

**DÉTERMINATION DE LA DOSE NARCOTIQUE
DE GAZ CARBONIQUE (CO₂)
EN FONCTION DE L'ÂGE CHEZ L'OUVRIÈRE D'ABEILLE
(*APIS MELLIFICA* L.¹)**

*Bestimmung der altersbedingten CO₂ - Dosis bei
der Narkose der Arbeiterinnen von Apis mellifica L.*

A. DEYME et G.I. BEGUE-DEYME

*Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, I.N.R.A.,
91440 Bures-sur-Yvette*

SUMMARY

**DETERMINATION OF THE NARCOTIC DOSE OF CARBON DIOXIDE (CO₂)
ACCORDING TO THE AGE OF THE WORKER HONEY BEE (*Apis mellifica* L.)**

1. Groups of 50 worker honey bees 2, 4, 6 and 8 days old are treated during 90 minutes with mixtures of carbon dioxide and air.

2. In the mixture the concentration of carbon dioxide (per volume) increases 5 % by 5 % in a range which goes from 25 % to 75 %.

3. The temperature inside the experimental cages is 30 °C, the delivery of air-carbon dioxide mixture is 100 liters an hour and the pressure one bar. The experiments are made in natural light, to which a 75 watts bulb is added.

4. With a 30 % concentration of carbon dioxide no honey bee is anesthetized whatever its age. With a 40 % concentration of carbon dioxide the whole population of 2 days old honey bees is anesthetized after a 80 min mixture injection. Two days old honey bees are the most sensitive to carbon dioxide mixture.

5. More the carbon dioxide concentration is high, more the anesthesia of the whole honey bee population occurs fastly.

1. Cette étude a fait l'objet d'un contrat D.G.R.S.T. n° 75 7 0879.

RÉSUMÉ

1. Des groupes de cinquante ouvrières d'abeilles âgées de 2, 4, 6, 8 jours sont soumises pendant 90 minutes à des mélanges air-gaz carbonique.

2. La concentration du gaz carbonique (en volume) dans le mélange varie de 5 % en 5 % à partir de 25 % jusqu'à 75 %.

3. La température à l'intérieur des cagettes expérimentales est de 30 °C, le débit du mélange gazeux de 100 litres/heure, la pression de 1 bar. Les expériences sont effectuées à la lumière du jour augmentée par l'éclairage d'une ampoule de 75 watts.

4. A 30 % de gaz carbonique, aucune abeille, quelque soit son âge, n'est anesthésiée.

A 40 % de gaz carbonique toute la population d'abeilles âgées de 2 jours est anesthésiée après 80 minutes d'injection du mélange.

Les abeilles âgées de 2 jours sont les plus sensibles au gaz carbonique.

5. Plus la concentration en gaz carbonique est forte, plus l'anesthésie de toute la population est rapide.

INTRODUCTION

Le dioxyde de carbone (CO₂) est couramment utilisé dans les laboratoires pour anesthésier les insectes. Bien souvent les expérimentateurs constatent des effets inattendus qui sont d'ordre physiologique : régurgitation, extension de la glosse, paralysie des appendices, défécation; et d'ordre comportemental : perturbation des relations sociales.

Lorsque l'on passe en revue la bibliographie sur ce sujet, on constate d'une part la relative abondance des données, d'autre part la diversité des résultats suivant les auteurs et le manque de précision concernant les conditions expérimentales et le mode opératoire.

CHAUVIN (1968) attire l'attention sur la résistance particulière des abeilles à l'anesthésie par le gaz carbonique : « Les mouvements de l'abeille ne cessent que dans le gaz carbonique quasi pur et reprennent très rapidement dans l'air. »

VUILLAUME et GALICHET (1950) étudient le rythme respiratoire de l'abeille soumise à différentes concentrations de gaz carbonique. Pour une concentration supérieure à 5 % l'amplitude du mouvement abdominal est augmentée. La fréquence des mouvements devient irrégulière au-delà de 15 %. A 60 % les abeilles sont encore capables de respirer mais à 80 % le mouvement respiratoire cesse rapidement.

Le gaz carbonique est un facteur toujours présent au sein de la colonie d'abeilles.

BÜDEL (1948) a trouvé un taux habituel de 0,5 % près du couvain.

WALLA (1948) a mesuré l'accroissement du gaz carbonique à l'intérieur de deux colonies : une colonie témoin ouverte et une colonie expérimentale fermée hermétiquement. Dans la colonie témoin le taux de gaz carbonique n'a pas dépassé 0,2 %, tandis que dans la colonie expérimentale le taux atteint 9,4 %.

LE BICOT (1953) a mesuré la variation de la teneur en gaz carbonique de la grappe en hiver. Elle varie de 1,18 % à 3 %.

HAZELHOFF (1954) a trouvé une teneur moyenne de la grappe en été de 0,7 %.

D'après SIMPSON (1954) les abeilles sont immobiles à partir de concentrations en gaz carbonique supérieures à 40-45 %. Pour KLOPPER, QUIST (1955) les abeilles sont capables de se mouvoir dans une atmosphère de 25 et 50 % de gaz carbonique. A 100 %, elles sont anesthésiées.

LACHER (1967) a conditionné des ouvrières d'abeilles au gaz carbonique. De fortes concentrations, même 100 %, n'ont pas d'effets répulsifs. Les abeilles peuvent discriminer différentes doses de gaz carbonique : 1 à 3 %, 7 et 10 %, 10 et 15 %, 35 et 50 %.

PATTON, EDWARDS, GILMORE (1968) ont déterminé chez *Acheta domesticus*, les doses narcotiques de gaz carbonique. L'anesthésie des insectes nécessite une tension de gaz supérieure à 20 %. Au-delà de 40 % des effets secondaires peuvent apparaître.

SEELEY (1974) a étudié la régulation de la concentration en gaz carbonique dans les colonies d'abeilles. Selon cet auteur le taux de gaz carbonique des colonies dans des conditions naturelles est de 0,7 % pour les petites ruches (environ 1 000 individus) et de 0,44 % pour les grandes.

Le présent travail se propose de déterminer la résistance des ouvrières d'abeilles à différentes doses de gaz carbonique (CO₂) en fonction de leur âge.

I. — MATÉRIEL UTILISÉ

a) Mélangeur de gaz

Nous avons utilisé un mélangeur de gaz de type « LEMGAZ » construit par la société Oxydrique Française. Le modèle permet de réaliser des mélanges air-gaz carbonique dans des proportions variables avec une précision de 1 %. La reproductivité du mélange est de $\pm 0,5$ %. Les modules de détente sont équipés de deux tubes débit-mètres gradués en normaux litres par heure (NL/h). En fonction des débits désirés, l'échelle de graduations des tubes varie de 0,2 à 2 NL/h (plus petite échelle), de 200 à 2 000 NL/h (plus grande échelle). Toutes les graduations intermédiaires dans une proportion d'échelle de 1 à 10 sont possibles et ont été utilisées.

b) Matériel biologique

Nous avons utilisé des abeilles de race italienne d'âge connu, l'âge varie de 2 à 8 jours de la manière suivante : 2 j., 4 j., 6 j., 8 j.

Les abeilles sont groupées par cinquantaine dans des cagettes standardisées. Le volume des cagettes est de 0,5 litre environ.

Chaque cagette contient un abreuvoir, une mangeoire avec du candi, un nourrisseur rempli de pollen frais. Nous avons fait varier les concentrations de gaz carbonique (en volume) de 5 % en 5 % à partir de 25 % jusqu'à 45 %. Pour les abeilles âgées de 4 jours, nous avons augmenté la concentration jusqu'à 75 % de gaz carbonique.

II. — MÉTHODE

a) *Protocole expérimental*

A chaque essai deux cagettes de 50 abeilles sont traitées. Les abeilles sont soumises aux mélanges gazeux pendant 90 minutes.

Toutes les cinq minutes nous comptons le nombre d'abeilles anesthésiées dans les cagettes.

b) *Conditions expérimentales*

- la température à l'intérieur des cagettes expérimentales est de 30 °C,
- le débit du mélange gazeux de 100 litres/heure, la pression de 1 bar,
- les expériences s'effectuent à la lumière du jour augmentée par l'éclairage d'une ampoule de 75 watts située à 70 centimètres au-dessus des cagettes.

c) *Critère d'anesthésie*

Les abeilles anesthésiées présentent les caractères suivants :

- elles sont couchées sur le dos ou sur le flanc sur le sol des cagettes,
- elles sont immobiles
 - + pas de mouvement des pattes ni des antennes
 - + le mouvement respiratoire abdominal est très réduit; la fréquence est basse et l'amplitude faible,
- très souvent la glosse est légèrement étirée et les mandibules écartées.

d) *La récupération après l'anesthésie*

Dans les cagettes où les abeilles furent anesthésiées nous avons injecté de l'air pur et noté pendant 15 minutes le nombre d'abeilles réveillées.

III. — RÉSULTATS

a) *Les doses narcotiques de gaz carbonique (CO₂)*

Sur les figures 1, 2, 3, 4, nous avons représenté en abscisses les pourcentages de gaz carbonique dans les mélanges et en ordonnées le nombre d'abeilles anesthésiées.

La largeur des histogrammes est proportionnelle au temps nécessaire pour anesthésier toute la population d'abeilles.

Par exemple : pour les abeilles de 2 jours (fig. 1) :

+ à 35 % de gaz carbonique, il faut 90 minutes pour anesthésier 32 % de la population d'abeilles (a).

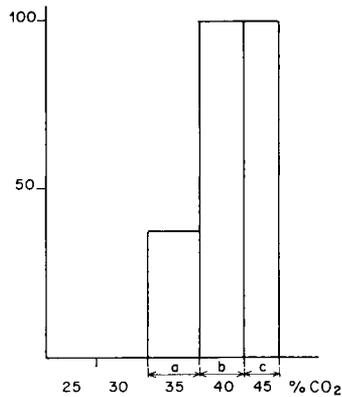


FIG. 1. — Doses de CO₂ nécessaires pour anesthésier des abeilles âgées de 2 jours.

En ordonnées : nombre d'abeilles anesthésiées

En abscisse : a = 90 mn; b = 80 mn; c = 60 mn

ABB. 1. — CO₂-Dosen, die erforderlich sind, um zwei Tage alte Bienen zu betäuben

Ordinate = Zahl der betäubten Bienen

Abszisse = die Breite des Histogramms ist proportional der Zeit, die notwendig ist, um das ganze Bienenvolk zu betäuben, a = 90 Min, b = 80 Min, c = 60 Min.

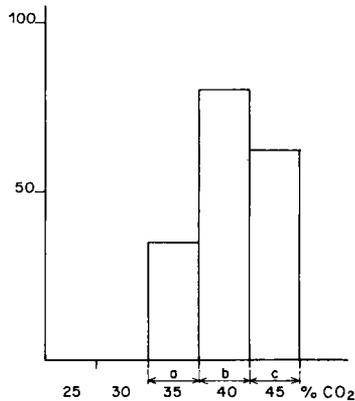


FIG. 2. — Doses de CO₂ nécessaires pour anesthésier des abeilles âgées de 4 jours.

En ordonnées : nombre d'abeilles anesthésiées

En abscisse : a = 90 mn; b = 90 mn; c = 90 mn

ABB. 2. — CO₂-Dosis, die erforderlich ist zur Betäubung 4 Tage alter Bienen

Ordinate = Zahl der betäubten Bienen

Abszisse = Die Breite des Histogramms entspricht der zur Betäubung des ganzen Volkes erforderlichen Zeit, a = 90 Min, b = 90 Min, c = 90 Min.

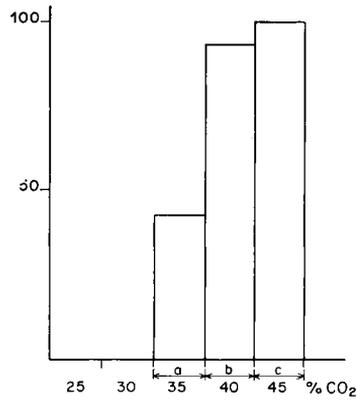


FIG. 3. — Doses de CO₂ nécessaires pour anesthésier des abeilles âgées de 6 jours.
 En ordonnées : nombre d'abeilles anesthésiées
 En abscisse : a = 90 mn; b = 90 mn; c = 90 mn

ABB. 3. — CO₂-Dosis, die zur Betäubung 6 Tage alter Bienen erforderlich ist
 Koordinaten wie in Abb. 2

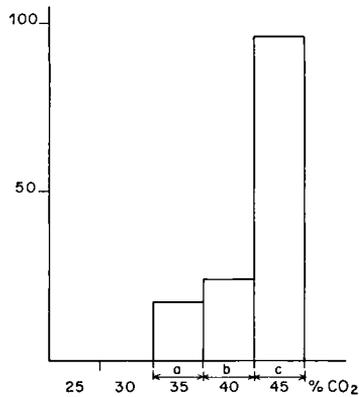


FIG. 4. — Doses de CO₂ nécessaires pour anesthésier des abeilles âgées de 8 jours.
 En ordonnées : nombre d'abeilles anesthésiées
 En abscisse : a = 90 mn; b = 90 mn; c = 90 mn

ABB. 4. — CO₂-Dosis, die zur Betäubung 8 Tage alter Bienen erforderlich ist
 Koordinaten wie in Abb. 2

+ à 40 % de gaz carbonique, toute la population est anesthésiée au bout de 80 minutes (b).

+ à 45 % de gaz carbonique, toute la population est anesthésiée au bout de 60 minutes (c).

Nous remarquons que quelque soit l'âge des abeilles utilisées, des mélanges gazeux jusqu'à 30 % de gaz carbonique ne sont pas anesthésiants. Les abeilles âgées de 2 jours semblent plus sensibles que les autres à l'action du gaz carbonique.

A 40 % de gaz carbonique, toutes les abeilles âgées de deux jours sont anesthésiées au bout de 80 minutes d'injection du mélange.

**b) Sensibilité des abeilles
aux différentes doses de gaz carbonique en fonction de l'âge**

Durant les premiers jours de leur vie d'adulte, les jeunes abeilles subissent de rapides transformations physiologiques. Il est intéressant de savoir si ces modifications physiologiques s'accompagnent d'une sensibilité différente au gaz carbonique :

— la figure 5 indique à quel moment de l'injection du mélange gazeux survient la première anesthésie.

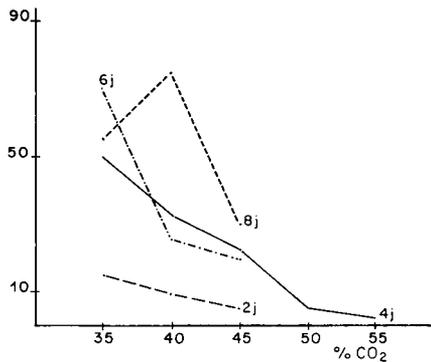


FIG. 5. — Sensibilité des abeilles aux différentes doses de CO₂ en fonction de l'âge
En ordonnées : durée de l'injection du mélange — — — 2 jours — · · · · 6 jours
— · — · 4 jours — — — 8 jours

ABB. 5. — Empfindlichkeit der Bienen verschieden starken Dosen von CO₂ gegenüber, je nach Alter
Ordinate = Einführungsdauer der Mischung — — — 2 Tage — · · · · 6 Tage
— · — · 4 Tage — — — 8 Tage

Les abeilles âgées de 2 jours sont particulièrement sensibles au gaz carbonique puisque à 35 % de gaz carbonique, il faut 15 minutes pour obtenir les premières anesthésies.

A la même concentration il faut 50 minutes pour les abeilles âgées de 4 jours et 70 minutes pour celles âgées de 6 jours. Les résultats obtenus avec les abeilles de 8 jours ne sont pas conforme à ceux trouvés avec les autres âges.

— la figure 6 rend compte des possibilités de récupération des sens après l'anesthésie par le gaz carbonique.

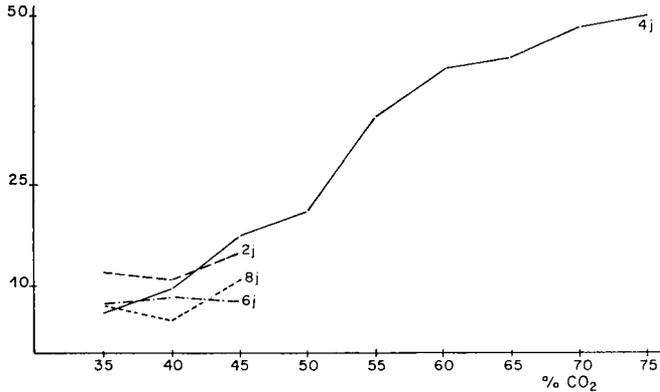


FIG. 6. — Nombre d'abeilles ayant récupéré leurs sens après 15 mn d'injection d'air, suivant la dose de CO₂ préalablement administrée, en fonction de l'âge.

En ordonnées : nombre d'abeilles anesthésiées — — — — 2 jours — — — — 6 jours
 — — — — 4 jours — — — — 8 jours

ABB. 6. — Anzahl der Bienen, die sich nach vorangegangener Anästhesie mit CO₂ — in Abhängigkeit vom Alter — nach 15 minütiger Luftzufuhr wieder erholten

Ordinate = Einführungsdauer der Mischung — — — — 2 Tage — — — — 6 Tage
 — — — — 4 Tage — — — — 8 Tage

Nous avons indiqué le nombre d'abeilles capables de se toiletter et de se déplacer normalement après 15 minutes d'injection d'air dans les cagettes.

Les critères choisis pour la récupération (toilettage et déplacement locomoteur) attestent une coordination neuro-musculaire normale.

Plus les abeilles sont anesthésiées rapidement, plus vite elles recouvrent un comportement normal. Le phénomène est net pour les abeilles âgées de 4 jours.

c) Influence des différentes doses de gaz carbonique sur la population expérimentale

Des abeilles âgées de 4 jours furent soumises à des doses allant jusqu'à 75 % de gaz carbonique.

La figure 7 rend compte de la durée d'injection nécessaire à l'anesthésie en fonction des doses utilisées. Les coordonnées de la figure 7 sont les mêmes que pour les figures 1, 2, 3, 4.

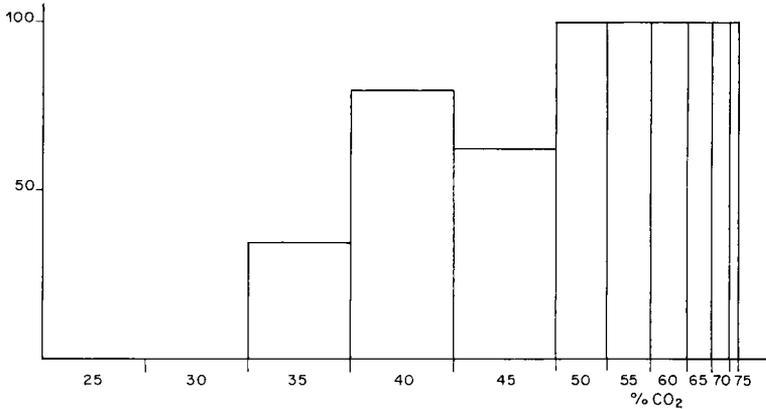


FIG. 7. — Durée d'injection du mélange nécessaire à l'anesthésie des groupes d'abeilles en fonction des doses de CO₂ utilisées.

En ordonnées : nombre d'abeilles anesthésiées

ABB. 7. — Zuführungsdauer der zur Betäubung von Bienengruppen notwendigen Mischung, abhängig von der angewandten CO₂-Dosis

Ordinate = Zahl der Versuchsbienen

Sur la figure 8 nous avons représenté en ordonnées le temps nécessaire pour anesthésier toute la population d'abeilles, en abscisses les concentrations en gaz carbonique pour lesquelles toute la population fut anesthésiée.

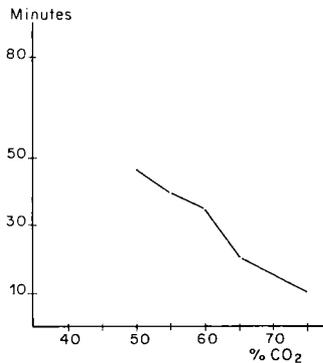


FIG. 8. — Temps nécessaire pour anesthésier toute la population d'abeilles âgées de 4 jours en fonction de la dose de CO₂

ABB. 8. — Die Zeit, die notwendig ist, um ein Volk aus 4 tägigen Bienen zu betäuben, abhängig von der CO₂-Dosis

Plus la teneur en gaz carbonique du mélange est grande, plus l'anesthésie s'établit rapidement. A partir de 50 % de gaz carbonique, il existe une proportionalité entre le temps nécessaire à l'anesthésie de toute la population et les concentrations en gaz carbonique.

Nous retrouvons le même phénomène sur la figure 9 qui représente en ordonnées le nombre d'abeilles anesthésiées durant les 5 premières minutes de l'injection du mélange et en abscisses les doses de gaz carbonique.

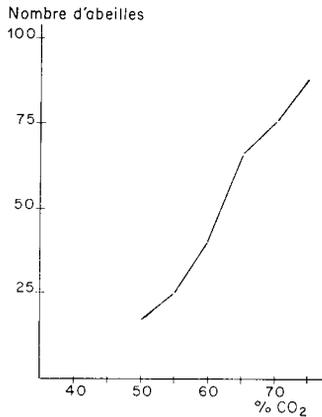


FIG. 9. — Nombre d'abeilles anesthésiées durant les 5 premières minutes d'injection du mélange en fonction de la dose de CO₂.

ABB. 9. — Anzahl der während der ersten 5 Minuten der Zufuhr des Narkose-Gemisches betäubten Bienen, abhängig von der CO₂-Dosis

IV. — CONCLUSIONS

Dans les conditions expérimentales décrites, les abeilles âgées de 2 à 8 jours sont anesthésiées à partir d'une tension de 30 % de gaz carbonique (en volume).

La résistance à l'anesthésie par le gaz carbonique varie en fonction de l'âge des abeilles. Les abeilles âgées de 2 jours sont plus sensibles que les autres à l'action du gaz carbonique.

A partir d'une dose narcotique de gaz carbonique égale à 30 %, plus la concentration augmente plus l'ensemble de la population est anesthésié rapidement.

Les abeilles récupèrent d'autant plus vite que l'anesthésie est plus rapide à s'établir.

Durant toutes nos expériences, aucune abeille n'est morte après l'anesthésie.

Reçu pour publication en mai 1977.

Eingegangen im Mai 1977.

ZUSAMMENFASSUNG

I. — *Material und Methode*

Die Verteilung des Gasmisches (Luft und CO₂) erfolgt durch einen von der Société L'OXYDRIQUE FRANÇAISE entwickelten Apparat « LEMGAZ ». Die Proportionen des Gasmisches werden mit einer Genauigkeit von 1 % und einer Reproduzierbarkeit von ± 0,5 % erreicht. Die Kohlenoxyd-Konzentrationen (im Volumen) steigen von 5 % zu 5 % ausgehend von einer 25 % igen CO₂-Mischung bis zur 75 % igen. Das Gasmisch wird in Käfige von etwa 0,5 l Rauminhalt eingeführt.

Bei jedem Versuch werden zwei Käfige mit je 50 2, 4, 6, 8 Tage alten Bienen 90 Min mit dem Gasmisch beschickt. Alle 5 Min werden die betäubten Bienen gezählt. Die zur Bewertung der Anästhesie in betracht kommenden Eigenschaften der Bienen sind :

- die Bienen liegen auf dem Rücken oder auf der Seite am Boden des Käfigs
- sie bewegen sich nicht, und die abdominale Atemfrequenz ist sehr niedrig
- sehr oft wird die Zunge leicht herausgestreckt und die Mandibeln sind gespreizt

In die Käfige mit den betäubten Bienen wird frische Luft eingeschleust, und während einer Viertelstunde werden die wiedererwachten Bienen gezählt.

Die Versuchsbedingungen sind folgende :

- die Temperatur im Käfiginnern beträgt 30 °C
- das Soll an zugeführtem Gasmisch 100 l je Stunde, der Druck 1 Bar
- die Versuche werden bei Tageslicht ausgeführt mit zusätzlicher Beleuchtung durch eine 75 Watt - Lampe, die 70 cm über den Käfigen angebracht ist.

II. — *Ergebnisse*1. Die CO₂-Narkose-Dosis :

keine Biene, einerlei wie alt, wird betäubt, wenn die CO₂- Konzentration 30 % oder weniger beträgt

2. Empfindlichkeit der Bienen je nach Alter :

von einer über 30 % igen CO₂-Konzentration ab ändert sich die Empfindlichkeit der Bienen mit dem Alter. Zwei Tage alte Bienen sind am empfindlichsten; bei 35 % CO₂ dauert es eine Viertelstunde bis zur ersten Betäubung. Die gleiche Konzentration erfordert bei 4 Tage alten Bienen 50 Min, bis sie wirksam wird und 70 Min bei 5 Tage alten Bienen.

3. Wiedererwachen nach der Narkose je nach Alter und CO₂-Dosis : Die Bienen erholen sich rasch nach der Betäubung. Das Putzen und die Veränderung der Körperlage sind Anzeichen einer normalen muskulären Koordination. Je höher die CO₂-Konzentration ist, umso rascher tritt die Betäubung ein, und die Bienen erholen sich rasch wieder, unabhängig von ihrem Alter.

4. Bei keinem der Versuche ist eine Biene nach der Narkose gestorben.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHAUVIN R., 1968. — Énergétique (calorimétrie des abeilles). *Traité de biologie de l'abeille*, t. I, Paris, Masson, 245-261.
- HAZELHOFF E. H., 1954. — Ventilation in a bee hive during summer. *Physiol. comp. Œcol.* 3, 343.
- KLOPFER F. D., QUIST J. A., 1955. — Reactions of the mealworm, honeybee and cockroach to some carbon dioxide concentrations. *J. comp. Physiol. Psychol.*, 48, 69-72.

- LACHER V., 1967. — Behavioural reactions of honeybee workers conditioned to carbon dioxide. *Z. vergl. Physiol.*, 54, 75-84.
- LE BIGOT L., 1953. — Les particularités de l'atmosphère interne des ruches. *Apiculteur*, sect. sci., 97 (12), 39-46.
- PATTON R. L., EDWARDS L. Y., GILMORE S. K., 1968. — Delivering safe levels of CO₂ for insect anesthesia. *Ann. entomol. Soc. Amer.*, 61 (4), 1046-1047.
- SEELEY Th. D., 1974. — Atmospheric CO₂ regulation in honeybee colony. *J. Insect Physiol.* 20, 2301-2305.
- SIMPSON J., 1954. — Effects of some anaesthetics on honeybees. *Bee World*, 35, 149-155.
- VUILLAUME M., GALLICHET P., 1950. — Étude des mouvements respiratoires de l'abeille au moyen de l'enregistrement optique. *Arch. intern. Physiol.*, 57 (4), 383-392.
- WALLA F., 1948. — Der Kohlensäuregehalt in verschlossenen Bienen-Stöcken während des Winters. *Bienenwater*, 73, 331.