

Studio degli effetti del probiotico *ProBee*® sulla dinamica di popolazioni di *Apis mellifera*.

Autori: Giovanni Formato, Marco Pietropaoli, Antonella Milito, Massimo Palazzetti, Elisa Boi.

Introduzione

Negli ultimi decenni, le api domestiche stanno subendo numerose minacce, che mettono a dura prova la loro sopravvivenza. La natura di tali minacce può essere sia antropica (pesticidi, coltivazioni OGM, onde elettromagnetiche), sia biologica (virus, batteri, insetti, mammiferi). (Contessi A., 2004; Morse R.A. e Flottum K., 1997).

Un fenomeno che negli U.S.A. desta non poche preoccupazioni tra apicoltori ed ambientalisti è la “Sindrome dello spopolamento degli alveari” o “Colony Collapse Disorder” (CCD), le cui cause non sono ancora chiare. Quello che si sta verificando è uno spopolamento delle colonie all’inizio della stagione, che si manifesta con una frequenza sempre più elevata. Le modalità di trasmissione e diffusione non sembrano seguire uno schema preciso, ed è proprio questo che rende la CCD così difficile da inquadrare e comprendere. In Europa ci troviamo ad affrontare un fenomeno simile, più genericamente definito: spopolamento e morte degli alveari. (Van Engelsdorp D. *et al.*, 2007).

Le patologie che possono colpire gli alveari sono innumerevoli. La peste americana è sicuramente la malattia infettiva della covata più diffusa e allo stesso tempo la più pericolosa. È una patologia ad origine batterica, il cui agente eziologico è il *Paenibacillus larvae*. (Genersch E. *et al.*, 2006; White G.F., 1906). Il contagio delle larve avviene mediante l’ingestione delle spore batteriche. In seguito il batterio uccide le larve per setticemia. Le famiglie infette sono caratterizzate dall’aver una covata non compatta o “a mosaico”, con opercoli forati. Inoltre, le larve divengono di un colore più scuro, tendente al nocciola, assumendo una consistenza vischiosa. (Gregorc A. e Bowen I.D., 1998). Un’altra importante patologia, sempre di origine batterica è la peste europea, provocata dal *Melissococcus plutonius*. È una malattia denunciabile, che colpisce la covata prima dell’opercolatura delle cellette. Le modalità di contagio e diffusione sono le stesse della peste americana. Le larve diventano giallastre, successivamente alla morte si inscuriscono e si trasformano in una massa molle, che una volta seccata, forma una scaglia color ruggine facilmente asportabile dalla celletta. La covata appare anche in questo caso non uniforme e la presenza del batterio le conferisce un caratteristico odore acido. (Ferrari C. 2010).

Le larve possono essere colpite anche da malattie virali, come ad esempio la covata a sacco, provocata dall'omonimo virus (*Sacbrood virus*) in cui le larve vengono infettate nei loro primissimi giorni, anche se la patologia si manifesta dopo l'opercolatura delle cellette. La covata si presenta con gli opercoli forati e la larva è visibile. La peculiarità di questa patologia è che il corpo della larva si fluidifica, mentre il tegumento rimane integro. Di conseguenza la larva assume un aspetto definito "a sacchetto", da cui la patologia prende il nome. (Bailey L., 1969; 1975).

La nosemiasi, invece, è una malattia delle api adulte provocata da due funghi unicellulari: *Nosema apis* e *Nosema ceranae*. Il problema di queste due diverse patologie è che spesso si presentano in forma asintomatica, sia a livello delle singole api sia a livello delle colonie, tranne che per fenomeni diarroici riscontrabili sul predellino di volo nel caso della forma intestinale da *Nosema apis*. (Bourgeois A.L. *et al.*, 2010; Forsgren E. e Fries I., 2010).

Innumerevoli sono le malattie virali che possono infettare le api adulte. A tutt'oggi sono stati identificati 18 virus, la maggior parte dei quali veicolati dal parassita *Varroa destructor*. Tra di essi i più diffusi sono: *Chronic Bee Paralysis Virus*, o *Virus della Paralisi Cronica* (CBPV); *Acute Bee Paralysis Virus*, o *Virus della Paralisi Acuta* (ABPV); *Deformed Wing Virus*, o *Virus delle Ali Deformi* (DWV). (Bakonyi T. *et al.*, 2002; de Miranda J.R. e Genersch E., 2010; Ribiere M. *et al.*, 2010).

Tra tutte le patologie che possono manifestarsi in una famiglia, però, la varroatosi è sicuramente quella che desta maggiori preoccupazioni negli apicoltori. È una patologia provocata da un acaro, *Varroa destructor*, il cui ciclo biologico va di pari passo con quello delle api. Il danno principale non deriva tanto dalla presenza dell'acaro stesso nelle famiglie, quanto piuttosto dai patogeni di cui esso rappresenta un veicolo d'infezione: batteri, virus e funghi. (Anderson D.L. e Trueman J.W.H., 2000; Boecking O. e Genersch E., 2008; Gliński Z. e Jarosz J., 1992; Kanga L.H.B. *et al.*, 2002).

Inoltre la nuova emergenza sanitaria, *Aethina Tumida*, sta creando allarme e preoccupazione in tutta Europa. Il coleottero degli alveari si insedia soprattutto in alveari con famiglie deboli, nei quali reca danni nei confronti della covata, uova e scorte di miele.

Negli anni, quindi, è nata l'esigenza di trovare una soluzione a questi problemi, così da salvaguardare la salute delle api domestiche. Un primo approccio è stato quello di ricorrere a prodotti e metodi di natura chimica. Le conseguenze, però, sono state: la diffusione di patogeni resistenti e l'insorgenza di effetti secondari (come ad esempio il rilascio di sostanze chimiche nell'alveare), che hanno aggravato ulteriormente la situazione. È nata quindi la necessità di provvedere alla produzione di prodotti di origine biologica in grado di ovviare ai problemi secondari generati dai prodotti chimici.

Una nuova frontiera è costituita dai probiotici, i quali hanno già dimostrato di essere in grado di avere effetti benefici su uomo e animali. Per probiotici si intende “*microrganismi vivi e vitali che conferiscono benefici alla salute dell’ospite quando consumati in adeguate quantità, come parte di un alimento o di un integratore.*” (Expert Consultation FAO/WHO, 2001). Non tutti i microrganismi possono essere considerati tali, ma devono essere rispettate alcune caratteristiche: devono indurre degli effetti benefici scientificamente dimostrati; devono essere vivi, vitali e presenti in grandi quantità; non devono essere tossici o patogeni; devono sopravvivere all’ambiente intestinale. (Fuller R., 1989).

Si è deciso quindi di sperimentare gli effetti di un prodotto costituito da una miscela selezionata di microrganismi, **ProBee®**, sullo stato di salute delle api.

Materiali e Metodi

ProBee® è un’associazione di microrganismi non OGM vivi e vitali, la cui attività metabolica produce delle sostanze che inducono un effetto positivo sulle condizioni della colonia così da ripristinare e mantenere una condizione di benessere ideale per la famiglia.

Il **ProBee®** è un prodotto facile da impiegare: non è necessario estrarre i telaini per l’applicazione del prodotto, è sufficiente spuzzare sopra l’arnia dopo avere aperto il coprifavo. Ogni applicazione richiede circa dai 20’’ ai 30’’.

Sono state condotte due sperimentazioni in collaborazione con l’IZS del Lazio e della Toscana: la prima nella primavera del 2012 e la seconda nell’estate del 2014. Quest’ultimo studio ha anche visto la collaborazione dei Servizi Veterinari dell’ASL di Viterbo.

Per la sperimentazione del 2012 si è ricorsi all’utilizzo di 24 famiglie, site presso l’apiario sperimentale dell’IZS di Roma, suddivise in 2 gruppi sperimentali omogenei e casuali: **Gruppo ProBee®** e **Gruppo C** (Controllo). Il **Gruppo ProBee®** è stato trattato con il **ProBee®**, mentre il **Gruppo C** non ha subito alcun trattamento.

Il **ProBee®** è stato somministrato ogni 30 giorni per un totale di 4 trattamenti a partire dall’Aprile 2012. Le somministrazioni sono state effettuate spruzzando il prodotto direttamente sull’arnia, dopo aver sollevato il coperchio e il coprifavo, mediante una pompa erogatrice a spruzzo, in una quantità pari a 10 ml/telaino.

Ad inizio e a fine sperimentazione si è provveduto alla valutazione della forza delle famiglie mediante il metodo della stima dei sestini, valutando la quantità di api adulte, la quantità di covata opercolata e non opercolata e la quantità di uova.

La sperimentazione condotta nell'estate del 2014 è, invece, stata condotta in doppio, impiegando due apiari sperimentali diversi: uno sito presso l'IZS di Roma, dove si sono utilizzate 32 famiglie; uno sito presso i Servizi Veterinari dell'ASL di Viterbo, dove si sono utilizzate 30 famiglie. Tutte le famiglie sono state suddivise in 4 gruppi omogenei e casuali a cui sono stati somministrati dei diversi dosaggi della stessa formulazione di **ProBee®**: **PROMIN** (1 bustina di prodotto liofilizzato), **PROMAX** (3 bustine di prodotto liofilizzato), **PRO10X** (30 bustine di prodotto liofilizzato) e **CONTROLLO**. Il gruppo CONTROLLO è stato trattato solamente con una soluzione zuccherina. Per questa



sperimentazione si è utilizzato il prodotto in forma liofilizzata, il quale è stato preparato nelle relative concentrazioni versando il contenuto di

Fig. 1 Spruzzatore ad innesco in plastica utilizzato per la somministrazione del **ProBee®** direttamente sui favi.

una bustina in una bottiglia da 1 L, a cui è stato aggiunto il 3% del volume finale in zucchero e si è portato tutto a volume con della semplice acqua del rubinetto. Il **ProBee®** è stato somministrato ogni 14 giorni per un totale di 4 trattamenti, spruzzando direttamente il prodotto sui singoli telaini in una quantità pari a 10ml/telaino. (**Fig. 1, Fig. 2**).

Ad inizio sperimentazione e 14 giorni dopo l'ultima somministrazione si è provveduto ad effettuare una stima della forza delle famiglie mediante la stima dei sestini, valutando: compattezza della covata, quantità di covata totale, quantità di api adulte. Inoltre si è voluto valutare l'eventuale tossicità a breve e a lungo termine monitorando la mortalità delle api nella prima settimana successiva alla prima somministrazione e, nel corso di tutta la sperimentazione, la compattezza della covata e la quantità di api adulte.

I dati raccolti, poi, sono stati confrontati e analizzati applicando test statistici non parametrici per valutare gli effetti delle diverse formulazioni e dei diversi dosaggi sulla forza delle famiglie.



Fig. 2 Ricercatori dell'IZS Lazio e Toscana e dei Servizi Veterinari dell'ASL di Viterbo, in apiario per lo studio del *ProBee*®.

Risultati

Alla fine dei trattamenti effettuati nel 2012 i risultati sono stati:

- Aumento della popolosità delle api adulte del 83,43%, rispetto al controllo (**Fig. 3**);
- Aumento della covata opercolata del 106,61%, rispetto al controllo (**Fig. 4**);
- Aumento della covata non opercolata del 174,7%, rispetto al controllo (**Fig. 5**);
- Aumento delle uova del 54,22%, rispetto al controllo (**Fig. 6**).

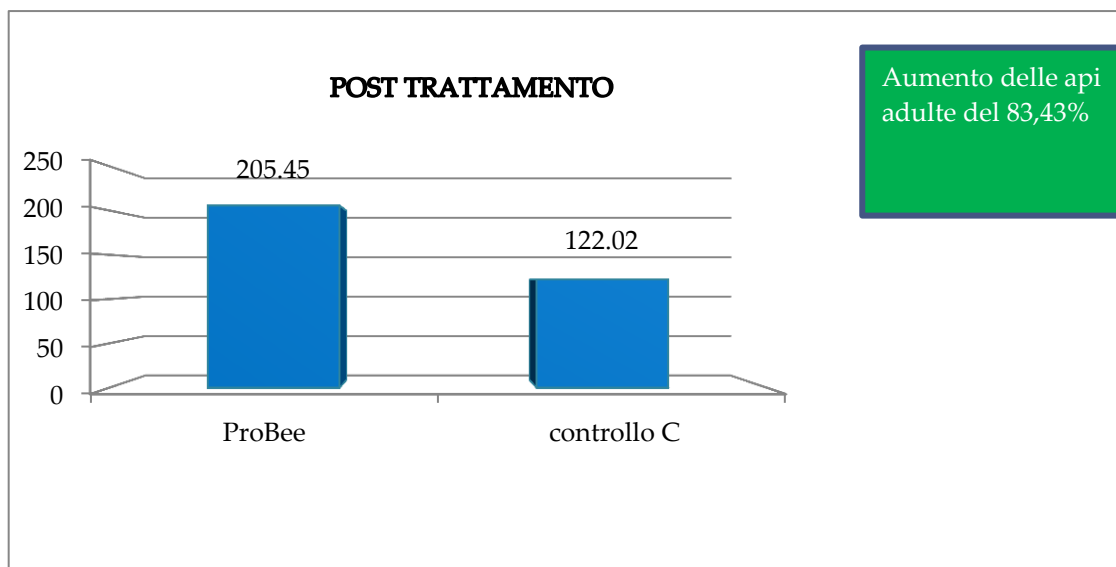


Fig. 3 Variazione percentuale della quantità di api adulte. L'aumento percentuale della quantità di api adulte nelle famiglie appartenenti al **GRUPPO ProBee®** è stato del 83,43% rispetto al **CONTROLLO**.

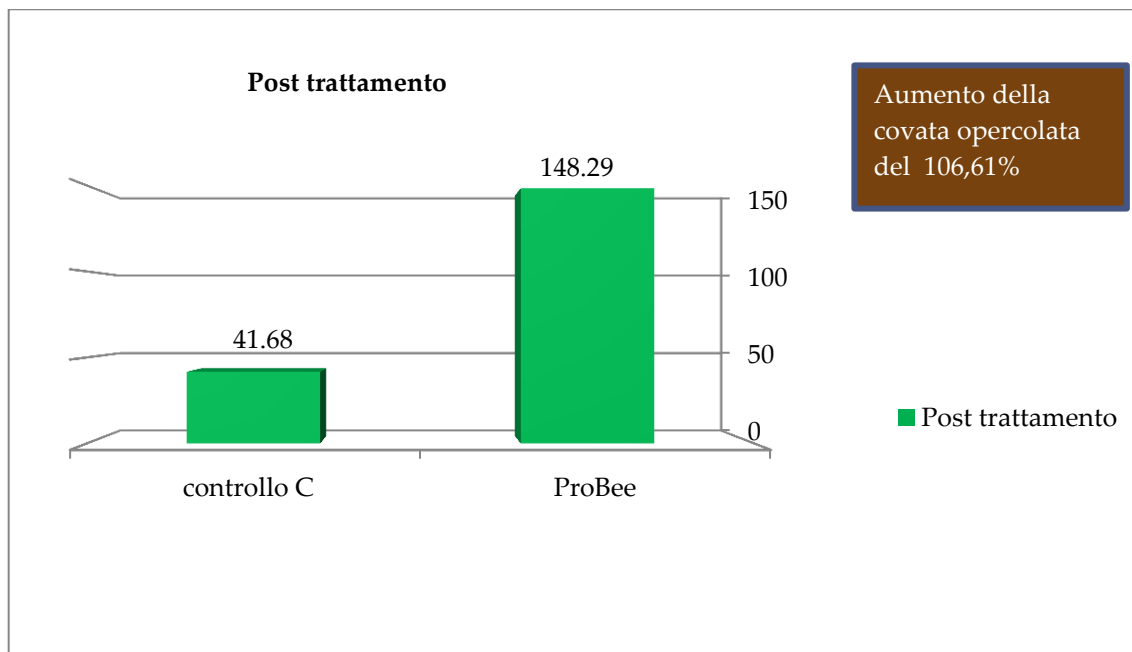


Fig. 4 Variazione percentuale della quantità di covata opercolata. L'aumento percentuale della quantità di covata opercolata nelle famiglie appartenenti al **GRUPPO ProBee®** è stato del 106.61% rispetto al **CONTROLLO**.

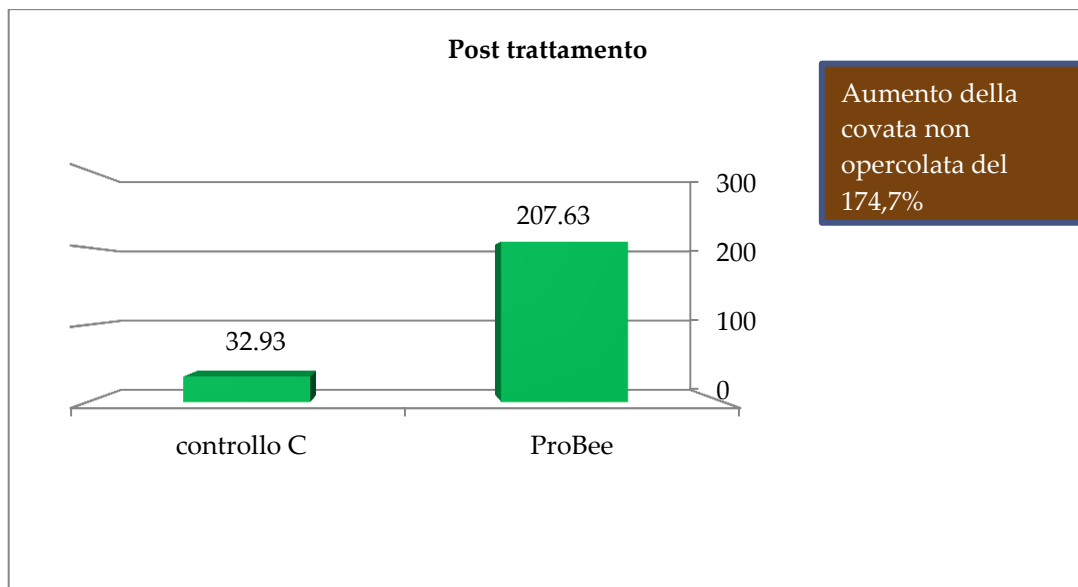


Fig. 5 Variazione percentuale della quantità di covata non opercolata. L'aumento percentuale della quantità di covata non opercolata nelle famiglie appartenenti al **GRUPPO ProBee®** è stato del 174.7% rispetto al **CONTROLLO**.

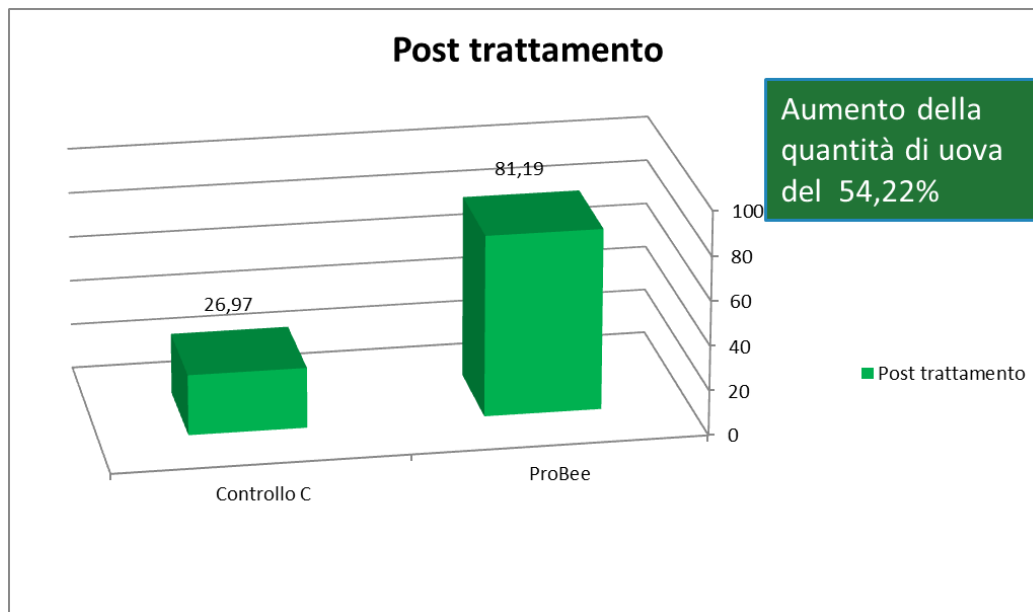


Fig. 6 Variazione percentuale della quantità di uova. L'aumento percentuale della quantità di uova nelle famiglie appartenenti al **GRUPPO ProBee®** è stato del 54,22% rispetto al **CONTROLLO**.

Pertanto possiamo riassumere la sperimentazione del 2012 con i seguenti concetti:

- *Maggiore quantità di covata ed api*: la covata si presenta molto più compatta ed estesa rispetto al controllo.
- Una famiglia forte e vitale presenta inevitabilmente meno problemi e preoccupazioni per l'apicoltore, che deve necessariamente limitare i danni dovuti a diverse patologie causa di effetti degenerativi dell'alveare stesso.

Nella sperimentazione condotta nell'estate del 2014, si è voluto valutare l'efficacia del **ProBee®** a diverse concentrazioni a partire da una forma liofilizzata ed in un periodo in cui il ciclo biologico delle api fosse già in uno sviluppo avanzato rispetto alla prima sperimentazione.



Fig. 7 Ricercatori dell'IZS Lazio e Toscana e dei Servizi Veterinari dell'ASL di Viterbo, in fase di trattamento del *ProBee*® direttamente sulla covata.

I risultati sono stati:

- Aumento nella compattezza della covata in entrambi gli apiari sperimentali (Roma e Viterbo) in percentuale maggiore nei gruppi trattati rispetto al gruppo **CONTROLLO** (incremento rispetto al controllo dall'8% al 26.74%);
- Minore decremento a fine estate nella quantità di covata e di api adulte nei gruppi trattati, a qualsiasi dosaggio, rispetto al gruppo **CONTROLLO**, in entrambi gli apiari sperimentali (**Tab. 1**);

	COVATA PRE-TRATTAMENTO	COVATA POST-TRATTAMENTO	DIFFERENZA %
PRO MIN	45.60	28.64	37.20%
PRO MAX	45.25	32.75	27.60%
PRO 10X	54.40	26.64	51.00%
CONTROLLO	54.00	26.20	51.50%

Tab. 1 Variazione percentuale della quantità di covata totale. I gruppi trattati ai dosaggi inferiori hanno avuto una diminuzione percentuale inferiore rispetto al gruppo non trattato.

- Assenza di fenomeni di tossicità a breve termine. Nella prima settimana successiva alla prima somministrazione, in tutti i dosaggi impiegati, la mortalità delle api è stata inferiore nelle gabbie under-basket rispetto alle famiglie non trattate, portandoci ad affermare che il *ProBee*® è privo di effetti di mortalità acuta a carico delle api adulte (**Grafico 1**);

Numero di api morte nelle gabbie under basket dopo la prima somministrazione

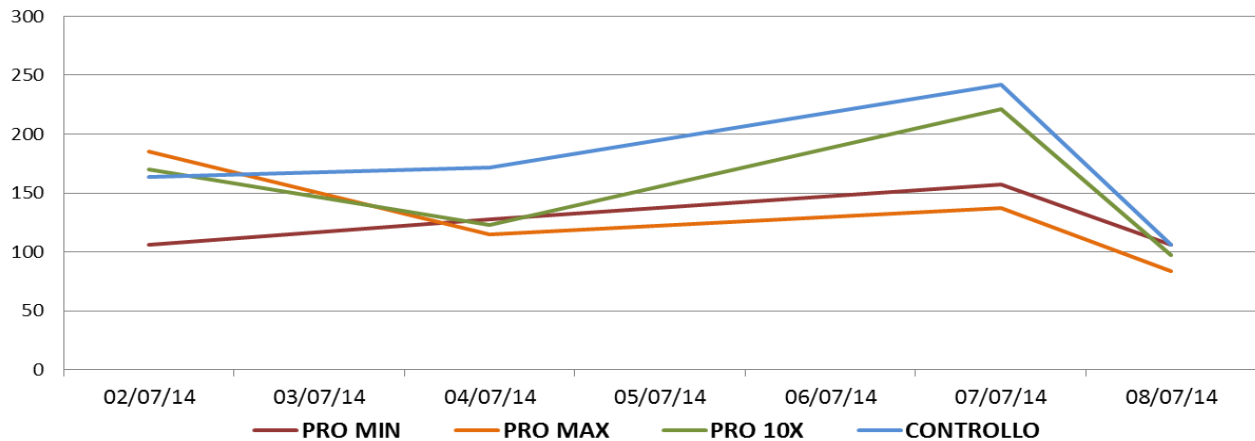


Grafico 1 Andamento della quantità di api morte stimato nella prima settimana successiva alla prima somministrazione per ciascun gruppo di trattamento. Nel corso della settimana la mortalità è risultata essere inferiore nei tre gruppi trattati rispetto al gruppo non trattato.

- Assenza di fenomeni di tossicità a lungo termine sia nei confronti della covata, sia delle api adulte. Pertanto il **ProBee®** può essere somministrato ripetutamente e in maniera prolungata senza risultare tossico nei confronti delle colonie.

Conclusioni

Il complessivo incremento di tutti i parametri valutati denota la capacità del **ProBee®** di indurre degli effetti benefici sulle famiglie, rendendole più forti e più sane.

La covata si è presentata più compatta ed estesa. Questo si traduce in una maggiore produttività delle regine, le quali sono in salute e depongono regolarmente. Inoltre dai dati si evince che anche la colonia risulta più popolosa. L'incremento nella quantità di api adulte è indice di un migliore stato di salute delle colonie stesse.

I dati della seconda sperimentazione hanno evidenziato un fattore fondamentale: il **ProBee®** non è tossico né a breve né a lungo termine. Di conseguenza può essere somministrato anche per lunghi periodi senza avere alcuna conseguenza negativa sullo stato di salute delle colonie trattate.

Una seconda importante considerazione, che si può fare sulla base dei dati sperimentali ottenuti da questa ricerca è che se i trattamenti vengono somministrati tardivamente nel ciclo biologico delle famiglie d'api, il **ProBee®** agisce rallentando la diminuzione fisiologica, che si verifica nel periodo tardo-estivo, mantenendole più popolose più a lungo, rispetto alle famiglie non trattate.

Una covata più compatta, come si è verificato anche nella seconda sperimentazione, si traduce in una famiglia più forte, in uno stato di salute migliore, considerato, che la maggior parte delle

patologie, che affliggono le colonie sono a carico della covata. Di conseguenza le famiglie sono più sane e sono dotate di una maggiore predisposizione alla sopravvivenza alle patologie ed alle condizioni avverse, che gli si prospettano.

Le famiglie trattate, in entrambe le sperimentazioni, sono quindi risultate essere più sane e più forti. Confrontando i dati e i risultati ottenuti si può affermare che il **ProBee**® agisca migliorando il benessere e la vitalità delle famiglie, andando a ripristinare gli equilibri fisiologici che inevitabilmente si alterano, anche a causa delle attività dell'uomo. Inoltre dai dati emerge, che tanto prima si iniziano i trattamenti con il **ProBee**® (subito prima della primavera), tanto prima si riscontreranno i benefici nello stato di salute e della forza delle famiglie d'api.

Pertanto possiamo riassumere i vantaggi ottenuti con l'applicazione del probiotico ProBee nel seguente modo: con l'utilizzo del probiotico **ProBee**® in apicoltura ci si propone di rendere le api sempre più forti e sane, in modo del tutto naturale, senza il pericolo di residui chimici, che possano contaminare il miele e l'ambiente. Inoltre altrettanto importante è il concetto di equilibrio biologico sostenibile, in quanto con l'utilizzo di microrganismi già esistenti in natura e nell'organismo ape si è voluto ripristinare degli equilibri, che l'uomo e le sue attività inevitabilmente hanno alterato e continuano ad alterare.