

## Applicazione dell'ozono in apicoltura: risultati preliminari

Marcella Milito<sup>1</sup>, Cinzia Marianelli<sup>2</sup>, Marco Pietropaoli<sup>1</sup>, Jorge Rivera Gomis<sup>1</sup>, Viviana Belardo<sup>1</sup>, Giovanni Formato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"

<sup>2</sup>Istituto Superiore di Sanità

### Occhiello:

*L'ozono viene ad oggi presentato agli apicoltori come un vero toccasana per le api. Secondo quanto pubblicizzato, infatti, sarebbe ottimale per: la lotta alla varroa ed altre malattie delle api; la disinfezione degli alveari infetti da peste americana ed europea; la riduzione della contaminazione da residui nella cera..... Di fronte a tutto questo, però, ben poche sono le evidenze scientifiche relative all'applicazione di questa tecnologia in apicoltura. Nel presente articolo vengono riportati i risultati preliminari di prove sperimentali condotte dall'IZS Lazio e Toscana sull'argomento. Non ci resta che capire: ci troviamo di fronte ad un approccio innovativo o ad un nuovo specchietto per le allodole?*

### 1. Introduzione

L'ozono (O<sub>3</sub>) è un gas incolore e dall'odore aspro, composto da tre atomi di ossigeno che tendono a decomporsi spontaneamente liberando ossigeno.

A causa della sua instabilità, l'ozono deve essere prodotto sul luogo di impiego tramite specifiche apparecchiature detti ozonatori (Figura 1) che, sfruttando l'energia elettrica, formano ozono partendo dall'ossigeno presente nell'aria. Tali dispositivi sono disponibili in commercio in varie tipologie, in funzione delle esigenze degli utilizzatori e del substrato su cui devono agire.



Figura 1 - Ozonatore (foto IZSLT - UO Apicoltura)

## 2. L'ozono come disinfettante

L'ozono possiede un forte potere ossidante in grado di ossidare ed inattivare numerosi composti organici ed inorganici.

Sfruttando il suo effetto battericida, sporicida, fungicida e inattivante dei virus, da anni l'ozono viene usato come disinfettante in diversi ambiti: nella depurazione delle acque (es. vasche dei molluschi, piscine, potabilizzazione dell'acqua, trattamento delle acque reflue), nella sanificazione degli ambienti (ad es. frigoriferi, ambienti domestici) e dei materiali a contatto con alimenti (es. bottiglie), nella disinfezione dell'aria, di derrate alimentari (ad es. contro gli acari del prosciutto nelle celle di stagionatura), del legno, di frutta e verdura. L'ozono viene anche utilizzato per lo sbiancamento dei tessuti e per la neutralizzazione dei gas di scarico industriali contenenti solfato. Il suo impiego non rilascia residui chimici nel materiale trattato: l'ossigeno che ne deriva non è tossico e non richiede alcun trattamento per la sua eliminazione.

L'acqua ozonizzata in un contenitore aperto è in grado di mantenere l'attività antimicrobica per i primi 20 minuti dalla sua formazione, mentre il 50% dell'ozono prodotto in forma gassosa nell'ambiente è destinato a ritornare ossigeno dopo solo 55 minuti dalla sua produzione.

L'azione battericida, fungicida e antivirale dell'ozono è nota da tempo e si origina dalla sua interazione con l'acqua: i germi trattati in ambiente secco non sono infatti disattivati (Sonntag, 1890). Il Ministero della Salute dal 1996 (prot. N. 24482 del 32/07/1996) lo considera un "presidio naturale per la sterilizzazione di ambienti" e dal 2001 la FDA negli USA ha ammesso l'impiego di ozono anche nei processi produttivi dell'industria alimentare.

Nell'uomo l'ozono, ad alte dosi, può avere effetti irritanti ed infiammatori a carico delle mucose e dei tessuti del sistema respiratorio, spesso accompagnati da tosse, nausea e dolori al petto.

## 3. La ozonoterapia

Oltre alle qualità antimicrobiche, l'ozono sembra possedere anche proprietà terapeutiche se miscelato con l'ossigeno nelle giuste proporzioni. Le opinioni a tale riguardo sono però contrastanti. In ozonoterapia, l'ozono viene utilizzato per la cura di patologie a carico della cute (determinate), del disco intervertebrale e delle patologie degenerative artrosiche, sia vertebrali sia articolari, e tendinee (tendiniti e tendinosi). L'ozono viene anche utilizzato per il trattamento estetico della cellulite.

Le maggiori organizzazioni sanitarie riconosciute a livello internazionale considerano l'ozonoterapia e l'esposizione ad ozono entrambi trattamenti inutili o dannosi. In Italia l'Istituto Superiore di Sanità ha approvato la pratica dell'ossigeno-ozono terapia, istituendo l'albo degli Ozonoterapeuti. La stessa "Federazione italiana di ossigeno-ozonoterapia" fa rientrare tale pratica nell'alveo delle *medicines non convenzionali* per le quali deve essere doverosamente informato il paziente circa le riserve esistenti sulla asserita efficacia terapeutica.

## 4. Impiego dell'ozono in apicoltura

Da diversi mesi viene proposto agli apicoltori l'impiego dell'ozono per il raggiungimento di molteplici finalità, tra cui:

- la disinfezione e/o disinfestazione degli ambienti per eliminare batteri, funghi, virus, acari e insetti;
- la disinfezione del materiale apistico e delle attrezzature (ad es. arnie) e dei telaini nei confronti della peste delle api (sia americana che europea) e delle virosi;
- la decontaminazione della cera da acaricidi, come ad esempio il coumaphos od il tau-fluvalinate;
- il controllo di patologie specifiche delle api quali: la varroatosi (*Varroa destructor*), la peste americana (*Paenibacillus larvae*), la peste europea (*Melissococcus plutonius*), la covata calcificata (*Ascosphaera apis*) e la tarma della cera (*Galleria mellonella*);
- aumentare il vigore degli alveari.

Insomma, un vero “toccasana apistico”, anche se va rimarcato che gli studi condotti al fine di accertare l’efficacia di tali applicazioni, sono veramente limitati.

#### **4.1. Prove sperimentali presso IZSLT**

L’Unità Operativa (UO) di Apicoltura dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri” (IZSLT), tra il 2015 ed il 2016 ha realizzato tre studi sull’efficacia dell’applicazione dell’ozono in apicoltura, per soddisfare l’interesse di due diverse Associazioni di apicoltori.

**Il primo studio (S1)**, eseguito nel giugno 2015 presso l’IZS di Firenze dal personale della UO di Apicoltura e dell’Istituto Superiore di Sanità di Roma, aveva lo scopo di verificare l’efficacia battericida dell’ozono nei confronti della peste europea delle api (European Foulbrood – EFB). A tale scopo sono stati utilizzati favi con covata infetta da *M. plutonius*.

**Il secondo studio (S2)**, eseguito nel luglio 2015 dal personale della UO di Apicoltura dell’IZSLT in collaborazione con un produttore di ozonatori, è stato condotto invece per testare l’efficacia battericida e sporicida dell’ozono nei confronti della peste americana delle api (American Foulbrood – AFB). In questo studio sono stati utilizzati favi con covata infetta da *P. larvae*.

**Il terzo studio (S3)**, eseguito nel dicembre 2015 dal personale della UO di Apicoltura dell’IZSLT, è stato eseguito per testare sia l’efficacia acaricida dell’ozono nei confronti della varroa (*Varroa destructor*), sia la potenziale tossicità dello stesso nei confronti delle api.

#### **S1: prove di efficacia nei confronti del *M. plutonius***

Una porzione di favo infetto da peste europea<sup>1</sup> ed una leva da apicoltore, contaminata artificialmente con il contenuto di larve ammalate della stessa malattia, sono stati utilizzati nella sperimentazione. L’azione germicida dell’ozono è stata testata in due diversi ambienti: in ambiente chiuso ed in acqua. Per il trattamento in ambiente chiuso, il materiale sopra descritto (porzione di favo e leva) è stato posizionato all’interno di un contenitore di polistirolo con chiusura non ermetica, per simulare la situazione potenzialmente rinvenibile all’interno dell’alveare sottoposto a

---

<sup>1</sup> La peste europea delle api è una malattia dovuta al batterio *Melissococcus plutonius* (cocco, Gram positivo), che spesso è associato ad altri batteri, tra cui particolarmente abbondante il *Paenibacillus alvei* (bacillo, Gram positivo), oltre a *Streptococcus faecalis*, *Achromobacter eurydice*, *Bacillus laterosporus*.

trattamento disinfettante. Sul coperchio è stato applicato un foro per consentire, una volta chiuso, l'ingresso del tubo erogatore dell'ozono, come mostrato in Figura 2.

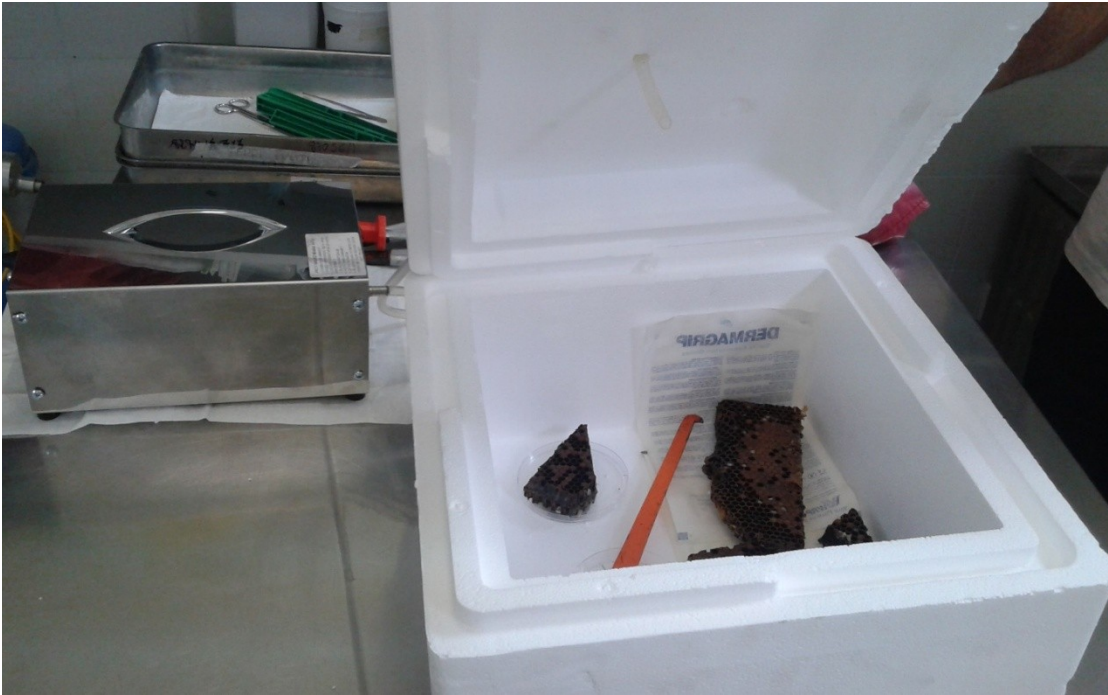


Figura 2 – Favo e leva infetti da peste europea sottoposti a trattamento con ozono in ambiente chiuso

Le porzioni di favo infette sono state trattate per 10 e 60 minuti con ozono all'interno del contenitore di polistirolo (trattamento in ambiente chiuso) e per 10 minuti in acqua in cui veniva fatto gorgogliare ozono (trattamento per immersione) per verificare se in tale maniera fosse possibile ottenere risultati migliori (Fig. 3). Dal materiale trattato sono stati effettuati dei tamponi per esame colturale e PCR.



Favo 3 –Trattamento mediante immersione in acqua ozonizzata

Risultati della prova in ambiente chiuso: Non è stata riscontrata alcuna significativa riduzione della carica microbica presente nei favi infetti e sulla leva contaminata, anche dopo 60 minuti di trattamento. E' stato possibile infatti rinvenire il *M. plutonius* (agente responsabile della peste europea) ed altre specie batteriche, quali lattobacilli, streptococchi, enterococchi e *P. alvei* (germe di accompagnamento della peste europea), sia dopo 10 minuti sia dopo un'ora di trattamento.

Risultati della prova in acqua: E' stata riscontrata una riduzione della carica microbica adesa alla superficie della leva. Il *P. alvei*, sebbene in quantità inferiori, è stato isolato anche dopo 10 minuti di trattamento. Non è possibile però valutare il ruolo giocato dall'acqua (effetto "ammollo") nel fenomeno osservato: la semplice immersione della leva in acqua potrebbe aver facilitato il distacco del materiale organico di superficie e determinato, di conseguenza, la riduzione della carica microbica rivelata.

Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile giungere alle seguenti considerazioni:

- 1- Il trattamento con ozono in ambiente chiuso è risultato inefficace in quanto una flora batterica variegata ed abbondante è stata rinvenuta anche dopo il prolungamento del trattamento per 60 minuti;
- 2- Il trattamento con ozono in acqua richiede ulteriori approfondimenti per comprendere meglio i ruoli giocati dall'ozono e dall'acqua (effetto "ammollo") nella riduzione della carica microbica di superficie, sebbene le forme sporigene (per es. il *P. alvei*) siano sopravvissute.

Il conclusione, l'ozono non ha evidenziato una soddisfacente attività battericida alle condizioni sperimentali adottate nei confronti della peste europea.

## **S2: prove di efficacia nei confronti del *P. larvae***

Un favo di covata ammalata di peste americana (American Foulbrood – AFB) è stato diviso a metà: una porzione è stata trattata con ozono, l'altra è stata utilizzata come controllo (non trattato).

Dopo il trattamento con ozono, sono stati prelevati dei campioni sottoposti poi ad analisi microbiologica (Figure 4), al fine di valutare la carica microbica e confrontarla con il controllo.

Il favo trattato risultava ancora infetto: il *P. larvae* veniva isolato in grande quantità.



Figura 4 – Piastre seminate con la covata di api, pronte per essere messe in incubatore

In conclusione, anche in questo studio l'ozono non ha evidenziato alcuna azione battericida nei confronti dell'agente eziologico della peste americana, nelle condizioni sperimentali adottate.

### **S3: prove di efficacia nei confronti della *V. destructor* e di tossicità verso le api.**

Cinque alveari in assenza di covata sono stati trattati con ozono mediante erogazione dello stesso direttamente nell'alveare per 20 minuti e seguendo le istruzioni della Ditta produttrice della strumentazione utilizzata (Figura 5).

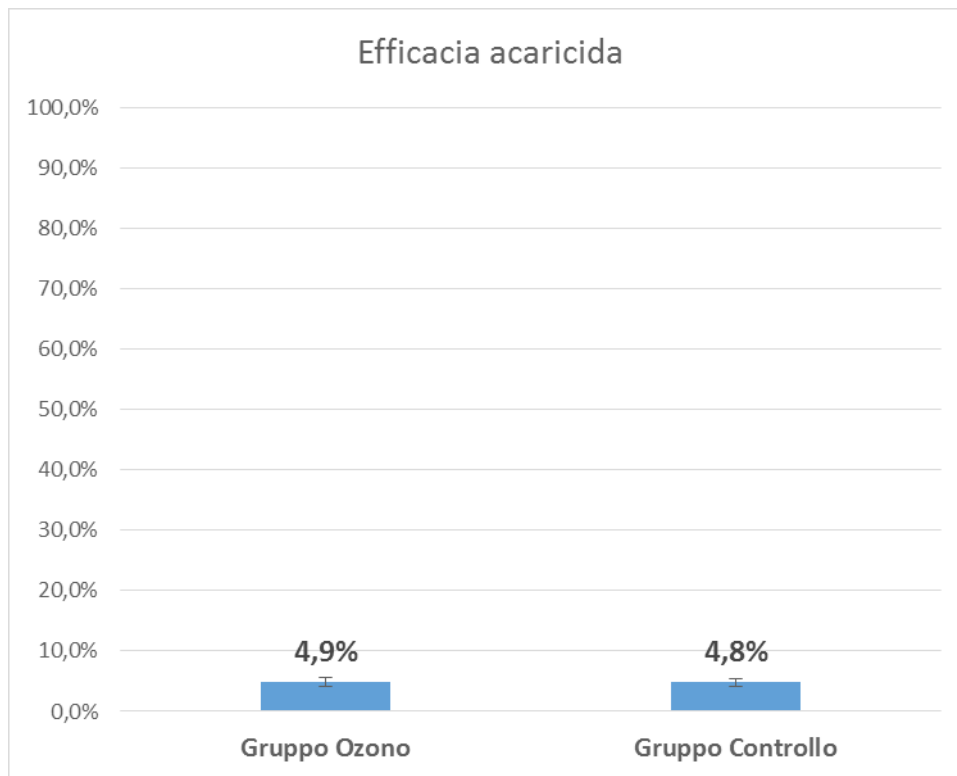
Altrettanti alveari sono stati utilizzati come controllo non trattato.



Figura 5 - Alveari sottoposti a sperimentazione

Per valutare l'efficacia acaricida del trattamento dell'ozono è stato eseguito un trattamento in assenza di covata, dopo 14 giorni dalla somministrazione dell'ozono, con Apibioxal® e Apivar®.

L'efficacia acaricida (Fig. 5) ottenuta con il trattamento con ozono è risultata pari al  $4,9\% \pm 0,8\%$ , mentre la caduta naturale riscontrata nel gruppo di controllo non trattato è stata pari a  $4,8\% \pm 0,7\%$ .



*Figura 5 - Efficacia acaricida ottenuta negli alveari trattati con ozono, rispetto agli alveari non trattati*

La differenza di efficacia tra il gruppo trattato con ozono ed il gruppo di controllo non è risultata statisticamente significativa.

La forza degli alveari intesa come popolosità di api adulte dei due gruppi sperimentali è stata valutata il giorno del trattamento e alla fine del periodo di efficacia stimato dell'ozono (pari a 14 giorni) mediante il metodo dei sestì (Delaplane et al., 2013).

Nel gruppo trattato con ozono si è avuta una riduzione della quantità di api adulte maggiore rispetto a quella avuta nel gruppo di controllo, sebbene non significativa (Fig. 6).

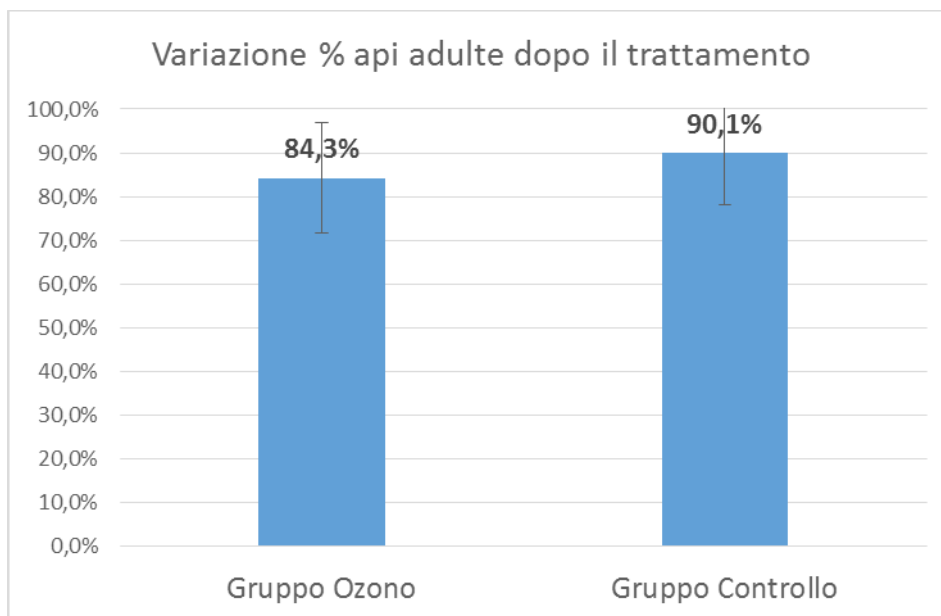


Figura 6 - Variazione percentuale della quantità di api adulte rispetto a prima del trattamento (100%)

La mortalità acuta delle api (Fig. 7) è stata valutata calcolando il numero di api morte cadute nei giorni successivi al trattamento posizionando appositi contenitori, detti gabbie *under basket*, davanti agli alveari.

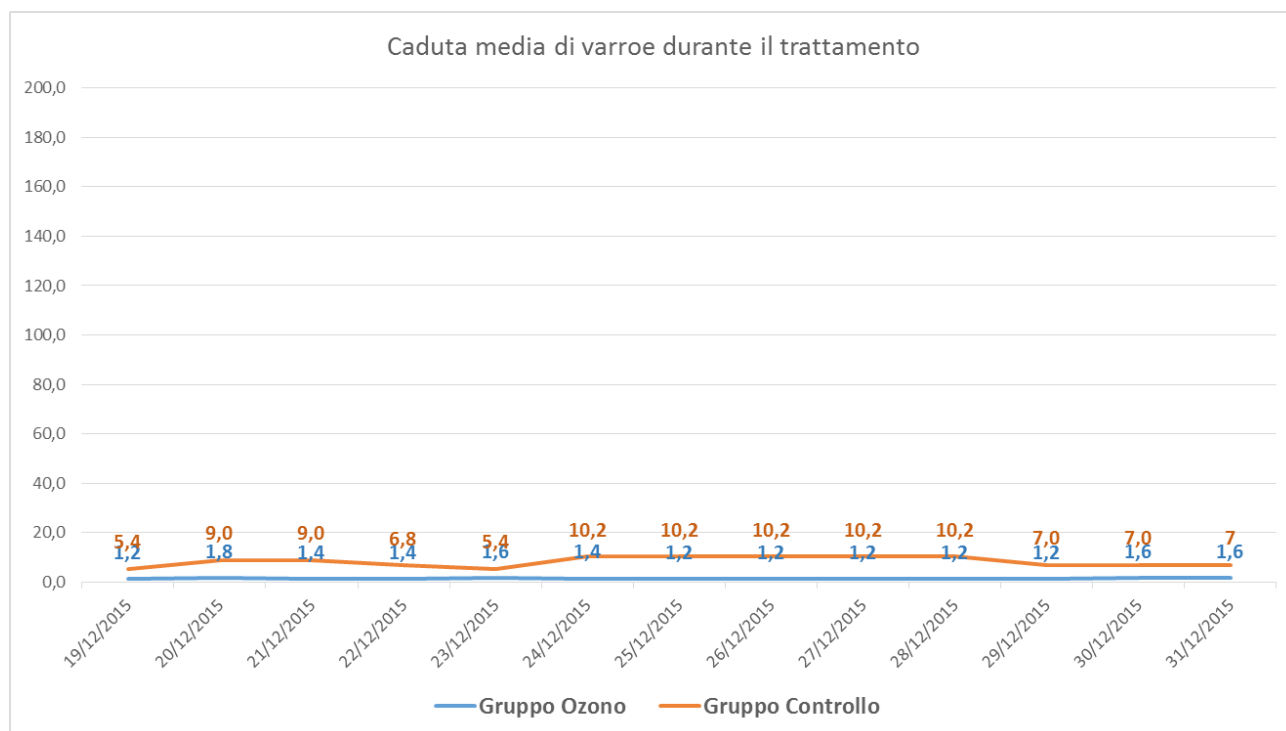


Figura 7 - Mortalità media delle api morte contate giornalmente nelle gabbie *under basket*

In figura 7 sono riportati i dati di mortalità delle api rinvenuti nelle gabbie *under basket*. Come è possibile notare, non sono stati rinvenuti fenomeni di mortalità acuta dovuti al trattamento.

Alla fine del periodo di trattamento è stata valutata anche la mortalità delle api regine. Quest'ultima è risultata assente, sia nel gruppo trattato che nel gruppo di controllo.



## Considerazioni e conclusioni

In seguito ai trattamenti effettuati con l'ozono sui favi infetti e la leva contaminata di peste europea ed americana, non è stato possibile eliminare i germi presenti con i protocolli adottati nei suddetti studi.

In particolare, i batteri sporigeni (come il *Paenibacillus larvae* che è il germe responsabile della peste americana, ed il *Paenibacillus alvei* che è il germe di accompagnamento della peste europea) sono riusciti a sopravvivere a tutte le modalità di applicazione dell'ozono illustrate nel presente lavoro. Finanche i batteri con minore resistenza agli stress esogeni, quali il *Melissococcus plutonius* (agente responsabile della peste europea) ed i lattobacilli si è visto essere in grado di sopravvivere a 60 minuti di trattamento con l'ozono in ambiente chiuso nelle condizioni da noi adottate.

I risultati ottenuti evidenziano l'assenza di capacità di penetrazione dell'ozono nel materia organica ed in particolare nelle larve infette di peste americana ed europea.

D'altro canto, anche il trattamento con ozono ai fini della riduzione del livello di infestazione da *Varroa destructor* negli alveari, nonostante non siano stati registrati fenomeni di tossicità o mortalità delle api regine in seguito al trattamento, non risulta essere soddisfacente, considerando che un buon trattamento acaricida dovrebbe attestarsi almeno attorno all'85-90% di efficacia.

Ulteriori approfondimenti andrebbero realizzati per verificare:

- 1) l'efficacia acaricida/disinfettante di diversi ozonatori in funzione della quantità di ozono che sono in grado di produrre;
- 2) l'efficacia di ripetuti trattamenti;
- 3) l'efficacia in funzione del substrato (favo, covata malata, legno, leve, etc...) sottoposto a disinfezione;
- 4) l'efficacia germicida in funzione dei diversi tipi (es. sporigeni o meno) e quantità di germi trattati.

Si dovranno infine considerare anche gli effetti secondari dell'impiego dell'ozono, come ad esempio gli effetti svantaggiosi su caratteristiche organolettiche dei prodotti dell'alveare assoggettati a trattamento (es. ossidazione del polline).

Ma la cosa più importante sarà quella di mettere in commercio per il settore apistico, macchinari che siano già stati testati e registrati per il loro impiego in apicoltura, con dati certi inerenti protocolli di efficacia e tossicità, già validati a livello internazionale.

## Bibliografia

Delaplane, K.S., van der Steen, J., Guzman, N.E. (2013) Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J. Apic. Res.* 52 (1), 1–12

<http://www.eapis.it/ozono-e-varroa-la-parola-alla-scienza/>

<http://www.apicolturangrisani.it/notizie/1110-utilizzo-dell-ozono-nel-trattamento-delle-tarme-della-cera-e-della-varroasi-settore-apistico.html>