravageurs.* - T. Bull. du C. I. Antip., Zurigo, 1963, pp. 8-12.
- GUKASJAN A. B. - *Die Anfalligkeit der Bienen für die Erreger der Krankheit des Sibirschen Spinners.* - Pcelovodstvo, Vyatka, 1958, vol. 11, pp. 47-48.
- HALL J. M. - *Microbial control.* - In: vol. 2 di: Insects pathology, edito da Steinhilber, Academic Press, N. Y., 1963, pp. 477-517.
- HANNAY C. L. - *Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria.* - Nature, 1953, vol. 172, pag. 1004.
- *Inclusions in bacteria.* - 6th Symposium Soc. gen. Microbiol., 1956, pp. 318-340.
- HANNAY C. L. e FITZ-JAMES P. C. - *The protein crystals of Bacillus thuringiensis Berliner.* - Can. J. Microbiol., 1955, vol. 1, pp. 694-710.
- HEIMPEL A. M. - *A strain of Bacillus cereus Fr. and Fr. pathogenic for the larch sawfly Pristiphora erichsonii (Htg.).* - Can. Entomol., 1954, vol. 86, pp. 73-77.
- *Investigations of the mode of action of strains of Bacillus cereus Fr. and Fr. pathogenic for the sawfly Pristiphora erichsonii (Htg.).* - Can. J. Zool., 1955, vol. 33, pp. 311-326.
- *Pathogenicity of Bacillus cereus Frankland and Frankland and Bacillus thuringiensis Berliner varieties for several species of sawfly larvae.* - J. Ins. Path., 1961, vol. 3, pp. 271-273.
- HEIMPEL A. M. e ANGUS T. A. - *The taxonomy of insects pathogens related to Bacillus cereus Fr. and Fr.* - Can. J. Microbiol., 1958, vol. 4, pp. 531-541.
- *The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae.* - J. Ins. Path., 1959, vol. 1, pp. 152-170.
- *Bacterial insecticides.* - Bacteriol. Rev., 1960 (a), vol. 24, pp. 266-288.
- *On the taxonomy of certain entomogenous crystalliferous bacteria.* - J. Ins. Path., 1960 (b), vol. 2, pp. 311-319.
- *The bacteriological control of insects.* - Proc. Ent. Soc. Ont., 1960 (c), vol. 90, pp. 13-21.
- HOOPINGARNER W. M. e MATERU M. E. - *Toxicology and histopathology of Bacillus thuringiensis Berliner in Galleria mellonella L.* - J. Ins. Path., 1964, vol. 6, pp. 26-30.
- HOSKINS W. M. e HARRISON A. S. - *The buffering power of the contents of the ventriculus of the honeybee and its effect upon the toxicity of Arsenic.* - J. Ec. Ent., 1934, vol. 28, pp. 924-942.

- JOHANSEN C. - *Impregnated foundation for Wax moth control*. - Gleanings Bee Cul., 1962, vol. 90, pp. 682-684.
- KAESER (1957): comunicazione personale a KRIEG ed HERFS, riportata dagli Autori (1963).
- KRIEG A. - *Bacillus thuringiensis Berliner*. - Mitt. biol. Bundesanstalt Land. Forstwirtschaft., Berlino-Dalem, 1961, vol. 103, pp. 3-79.
- *Über die Bienenertraglichkeit Industrie-Präparate des Bacillus thuringiensis*. - Anz. Schadling., 1964, vol. 37, pp. 39-40.
- KRIEG A. e FRANZ J. - *Versuche zur Bekämpfung von Wachsmotten mittels Bakteriöse*. - Naturwissenschaften, 1959, vol. 46, pp. 22-23.
- KRIEG A. ed HERFS W. - *Nebenwirkungen von Bacillus thuringiensis. Einwirkungen auf Bienen (Apis mellifera L.)*. - Coll. Int. Ins. Path., Parigi, 1962, pp. 193-195.
- *Über die Wirkungen von Bacillus thuringiensis auf Bienen*. - Ent. Exp. Appl., 1963, vol. 6, pp. 1-9.
- LECADET M. e MARTOURET D. - *La toxine figurée de Bacillus thuringiensis Berliner: production enzymatique des substances solubles toxiques par infection*. - C. R. Acad. Sci., 1962, vol. 254, pp. 2457-2459.
- *Étude comparée de l'hydrolyse enzymatique des cristaux des souches Bacillus thuringiensis sérotype I Berliner et de B. thuringiensis sérotype III anduze*. - Coll. Int. Path. Ins., Parigi, 1962; mém. hors sér. Entomophaga, 1964, vol. 2, pp. 205-212.
- *The enzymic hydrolysis of Bacillus thuringiensis crystals, and the liberation of toxic fractions of bacterial origin by the chyle of Pieris brassicae L.* - J. Inv. Path., 1965, vol. 7, pp. 105-108.
- LECOMTE J. e MARTOURET D. - *Non toxicité pour les abeilles des traitements à base de Bacillus thuringiensis souche Anduze, (bactérie pathogène pour les larves de Lépidoptères)*. - Ann. de L'Ab., 1959, vol. 2, pp. 171-175.
- LESKOVA A. V. e KULIKOV N. S. - *Action of Entobacterine - 3 and Thuricide on bees*. - Pchelovodstvo, 1963, vol. 40, pp. 32-33.
- MARTOURET D. - *Études préliminaires sur le mode d'action de Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner vis-à-vis de Pieris brassicae L.* - C. R. XI Congrès Inter. Entom., Vienna, 1960, vol. 2, pp. 849-855.
- MARTOURET D. e EUVERTE G. - *The effect of Bacillus thuringiensis Berliner preparations on the honey bee under conditions of forced feeding*. - J. Ins. Path., 1964, vol. 6, pp. 198-203.
- MARTOURET D., LHOSTE J. e ROCHE A. - *Action sur le mésenteron de Pieris brassicae L. de la toxine de l'inclusion parasporale de Bacillus thuringiensis Berliner*. - Entomophaga, 1965, vol. 10, pp. 349-365.
- MATTES D. - *Parasitare Krankheiten der Mehlmotenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel*. - Sitzber. Ges. Befröder. ges. Naturw., Marburgo, 1927, vol. 62, pp. 381-417.
- MC CONNELL E. e RICHARDS A. G. - *The production by Bacillus thuringiensis Berliner of a heat-stable substance toxic for insects*. - Can. J. Microbiol., 1959, vol. 5, pp. 161-168.
- METCALF R. L. - *Report on traveling Symposium on Pesticides of National Academy of Sciences*. - University of California, Riverside, 1965, 14 pp.
- NIZI G. - *Il Bacillus thuringiensis contro la Tignola dell'Oливо*. - Progr. agric., fasc. 11, 1962.
- *L'impiego degli insetticidi biotici a base di Bacillus thuringiensis Berliner*. - Note e app. sper. di Ent. agr., 1963, fasc. 10, pp. 1-24.

- POLTEV V. I. - *Microbiological control method in beekeeping*. - Proc. Intern. Bee-keeping Congr., Mosca, 1963, vol. 19, pp. 244-249.
- PROTA R. - *Tre anni di esperienze di lotta condotte in Sardegna contro la Depressaria erinaceella Stgr.* (Lepidoptera Gelechiidae). - Studi Sass. (Ann. fac. Agr. Sassari), 1960, vol. 8, pp. 1-25.
- SHIMANUKI H. e HARTMANN P. A. - *Effect of Bacillus thuringiensis on honey bee populations*. - Bact. Proc., 1963, vol. 63, pag. 10.
- SMIRNOFF W. A. e BERLINGUET L. - *A substance in some commercial preparations of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis toxic to sawfly larvae*. - J. Inv. Path., 1966, vol. 8, pp. 376-381.
- STEINHAUS E. A. - *Possible use of Bacillus thuringiensis Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar*. - Hilgardia, 1951, vol. 20, pp. 359-381.
- *Concerning the harmlessness of insect pathogens and standardization of microbial products*. - J. Ec. Ent., 1957, vol. 50, pp. 715-720.
- *On the improbability of Bacillus thuringiensis Berliner mutating to forms pathogenic for vertebrates*. - J. Ec. Ent., 1959, vol. 52, pp. 506-508.
- *The duration of variability and infectivity of certain insect pathogens*. - J. Ins. Path. 1960, vol. 2, pp. 225-229.
- *On the correct author of Bacillus sotto*. - J. Ins. Path., 1961, vol. 3, pp. 97-100.
- STEINHAUS E. A. e JERREL E. A. - *Further observations on Bacillus thuringiensis Berliner and other sporeforming bacteria*. - Hilgardia, 1954, vol. 23, pp. 1-23.
- STUTE K. - *Über die Wirkung von Bacillus thuringiensis auf die Honibiene (Apis mellifera L.)*. - Nachr. bl. Pfl. Schutz. Braun., 1963, vol. 15, pp. 102-104.
- TAMASHIRO M. - *The susceptibility of Bracon-paralyzed Coreyra cephalonica Stainton to Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner*. - J. Ins. Path., 1960, vol. 2, pp. 209-219.
- TANADA T. - *Susceptibility of the imported cabbage worm to Bacillus thuringiensis Berliner*. - Proc. Hawaiian Entomol. Soc., 1953, vol. 15, pp. 159-166.
- TOUMANOFF C. - *A propos d'un bacille pathogène pour le vers à soie au Japon (Bacillus sotto Ishawata) et ses affinités avec d'autres bacilles entomophytes*. - Ann. Inst. Pasteur, 1952, vol. 82, pp. 512-516.
- *Description de quelques souches entomophytes de Bacillus cereus Frank. et Frank., avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf*. - Ann. Inst. Pasteur, 1953, vol. 85, pp. 90-98.
- TOUMANOFF C., LAPIED M. e MALMANCHE L. - *Au sujet de souches cristallogènes entomophytes de cereus. Observations sur leurs inclusions cristallines*. - Ann. Inst. Pasteur, 1955, vol. 89, pp. 644-653.
- TOUMANOFF C. e LE COROLLER V. - *Contribution à l'étude de Bacillus cereus Frank. et Frank. cristallogènes et pathogènes pour les larves des Lépidoptères*. - Ann. Inst. Pasteur, 1959, vol. 96, pp. 680-688.
- TOUMANOFF C. e VAGO C. - *L'agent pathogène de la flacherie de vers à soie endémique dans la région des Cévennes: Bacillus cereus var. alesti var. nov.* - C. R. Academ. Scien., 1951, vol. 233, pp. 1504-1506.
- *Étude histopathologique de vers à soie atteints de Bacillus cereus var. alesti*. - Ann. Inst. Pasteur, 1953, vol. 84, pp. 376-386.
- VANKOVA J. - *Study of the effect of Bacillus thuringiensis on insects*. - Folia biol. (Praga), 1957, vol. 3, pp. 175-182.
- WILSON W. T. - *Observation on the effects of feeding large quantities of Bacillus thuringiensis Berliner to honey bees*. - J. Ins. Path., 1962, vol. 4, pp. 269-270.
- ZOCCHI R. - *Microorganismi patogeni nella lotta contro gli insetti*. - Atti Acc. Georg., 1961, vol. 8, pp. 378-396.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

TAV. I.

- Fig. 1 - Sezione longitudinale di mesointestino di un'ape (testimone a miele). Si noti l'aspetto regolare delle anse, con cellule a calice e cripte, e la normale disposizione della membrana peritrofica stratificata ($\times 60$).
- Fig. 2 - Sezione trasversale di mesointestino di un'ape trattata con bentonite in miele. Parete normale e membrana peritrofica regolarmente stratificata. ($\times 60$).
- Fig. 3 - Particolare della Fig. 1. In evidenza la membrana peritrofica e la zona gelatinosa che ricopre il villo. ($\times 240$).
- Fig. 4 - Sezione longitudinale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in miele. La membrana peritrofica è scomparsa mentre rimangono tracce della zona gelatinosa. Si noti la riduzione del tessuto in confronto all'analogia Fig. 3. ($\times 240$).

TAV. II.

- Fig. 1 - Sezione longitudinale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in miele. Evidente l'erosione e la disgregazione della parete, le cui cellule appaiono inoltre alterate nell'interno. ($\times 240$).
- Fig. 2 - Sezione longitudinale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in miele. Fase più avanzata di erosione e disgregazione della parete cellulare. ($\times 240$).
- Fig. 3 - Sezione longitudinale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in candito. Visione di insieme, che mostra la diffusa erosione e riduzione della parete (si confronti con la Fig. 1, Tav. I) e resti della peritrofica nel lume. Parecchi batteri ($\times 60$).
- Fig. 4 - Sezione trasversale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in miele. Parete estremamente ridotta, specie in alcuni tratti, e molte cellule degenerate nel lume, insieme a tracce della peritrofica (si confronti con la Fig. 2, Tav. I). ($\times 60$).

TAV. III.

- Fig. 1 - Sezione longitudinale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in candito. A zone ancora morfologicamente abbastanza regolari, seppure estremamente ridotte in volume, se ne alternano altre il cui tessuto è completamente degenerato, con presenza di « croste ». C, crosta. ($\times 240$).
- Fig. 2 - Sezione longitudinale superficiale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in candito. Particolare di « crosta » (C). ($\times 600$).
- Fig. 3 - Sezione longitudinale di mesointestino di un'ape trattata con il preparato batterico in candito. Si noti la grande massa di cellule disgregate nel lume intestinale, ricco anche di batteri. ($\times 240$).
- Fig. 4 - Batteri nel tubo digerente di un'ape trattata con il preparato batterico in candito. ($\times 600$).



