

ILVO



Flanders

is agriculture and fisheries

**Essai au champs:
impact de l'ajout d'un mélange d'acide
stéarique et palmitique (dénommé stéarine)
à la cire d'abeilles lors du développement
du couvain d'ouvrières**

Rapport final : 30 juin 2017

Dr. Wim Reybroeck

ILVO-T&V, Melle, Belgique

Introduction

En 2016, des apiculteurs ont signalé des problèmes en relation avec le mauvais développement et le dépérissement de couvain d'abeilles après l'installation de nouvelles feuilles de cire gaufrée de production industrielle. Après analyses, il s'est avéré que la cire d'abeille anormale présentait une teneur fortement accrue en acide stéarique et palmitique, ce qui indique l'ajout de stéarine. L'ajout de 20 à 30 % de stéarine n'a pas uniquement été signalé en Belgique, mais aussi en Allemagne et aux Pays-Bas. Peu de données de littérature sont disponibles sur l'impact de la stéarine sur le couvain d'abeilles. C'est pourquoi le service public fédéral Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement a demandé à l'ILVO (Melle, BE), Institut de recherche pour l'agriculture, la pêche et l'alimentation, de réaliser la présente étude.

Objectifs

Examiner si l'ajout de stéarine à la cire d'abeilles entraîne la mortalité d'une partie du couvain d'ouvrières (couvain "en mosaïque").

Si une mortalité est constatée, déterminer le niveau de mortalité en fonction de divers pourcentages de stéarine.

Matériel et méthodes

Cire d'abeilles de référence

Comme référence, on a utilisé de la cire d'abeilles en provenance du Cameroun: "Cire d'abeilles coulée sélecté", Dadant Blatt, 41 x 26,3 cm, Lot 460, Tht. 13/02/2020 (en provenance d'un producteur belge de rayons de cire) = ("Réf."). La cire présente de très faibles teneurs en pesticides (résultat d'analyse connu) et répond en termes de point de fusion, de teneurs en acides et en esters aux valeurs définies pour la cire d'abeilles pure (1).

Stéarine

La stéarine utilisée est un mélange des acides gras (prédominants) acide palmitique C16 et acide stéarique C18 (n° CAS 67701-03-5) obtenus à partir d'huile de palme brute (en provenance d'un producteur belge d'acides gras) d'une composition affichée dans le Tableau 1.

Tableau 1. Composition de la stéarine utilisée dans les essais au champs (analyse du fabricant).

Stéarine Origine : Huile de palme	Acide palmitique C16:0	Acide stéarique C18:0	Autres (C12, C14, C15, C17, C18:1, C20)	Indice d'acide	Indice de saponification (mg KOH/g)	Point de fusion
	43,5%	54,2%	2,3%	206,1	206,1	env. 56 °C

Feuilles de cire gaufrée coulée avec stéarine ajoutée

La cire d'abeilles de référence a été refondue dans un gobelet en Pyrex afin de fabriquer avec celle-ci, en laboratoire, de nouvelles feuilles de cire gaufrée ('A') dans un gaufrier de type "Normal 350 x 200" (Graze, Weinstadt, DE) refroidi par eau. Les feuilles de cire gaufrée coulées ('A') sont de même composition que les feuilles de cire gaufrée achetées.

(1) Telles que fixées dans le règlement (UE) n° 231/2012 établissant les spécifications des additifs alimentaires énumérés aux annexes II et III du règlement (CE) no 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil (indice d'acide et indice de saponification), et conformément à la littérature pertinente.

À cette cire, on a ajouté de la stéarine en concentrations massiques croissantes, à savoir 15, 20, 25, 30, 35 et 40%. À partir des différentes compositions de cire, on a chaque fois coulé des feuilles de cire gaufrée de la même manière que pour (A). Les feuilles de cire gaufrée coulée obtenues sont à 15% ('B'), 20% ('C'), 25% ('D'), 30% ('E'), 35% ('F') et 40% de stéarine ('G').

Les échantillons ('A'), ('B'), ('D') et ('F') de cire d'abeilles mélangée à la stéarine ont été analysés dans un laboratoire spécialisé en analyse de cire d'abeilles Ceralyse (Celle, DE) quant à leur indice d'acide, leur indice d'ester, leur indice de saponification et leur teneur en hydrocarbures (voir ci-dessous "Résultats et commentaire"). Ceralyse a en outre réalisé sur ces échantillons une analyse chromatographique gazeuse (voir ci-dessous "Résultats et commentaire").

Échantillon de feuille de cire gaufrée examiné en parallèle

('H'): Rayon de cire de fabrication industrielle d'un producteur de rayons de cire. Le résultat de l'échantillon H n'est pas repris dans ce rapport.

Colonies d'abeilles et emplacement du rucher

Le rucher est situé Brusselsesteenweg 370 à Melle. On a utilisé 4 ruches de type Dadant Blatt, peuplées d'abeilles mellifères européennes (*Apis mellifera*). Deux reines (*Carnica* Troiseck) ont été élevées par Jacques Levrau et fécondées à Kreverhille en 2016, une reine (F1 - *Carnica* Troiseck) a été élevée par André Decaluwe et fécondée sur place en 2016 tandis que la dernière est une jeune reine (2017), fille d'une reine de Willy Geirnaert et fécondée sur place à Melle.

Configuration d'essai

On a utilisé des feuilles de cire gaufrée achetées en cire d'abeilles de qualité ("Réf."). Celles-ci ont été taillées au format de cadres de hausse de type Dadant Blatt, dimensions intérieures 13x41 cm. Dans ces feuilles de cire gaufrée, on a pratiqué quatre ouvertures de 8x8 cm (= 64 cm²) dans lesquelles est insérée une portion de cire gaufrée coulée à tester (Figure 1). La feuille de cire percée d'ouvertures et les portions de cire gaufrée coulée sont maintenues en place par un réseau de fils positionné au bon endroit et noyé dans la cire. Sur chaque cadre de test, on a toujours placé une portion de cire coulée de référence en guise de contrôle interne.



Figure 1. Représentation à l'échelle d'un cadre de hausse Dadant Blatt comprenant 4 portions de cire gaufrée à tester (1 feuille de cire gaufrée de référence et 3 situations différentes).

Chaque cadre de test a été glissé séparément au sein d'une colonie d'abeilles dans la hausse afin de permettre aux ouvrières de construire le rayon de cire. Après 2 à 3 jours, la reine a été repérée dans la colonie d'abeilles en question et emprisonnée dans le cadre de test contenant le rayon de cire construit en posant des deux côtés un petit cadre muni d'une grille à reine plate (= cadre d'arrêt). Le cadre d'arrêt a été placé au milieu de la hausse. De cette façon, la reine ne peut pondre ses œufs que sur le petit cadre en question. Au bout de 2 jours, la reine a été retirée du cadre et libérée dans la zone de couvain sous une grille à reine de façon à empêcher toute interférence résultant d'un nouveau dépôt d'œufs dans les alvéoles par la reine ultérieurement. Chaque fois, le cadre de test garni a été contrôlé quant à la présence d'un œuf dans chaque alvéole et pris en photo. Après ces contrôles, le cadre de test a été replacé dans la colonie pour la suite du développement du couvain d'ouvrières, qui lui aussi a fait l'objet d'un suivi. Le dernier contrôle (avec clichés) a eu lieu chaque fois au moment où toutes les larves étaient en phase de chrysalide et le couvain scellé. Lors de cette phase, on distingue très bien les alvéoles ouvertes, dans lesquelles l'œuf/la larve a dépéri et les alvéoles fermées contenant une chrysalide encore en vie. Les clichés détaillés de chaque situation ont été imprimés à cet effet et les alvéoles ouvertes et fermées ont été comptées manuellement. On peut ainsi calculer le taux de survie. Un rayon de cire se construisant des deux côtés de la feuille de cire gaufrée (paroi intérieure), on obtient pour chaque cadre de test des résultats à la fois pour le côté gauche et pour le côté droit, soit des résultats pour environ 210 alvéoles sur chaque côté.

Cette façon de procéder permet d'exclure autant que possible les facteurs d'influence externes (reine, nourriture, ...) sur la survie du couvain. Il se peut que la position dans le cadre même ait une influence : c'est pourquoi les positions des portions de cire gaufrée au sein du rayon ont été modifiées lors de la répétition du test: chaque situation a au minimum été testée deux fois. En outre, la situation parallèle dans une deuxième ruche (autre reine) a été testée. De plus, ici, les portions de cire gaufrée sont permutés : position 1 sur position 3; position 2 sur position 4; position 3 sur position 1; position 4 sur position 2.

Les essais ont été réalisés au cours de la période du 27 avril au 20 juin sous des conditions climatologiques diverses. Lors des premiers tests, il faisait très froid avec une faible miellée, au cours de la deuxième période, très chaud avec une abondante miellée d'acacia (*Robinia*), tandis qu'au début de la troisième période les températures et la miellée étaient normales et vers la fin, il faisait de nouveau très chaud avec une forte miellée (*Castanea*).

Malgré cela, dans tous les cas, presque chaque alvéole de tous les cadres de test contenait un œuf ; par la suite, on a constaté dans quelques cas, que les œufs des alvéoles situées près du bord du cadre n'avaient plus été soignés pendant la période de temps froid sur le cadre de test 1 dans la colonie 4 (la plus fragile). Sur ce cadre de test, pour les positions 1 et 4, seule la moitié des alvéoles, situées vers le centre, ont été incluses dans le comptage (surlignage bleu dans le Tableau 2).

Par ailleurs, pendant la période chaude, on a constaté que les alvéoles contenant des œufs étaient rapidement remplies de nectar et de miel à moitié mûr dans les colonies fortes. Les comptages des positions concernées ont été annulés (surlignage jaune dans le Tableau 2). Un fait remarquable est que cela ne s'est jamais produit aux positions 2 et 3, sauf dans le cas du cadre de test 4 qui a été annulé dans son entièreté. On a également constaté que ce phénomène se produisait moins rapidement dans le cas de la cire de référence ("A").

Le Tableau 2 donne une vue d'ensemble des différents cadres de test et feuilles de cire gaufrée testées.

Tableau 2. Vue d'ensemble des divers cadres de test, de la position des feuilles de cire gaufrée testées et de la date à laquelle la reine a été mise à l'arrêt.

Cadre de test	Côté	Feuille de cire gaufrée				Date de début
		Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	
1	gauche	A	B	C	D	30/04/2017
	droit	D	C	B	A	
2	gauche	A	E	F	G	30/04/2017
	droit	G	F	E	A	
3	gauche	A	H	D	H	30/04/2017
	droit	H	D	H	A	
1bis	gauche	C	D	A	B	25/05/2017
	droit	B	A	D	C	
2bis	gauche	F	G	A	E	25/05/2017
	droit	E	A	G	F	
5	gauche	C	D	A	B	05/06/2017
	droit	B	A	D	C	

Légende :

Bleu : résultats basés sur le comptage de la moitié (partie orientée vers le centre) de la portion de cire d'abeilles insérée en raison de soins incomplets du couvain (temps froid) ;

Jaune : résultats annulés en raison de la présence de nectar/miel à moitié mûr.

Résultats et commentaire

- a) Résultats des analyses d'échantillons de cire de référence et de cire mélangée à de la stéarine (Ceralyse, Celle, DE)

Les résultats de l'analyse chez Ceralyse en matière d'indice d'acide, d'indice d'ester, d'indice de saponification et de teneur en hydrocarbures dans les cas des échantillons ('A'), ('B'), ('D') et ('F') sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Résultats des analyses chez Ceralyse

	Indice d'acide	Indice d'ester	Indice de saponification (mg KOH/g)	Total d'hydrocarbures	Stéarine ajoutée
Valeurs normales ⁽¹⁾	17-24	70-80	87-104	13-13,5 % (origine africaine)	---
Échant. ('A')	18,8	75,4	94,2	13,9 %	0 % (100 % Réf) = (A)
Échant. ('B')	47,3	65,0	112,3	11,5 %	15 % (85 % Réf)
Échant. ('D')	65,7	57,3	123,0	10,4 %	25 % (75 % Réf)
Échant. ('F')	84,7	49,8	134,5	8,8 %	35 % (65 % Réf)

Les résultats révèlent que l'ajout de stéarine entraîne une augmentation de l'indice d'acide et de l'indice de saponification. En revanche, l'indice d'ester et le pourcentage d'hydrocarbures diminuent.

Au niveau des résultats, Ceralyse observe que la teneur en hydrocarbures est un peu plus élevée que la normale pour la cire d'abeilles d'origine camerounaise ('A'). Cela peut être dû à l'ajout d'une très petite quantité d'hydrocarbures (comme de la paraffine) ou au fait que la cire est constituée pour une grande part de rayons anciens qui peuvent provoquer une légère augmentation de cette concentration. La littérature révèle que ce genre d'écart mineur n'a aucune incidence sur le développement du couvain.

Ceralyse a aussi réalisé une analyse chromatographique gazeuse. Sur les chromatogrammes, les pics d'acide palmitique et d'acide stéarique sont clairement présents au niveau des échantillons ('B'), ('D') et ('F'). Les chromatogrammes de la cire de référence ('A') et de l'échantillon de cire ('D') sont affichés en annexe 1.

b) Résultats de mortalité du couvain

Toutes les feuilles de cire gaufrée présentées ont été bien recouvertes de rayons par les abeilles et ensuite entièrement pourvues d'œufs par les reines. Le dépérissement du couvain est survenu au début du stade larvaire. Les comptages ont eu lieu au moment où tout le couvain survivant s'est transformé en chrysalide (alvéoles fermées), ce qui facilite le comptage. Les résultats des comptages sont affichés dans le Tableau 4. Aucun dépérissement n'a été constaté lors du stade nymphal: toutes les chrysalides se sont transformées en imagos (abeilles adultes).

Tableau 4. Résultats de survie du couvain d'ouvrières dans la cire d'abeilles de composition diverses.

Cadre	Côté	Situation	Survie (%)	Survie moyenne (%)	Survie par rapport à la réf. (%)	Survie moyenne par rapport à la réf. (%)	Code
1	G	A	66,3	67,5	100	100,0	Réf. Cameroun
	D		68,8		100		
	G	B	29,8	34,5	45,0	51,0	15% stéarine
	D		39,2		57,0		
	G	C	29,8	31,7	45,0	46,9	20% stéarine
	D		33,5		48,7		
	G	D	32,7	27,8	49,3	41,3	25% stéarine
	D		22,9		33,3		
2	G	A	85,9	88,8	100,0	100,0	Réf. Cameroun
	D		91,7		100,0		
	G	E	40,5	35,7	47,2	40,4	30% stéarine
	D		30,9		33,7		
	G	F	26,9	29,3	31,3	33,0	35% stéarine
	D		31,7		34,6		
	G	G	35,8	30,4	41,6	34,4	40% stéarine
	D		25,0		27,3		

Cadre	Côté	Situation	Survie (%)	Survie moyenne (%)	Survie par rapport à la réf. (%)	Survie moyenne par rapport à la réf. (%)	Code
3	G	A	90,9	89,6	100,0	100,0	Réf. Cameroun
	D		88,2		100,0		
	G	H					Cire commerciale
	D						
	G	D	47,1	49,5	51,8	55,3	25% stéarine
	D		51,9		58,9		
	G	H					Cire commerciale
	D						
1bis	G	D	25,6	18,7	32,2	26,3	25% stéarine
	D		11,7		20,4		
	G	A	79,7	68,5	100,0	100,0	Réf. Cameroun
	D		57,4		100,0		
2bis	G	F	24,1	22,0	27,3	25,1	35% stéarine
	D		19,9		22,9		
	G	G	33,6	33,1	38,0	37,8	40% stéarine
	D		32,6		37,5		
	G	A	88,4	87,6	100,0	100,0	Réf. Cameroun
	D		86,8		100,0		
	G	E	33,0	31,8	37,3	36,2	30% stéarine
	D		30,5		35,1		
5	G	D	38,8	42,5	46,0	48,9	25% stéarine
	D		46,1		51,8		
	G	A	84,3	86,7	100,0	100,0	Réf. Cameroun
	D		89,0		100,0		

Les résultats des répétitions par situation sont résumés dans le Tableau 5. La survie a également été calculée par rapport à la survie obtenue dans le cas de la cire de référence du même côté du cadre de test. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Commentaire

Sur tous les cadres de test, la survie du couvain d'ouvrières était inférieure pour la cire à stéarine ajoutée à la survie dans le cas de la cire de référence, et cela indépendamment de la météo, de la miellée, de la reine ou de la colonie d'abeilles. Dans la majorité des cas, le dépérissement du couvain d'ouvrières était très limité pour la cire de référence. Parfois, cependant, un dépérissement du couvain a été constaté dans les alvéoles où passait le fil de cadre.

L'ajout de 15% de stéarine à la cire d'abeilles entraîne une mortalité significative du couvain d'ouvrières dans les alvéoles construites sur les feuilles de cire gaufrée de cette composition. Des ajouts supérieurs (jusqu'à 40%) font augmenter la mortalité. Par rapport à la mortalité du couvain d'ouvrières avec la cire de référence, la mortalité moyenne pour la cire avec ajout de stéarine est de minimum 49,0% (pour 15 % de stéarine). La mortalité moyenne la plus élevée est de 71,0% (pour 35% de stéarine).

Tableau 5. Résumé des résultats de survie du couvain d'ouvrières dans la cire d'abeilles de composition diverses (par situation).

Survie (%) par type de cire							
A	B	C	D	E	F	G	H
66,3	29,8	29,8	32,7	40,5	26,9	35,8	
68,8	39,2	33,5	22,9	30,9	31,7	25,0	
85,9			47,1	33,0	24,1	33,6	
91,7			51,9	30,5	19,9	32,6	
90,9			25,6				
88,2			11,7				
79,7			38,8				
57,4			46,1				
88,4							
86,8							
84,3							
89,0							
Survie moyenne (%) par type de cire							
81,5	34,5	31,7	34,6	33,7	25,7	31,7	

Tableau 6. Résumé des résultats de survie du couvain d'ouvrières dans la cire d'abeilles de composition diverses (par situation) par rapport à la survie dans le cas de cire de référence

Survie (%) par rapport à la survie dans le cas de la cire de référence, par type de cire							
A	B	C	D	E	F	G	H
100,0	45,0	45,0	49,3	47,2	31,3	41,6	
100,0	57,0	48,7	33,3	33,7	34,6	27,3	
100,0			51,8	37,3	27,3	38,0	
100,0			58,9	35,1	22,9	37,5	
100,0			32,2				
100,0			20,4				
100,0			46,0				
100,0			51,8				
100,0							
100,0							
100,0							
100,0							
Survie moyenne (%) par rapport à la survie dans le cas de la cire de référence, par type de cire							
100,0	51,0	46,9	43,0	38,3	29,0	36,1	

Conclusion

Les résultats montrent que la cire d'abeilles contenant de la stéarine ajoutée (dans les pourcentages testés à partir de 15%) ne convient pas à un usage pour la fabrication de feuilles de cire gaufrée pour l'apiculture.

Remarques au sujet des résultats

L'attention est attirée sur le fait que l'essai a été réalisé avec une cire de référence très pure et dans des colonies d'abeilles en bonne santé. Dans de nombreux cas pratiques, la cire d'abeilles contient en outre un certain pourcentage d'hydrocarbures ajoutés (comme la paraffine) et une concentration plus élevée de résidus de pesticides qui pourraient avoir une incidence négative supplémentaire (chacune se renforçant) sur le développement du couvain.

D'autres types de stéarine (par exemple d'une autre origine et avec une autre proportion d'acide palmitique/acide stéarique) peuvent donner un résultat différent.

L'étude ne donne qu'une image de l'effet de la stéarine sur un laps de temps très bref de cycles de vie d'une population d'abeilles. Des pertes de couvain élevées limitent gravement les chances de survie d'une colonie d'abeilles.

Annexe 1. Chromatogrammes

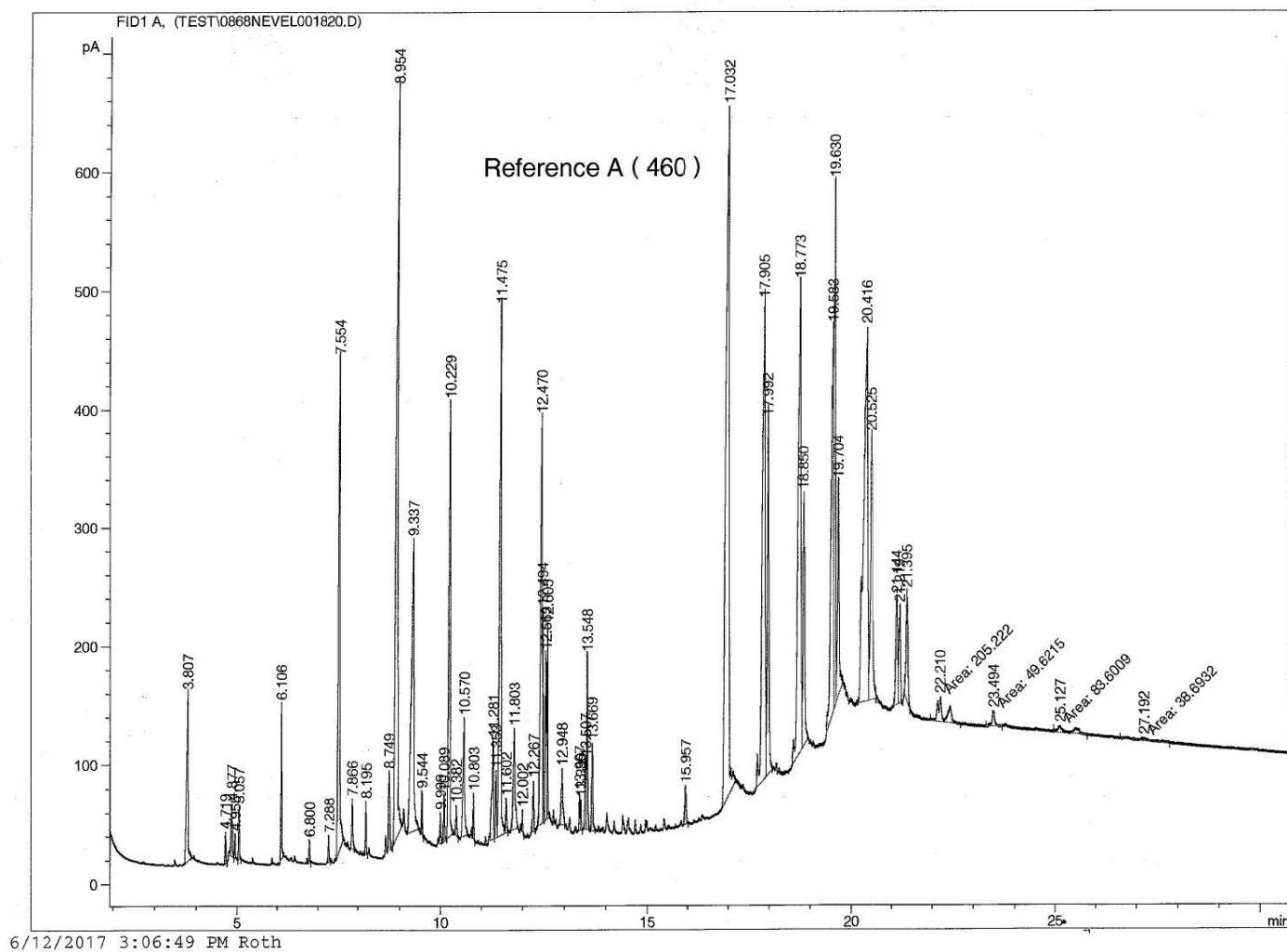


Fig. 2. Chromatogramme de la cire de référence ('A').

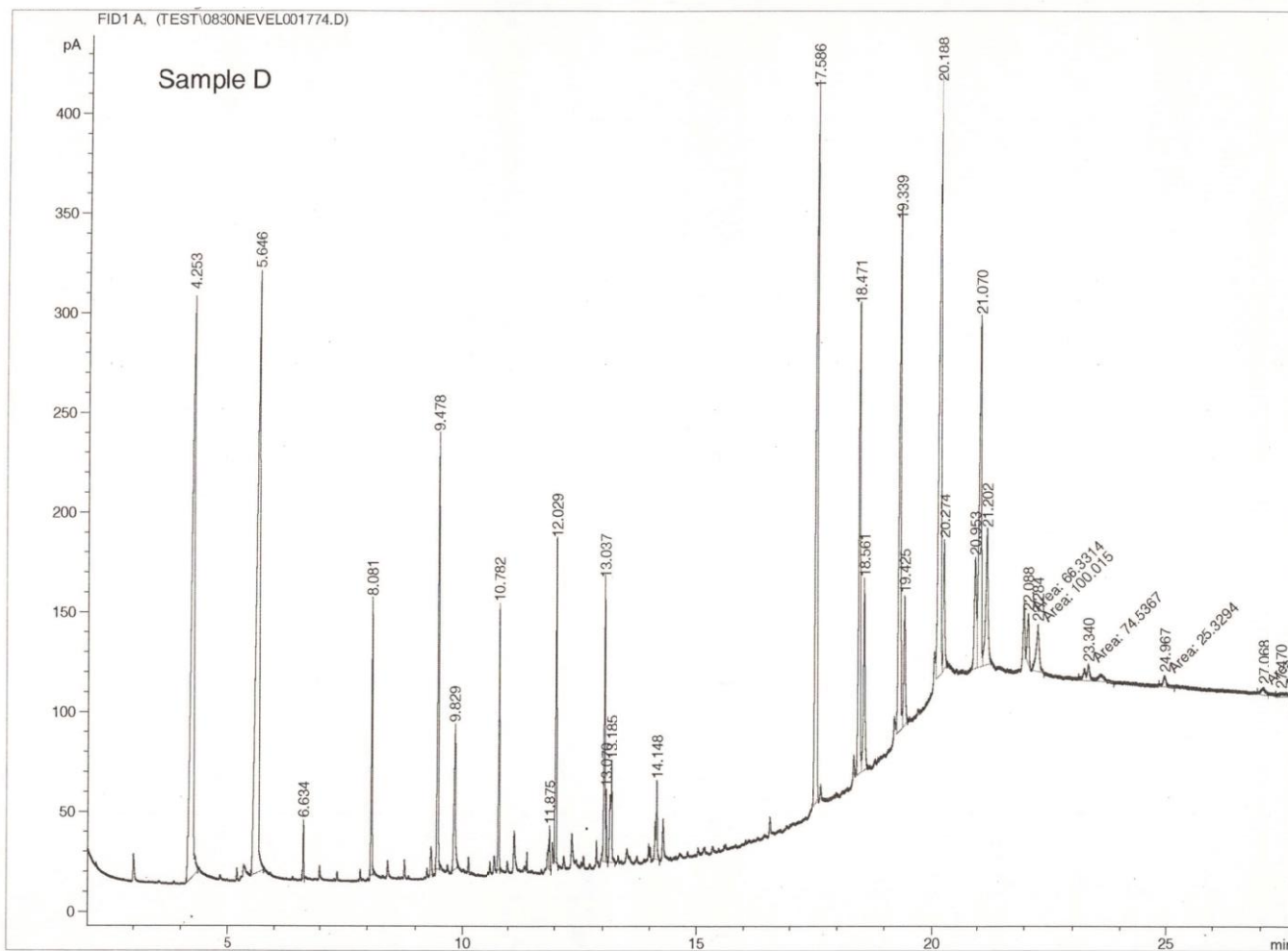
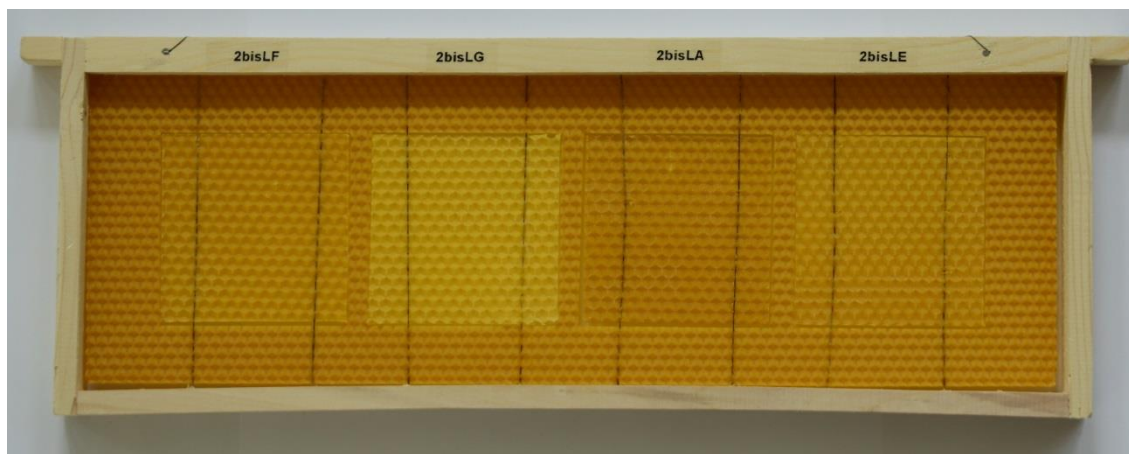
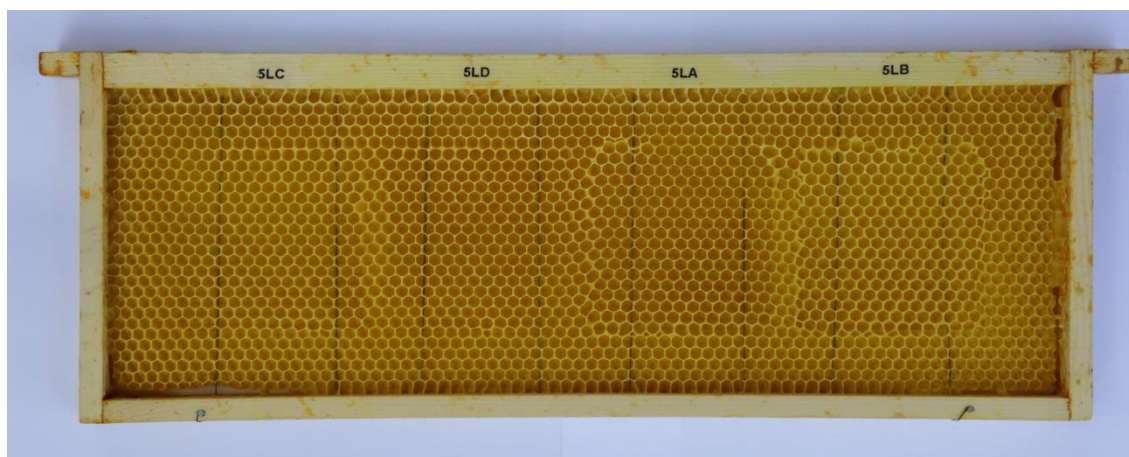


Fig. 3. Chromatogramme de l'échantillon de cire 'D' (contenant 25% stéarine). Les deux premiers grands pics sont respectivement l'acide palmitique et l'acide stéarique.

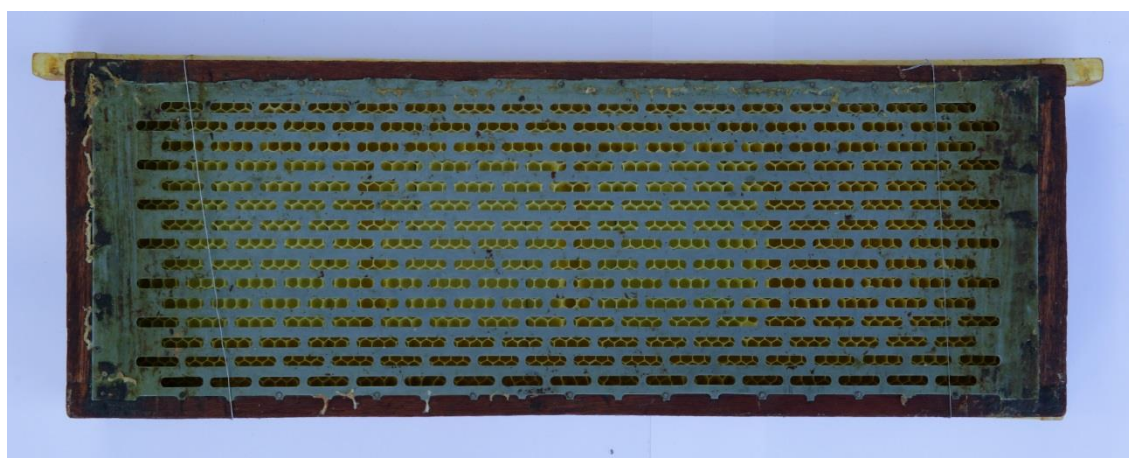
Annexe 2. Clichés



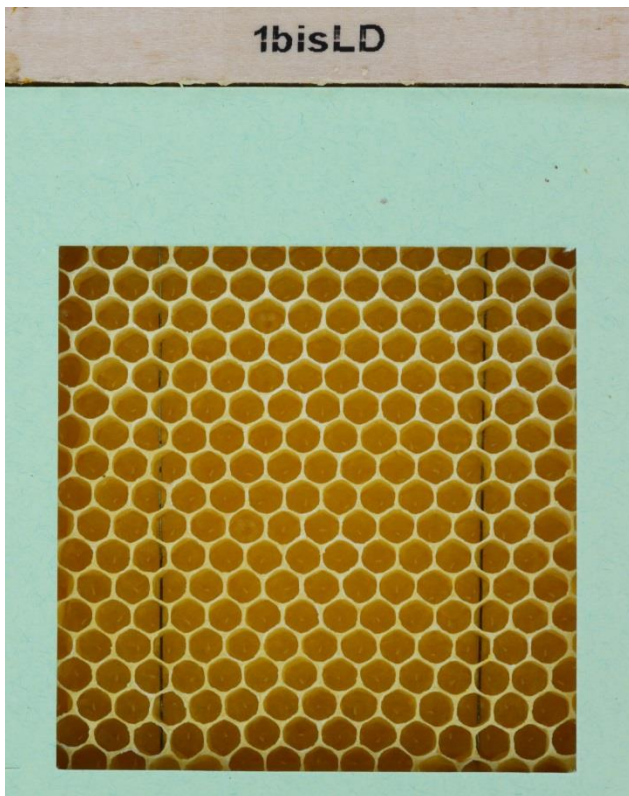
Cliché 1: Phase initiale cadre de test 2bis, côté gauche



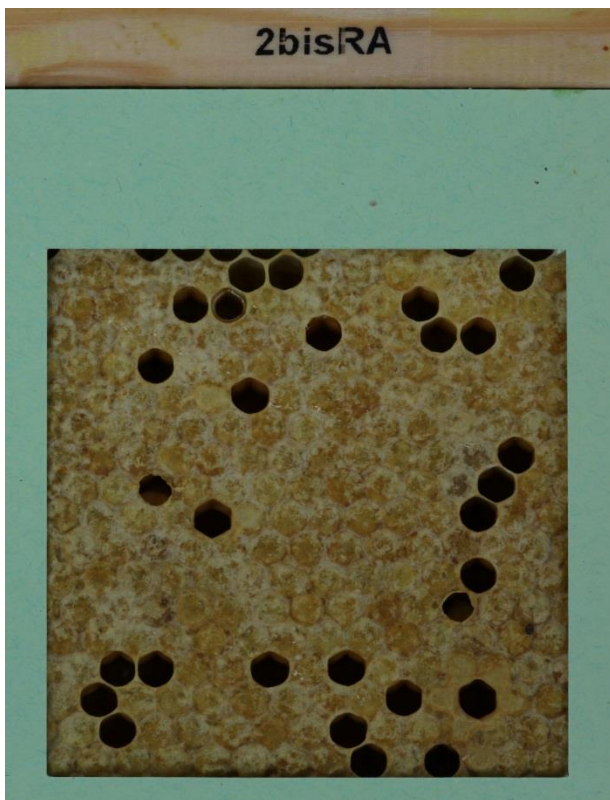
Cliché 2: Cadre de test 5 à moitié construit, côté gauche



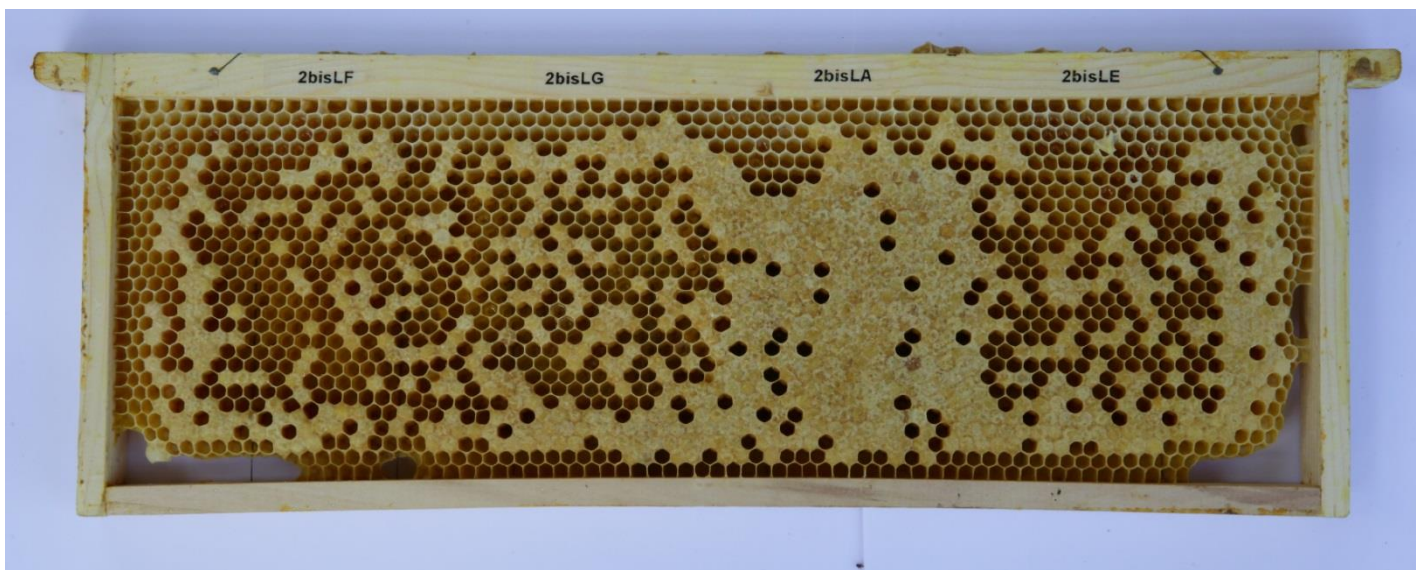
Cliché 3: Petits cadres avec grille à reine autour du cadre de test (= cadre d'arrêt).



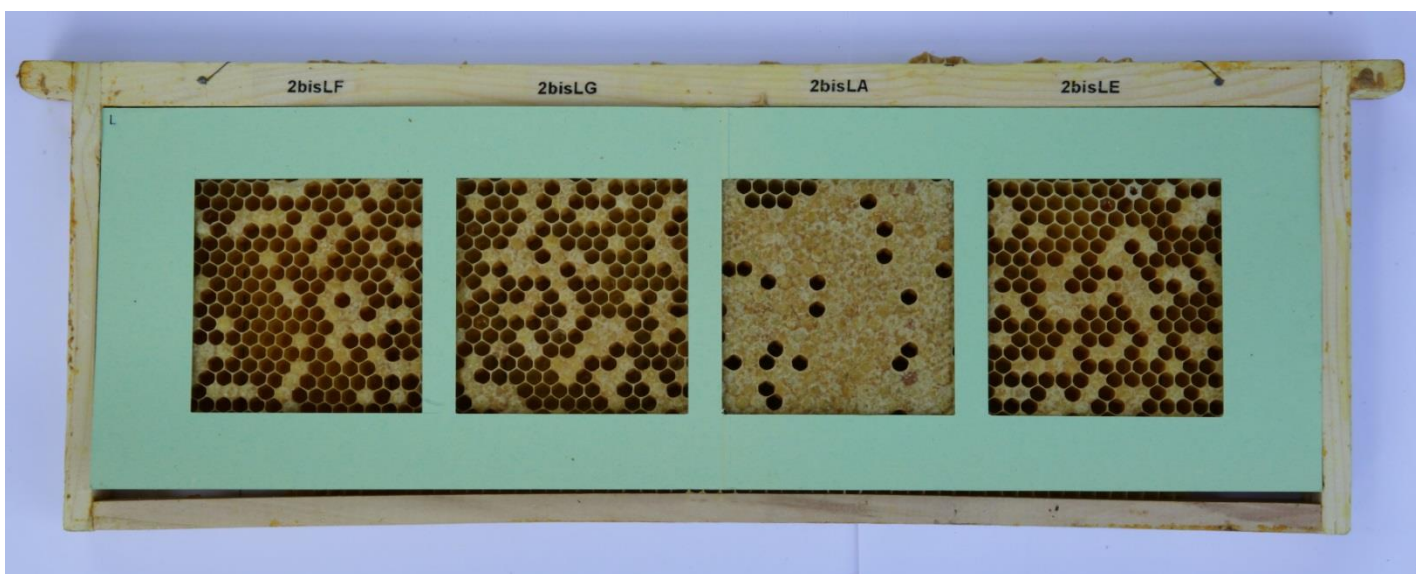
Cliché 4. Détail du rayon de cire ('D') sur le cadre de test 1bis, gauche, entièrement rempli d'œufs.



Cliché 5. Détail en phase finale pour le rayon de cire ('A') (référence) sur le cadre de test 2bis, côté droit comme celui utilisé pour le comptage des alvéoles ouvertes et fermées.



Cliché 6. Phase finale cadre de test 2bis, côté gauche.



Cliché 7. Phase finale cadre de test 2bis, côté gauche, avec pochoir.