

LES MICROORGANISMES ISOLÉS DE L'ACARIEN *VARROA DESTRUCTOR* ET LA VÉRIFICATION DE LEUR PATHOGÉNITÉ

J. HRABAK

E-mail: Hrabakj@seznam.cz

Luční 255, 338 28 Radnice, République Tchèque

Résumé

Notre recherche s'est concentrée sur la découverte d'un acarien *Varroa destructor* ayant des symptômes pathogènes et sur l'isolement des microorganismes qui en proviennent. On a ramassé les acariens morts des plaques adhésives des ruches et on les a examinés à l'aide d'un stéréomicroscope. Les acariens suspectés d'être morts à la suite d'un processus pathologique ont été examinés en utilisant des méthodes bactériologiques et mycologiques. La pathogénité des microorganismes isolés a été vérifiée en appliquant les tests décrits dans cette étude. Pendant la recherche, on a trouvé des femelles ayant des portions noires dans la zone intestinale, tout comme une mycose colorée en blanc dans l'idiosoma et sur sa surface. Les bactéries *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus haemolyticus* et les champignons *Aspergillus flavus*, *Penicillium multicolor* et *P. simplicissimum* ont été isolées chez les individus ayant des tâches noires, et les bactéries *Enterobacter cloacae* et les champignons *Mucor ramosissimus*, *M. indicus* et *M. hiemalis*, chez les acariens affectés de mycose. Les tests de laboratoire destinés à la vérification de la pathogénité des microorganismes isolés ont été effectués dans des cages de laboratoire à 40 abeilles et 15 femelles de *Varroa destructor*. Les cages de laboratoire avec des abeilles infestées avec *Varroa destructor* ont été pulvérisées avec un inoculum et avec de la solution stérile (pour les cages témoin). Les expériences ont eu lieu à la température de 35°C. Les tests de laboratoire ont prouvé la pathogénité seulement chez la bactérie *Enterobacter cloacae*, qui a causé une mortalité moyenne des acariens dans les cages de laboratoire de 77,4%. La mortalité dans les cages de contrôle a été en moyenne de 15,9%. En testant d'autres microorganismes, on n'a prouvé aucune différence statistique par rapport aux cages de contrôle. Les acariens infestés avec *Enterobacter cloacae* sont morts tout en présentant des modifications pathologiques caractéristiques des tubules malpighiennes (observées au niveau macroscopique comme modification de ces organes et de l'idiosoma) et la membrane entre les boucliers génital et sternal ou métapodal était d'habitude écrasée. Toutefois, les tâches noires n'ont pas été observées dans nos tests de laboratoire.

Introduction

Les recherches consacrées à identifier de nouvelles modalités de lutte biologique contre *Varroa destructor* peuvent se concentrer sur les activités de:

1. Tester des microorganismes ayant une pathogénité qui puisse être prouvée pour un autre type d'acariens.
2. Utiliser des acariens prédateurs pour attaquer ceux qui mènent leur vie dans les réserves alimentaires des colonies d'abeilles.
3. Trouver dans les ruches des acariens ayant des symptômes infectieux. On s'est focalisé dans nos recherches sur l'activité de trouver des acariens avec des symptômes pathologiques et infectieux, vivant dans les déchets de la ruche et dans la proximité des larves d'abeilles. Pourtant, on s'est limité seulement aux agents pathogènes de nature bactérienne et fongique.

Les microorganismes pathogènes décrits chez d'autres acariens (*Laelapidae*, *Iphiopsidae*) et chez les tiques (*Ixodia*, *Holothyridia*), peuvent être testés comme des agents de lutte biologique contre la varroose, car ces organismes sont apparentés aux acariens *Varroidae*.

La recherche s'est concentrée sur le hôte habituel de l'acarien *Varroa jacobsoni* – *Apis cerana*, mais les recherches d'Anderson et de Trueman (D.L. ANDERSON et al., 2000) ont démontré que *Varroa jacobsoni* est une espèce différente de *Varroa destructor*, infestant les colonies d'abeilles mellifères – *Apis mellifera*. Ce fait souligne la nécessité de rechercher des agents pathogènes affectant certaines espèces de *Varroa*.

Les agents pathogènes potentiels pour les acariens *Varroa destructor* peuvent être divisés en groupes, selon la taxonomie des microorganismes : les nématodes, les protozoaires, les virus, les rickettsiae

et les champignons. On fera référence seulement aux agents pathogènes les plus importants de la littérature de spécialité.

Les virus peuvent être des agents pathogènes qui présentent des avantages, car ils envahissent d'habitude les groupes standard de cellules identiques, en les infectant. Ce facteur affecte la pathogénité de l'organisme en question, ainsi qu'on ne peut pas supposer la pathogénité de *Varroa* chez les abeilles mellifères. Le premier désavantage des virus est leur culture difficile en grande quantité. La plupart des virus sont cultivés in vivo.

Les *Polydnaviridae*, *Ascoviridae* et *Baculoviridae* sont des agents pathogènes spécifiques aux arthropodes (D. CHANDLER et al., 2001). Les Baculovirus constituent un groupe caractéristique dans le combat biologique (M.E. MARTIGNONI, 1984). Ils infestent l'intestin et pénètrent entre les cellules épithéliennes de l'organisme.

Des particules ressemblant aux virus ont été trouvées dans le corps gras des acariens qui infestaient les colonies d'*Apis mellifera*, mais les tests de transmission de ces particules ont failli. Les acariens diagnostiqués de particules ressemblantes aux virus présentent des modifications de couleur noire dans le tissu et le corps gras de l'intestin (R.G. KLEESPIES, 2000).

Un possible iridovirus a été isolé chez les acariens *Varroa* des colonies d'abeilles mellifères des Etats Unis, bien que la pathogénité de celui-ci envers les acariens n'ait pas été établie (S. Camazine et al., 1998).

Les **rickettsiae** ont été trouvés dans des concentrations élevées chez les acariens et les tiques; ils peuvent être dangereux pour les hommes et d'autres vertébrés à la fois. Un autre désavantage est leur production difficile en masse; ainsi, ils ne peuvent pas être pris pour des agents pathologiques potentiels, comme c'est le cas des virus. Un organisme non identifié, ressemblant à rickettsia, a été trouvé dans le rectum des acariens *Varroa* (T.P. Liu et al., 1988). Ces organismes ont été trouvés dans tous les stades de leur développement.

Les **bactéries** entrent dans la catégorie des agents pathogènes des insectes. Les familles caractéristiques des entomopathogènes sont les *Bacillaceae*, les *Enterobacteriaceae* et les *Streptococcaceae*. L'effet pathogène des *Bacillaceae* est d'habitude fait de la synthèse de la toxine qui se forme par la sporulation des microbes.

Bacillus thuringensis est utilisé à large échelle dans le combat biologique. De cette manière il est appliqué en apiculture au combat de la *Galleria mellonella* L. *B. thuringensis* qui a tué des adultes et des larves des acariens tetranychides (I.M. HALL et al., 1971) et certaines espèces de *Mesostigmata* et *Prostigmata* (D. CHANDLER et al., 2001).

Des souches de *Bacillus thuringensis* ont été isolées dans l'intestin *V. destructor*, mais leur pathogénité n'est pas encore connue (Z.F. GLINSKI et al., 1990).

Tout de même, les bactéries ne sont pas des agents pathogènes caractéristiques des acariens et leur culture se produit d'habitude 30-35°C, ce qui est une caractéristique des conditions d'élevage des larves. L'humidité dans les colonies d'abeilles est aussi propice au développement des bactéries.

Les champignons (fungi) sont décrits comme étant un des premiers des agents pathogènes dans l'histoire des arthropodes. La température optimale se situe au delà de 25°C (S. BIRCHER et al., 1990). Ils peuvent s'avérer utiles à être utilisés dans les colonies d'abeilles à peine pendant l'hiver. Seulement un nombre restreint d'espèces disposent d'une température optimale de développement au-delà de 35°C, mais il y a une réelle attention envers leur pathogénité pour les gens, comme c'est le cas, par exemple, d'*Aspergillus*.

La mortalité causée par les infections fongiques est provoquée par la destruction mécanique des tissus, par l'élimination de l'eau et l'activité des mycotoxines (S. BIRCHER et al., 1990).

Les champignons *Beauveria bassiana* ont été utilisés en tant que mycopesitocides pour combattre plus de 700 espèces d'arthropodes (M.S. GOETTEL et al., 1992). Un autre champignon pathogène important des insectes est *Metatarhyzium anisopliae*; importants sont aussi autres espèces du genre *Metarhyzium*. Ils ont une température maximale de développement de 38°C.

L'avantage de l'utilisation des champignons dans la lutte biologique est la culture facile en quantités massives. Pourtant, *B. bassiana*, *M. anisopliae* peuvent déclencher des infections dans des conditions de laboratoire, mais l'infestation de l'abeille mellifère avec ce genre de champignons n'a pas encore été détectée (D. CHANDLER et al., 2001; J. WEISER, 1966).

Hirsutella thompsonii et *Metarhizium anisopliae* ont été évalués dans le laboratoire et dans les ruches d'observation et les résultats ont été significativement positives (KANGA et al., 2002).

Les Parasitoïdes. L'utilisation des acariens prédateurs dépend de l'humidité du milieu environnant. Ils infestent les adultes à des stades différents de développement et le couvain. L'utilisation des prédateurs implique un grand risque potentiel pour le couvain des abeilles, car ils le consomment avec prédilection.

Matériel et méthodes

L'identification des agents pathogènes

La collecte des acariens

Les acariens *Varroa destructor* ont été collectés dès 1999, dans les ruches qui se trouvent à Radnice (dans l'Ouest de la République Tchèque). Les ruches (des colonies d'*Apis mellifica* L.) étaient équipées de plaques de fond, unies d'une gaze hydrophile (la dimension de la maille \varnothing 10 mm), couverte d'une gaze séparée (la dimension de la maille \varnothing 3 mm).

Les femelles mortes sont restées collées sur les plaques de fond, sans être enlevées par les abeilles. Les plaques ont été observées de près et les acariens morts ont été analysés en utilisant un stéréomicroscope. Les modifications pathologiques se traduisent chez les acariens par une saisissante couleur foncée et se caractérisent même par l'augmentation de champignons sur la surface du corps.

L'isolement

Les femelles mortes à cause de *Varroa destructor*, soupçonnées d'être mortes à la suite d'un processus pathologique, ont été traitées avec de l'alcool éthylique (70%) et ultérieurement, sectionnées en deux. Une partie a été mise dans un 1 ml de solution saline et l'autre partie dans une éprouvette à la température de 4°C, en vue de les examiner par la suite. La partie d'acarien gardée dans la solution saline a été incubée pour 2 heures à la température de 36°C ensuite, le fluide a été inoculé sur une plaque Petri et incubé à la température de 36°C.

Pour ce qu'il y a de la culture bactérienne, on a utilisé de l'agar Columbia à 5% SB, et pour les champignons de l'agar de dextrose Sabouraud.

La partie expérimentale

Les infections expérimentales

L'inoculum contenant 1×10^7 cellules dans 1 mm³ de solution saline, à 5% glucose, a été pulvérisé dans les cages de laboratoire sur les abeilles infestés par des acariens *Varroa destructor* (Fig. 1). La partie supérieure des cages de laboratoire était faite de gaze hydrophile (la dimension de la maille \varnothing 0,5 mm), tandis que la partie inférieure était un fond de verre. On a mis dans chaque cage de laboratoire 40 abeilles et 15 acariens. Les abeilles infestées d'acariens se trouvant dans les cages de laboratoires ont été pulvérisées avec une solution saline manquant de bactéries et contenant 5% glucose.

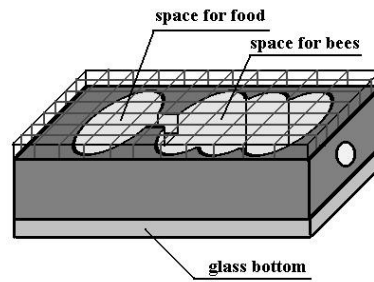


Fig. 1 - Cage de laboratoire (dessin schématique)

- (en haut) espace destiné à la nourriture
- espace destiné aux abeilles
- (en bas) fond de verre

L'isolement

Les acariens morts ont été enlevés de la cage de laboratoire et désinfectés sur la surface, tout comme les acariens de la chute spontanée. On a procédé par la suite à la perforation de l'idiosoma, le fluide obtenu étant cultivé et examiné au microscope.

Résultats

On a trouvé des acariens présentant des tâches pathologiques noires sur les intestines dans les restes et les déchets de la ruche (Figure 2). Le complexe des diverticules distaux et latéraux était plein d'une substance homogène dure, de couleur noire. On a cultivé cette substance en conformité avec les méthodes décrites.

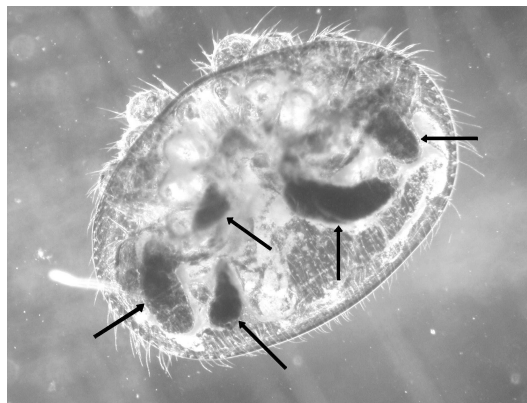


Fig. 2 - L'acarien *Varroa destructor*, avec une substance dense noire dans les diverticules intestinaux. (Préparation originale, stéréomicroscope, agrandissement : 20x).

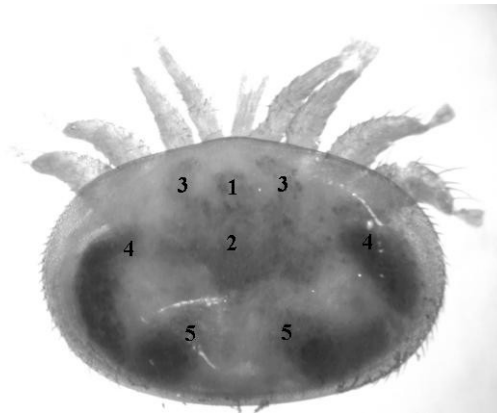


Fig. 3 - La substance de couleur noire du tract digestif et les formations noires des diverticules distal et latéral de l'intestin. 1 – oesophage 2 – diverticules intestinaux de proximité 3 – mésentère antérieur, 4 – diverticules intestinaux latéraux 5 – diverticules intestinaux distaux. (Préparation originale, stéréomicroscope, agrandissement: 20x).

Chez ces acariens, on a isolé les microorganismes suivants:

Champignons: *Aspergillus flavus*, *Mucor ramosissimus*, *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium multicolor*, *Penicillium simplicissimum*.

Bactéries: *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus*.

La pulvérisation des abeilles avec un inoculum préparé à partir des microorganismes isolés a prouvé qu'*Enterobacter cloacae* est l'agent qui cause des infections chez les acariens. La mortalité enregistrée a été de 70-88,9%. Les acariens sont morts dans une intervalle de 48-72 de heures et ont présenté un agrandissement spécifique de l'idiosoma. Le membrane entre les boucliers génital et sternal était d'habitude rompue, laissant passer un fluide (Figure 4). Le fluide a été prélevé de l'idiosoma intact à l'aide d'une aiguille de seringue stérile et on a détecté la présence d'*Enterobacter cloacae*, aussi bien au microscope que dans la culture bactérienne.

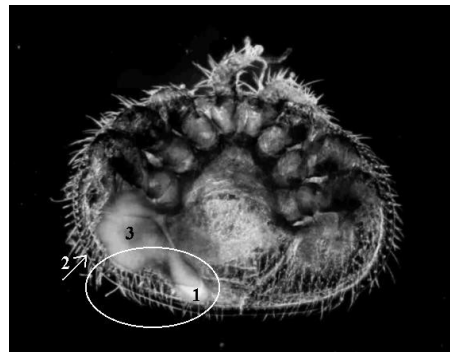


Fig. 4 - Les modifications pathologiques sur le tube malpighien après l'infestation artificielle, avec la rupture de la membrane entre les boucliers dorsal et métapodal. 1 – agrandissement du tube malpighien droit, 2 – bouclier dorsal, 3 – bouclier métapodal. (Préparation originale, stéréomicroscope, agrandissement: 20x).

La mortalité des acariens dans les cages de laboratoire de contrôle s'est située entre 0 et 45% (15,9% en moyenne). En testant d'autres microorganismes isolés, la mortalité dans les cages de laboratoire n'a pas prouvé leur pathogénité

Aspergillus flavus – 22,5% mortalité moyenne; *Mucor ramosissimus* – 25,2% en moyenne; *Mucor indicus* – 22,1% en moyenne; *Mucor hiemalis* – 18,6% en moyenne; *Penicillium multicolor* – 12,5% en moyenne; *Penicillium simplicissimum* – 18,6% en moyenne; *Staphylococcus albus* – 23,8% en moyenne.

Tous les résultats ont été analysés de manière statistique à l'aide d'un tableau de contingence, étant prouvé que $p > 0,95$.

Enterobacter cloacae s'est développé à un intervalle de 12 heures après l'inoculation sur l'agar Columbia. Les colonies avaient une forme ronde, leur dimension étant de 2-4 mm et le centre plus gros. Elles ont une couleur grisâtre et une consistance visqueuse. Selon l'observation au microscope, les bactéries sont gram-négatives, en forme de petits bâtons, à la dimension de 0,5-1 x 1-2 µm. Leur identification a été prouvée par des tests biochimiques. Nos résultats ont été confirmés par la Collection tchèque de microorganismes (Université Masaryk, Brno) où l'on a identifié de nouveau cette souche.

Enterobacter cloacae s'est très bien développé sur un agar nutritif (Nutriment) (1% extrait de bœuf, 1% peptone, 0,5% NaCl, 2% agar, pH 7,2), qui est sur le point d'être utilisé pour la production en masse.

Discussions

Enterobacter cloacae a été décrit par JORDAN en 1891. D'HERELLE a décrit cette bactérie comme étant entomopathogène au péninsule d'Yucatán en 1910. La bactérie a été nommée *Coccobacillus acridiorum*. Cette souche a provoqué des épizooties des sauterelles qui migraient en grand nombre de Mexique en Yucatán, les chercheurs observant des modifications de couleur noire et la décomposition de l'épithélium des organes digestifs des sauterelles, enregistrant aussi leur mort pendant les 8 heures suivant l'infestation. La virulence de la bactérie a augmenté avec les passages successifs (D'HERELLE, 1911, 1912).

Pendant les années 1910-1912 D'HERELLE a appliqué la bactérie, qu'il a isolé, au combat biologique des sauterelles d'Algérie, Argentine et Tunisie (D'HERELLE, 1911, 1912). Pendant la période de 1914-1916, Sergent et L'HERITIER ont découvert la nécessité de réaliser un nombre de passages successifs de 12 (chez D'HERELLE) à 50, pour que les insectes meurent dans les 8 heures après l'infestation. Depuis lors, on n'a plus isolé une souche ayant la même virulence que celle dont a disposé D'HERELLE (J. WEISER, 1966).

On a réussi de démontrer qu'*Enterobacter cloacae*, trouvée dans les organes digestifs de l'acarien *Varroa destructor*, est pathogène pour celui-ci. Jusqu'à présent, dans l'étude de CHANDLER et al, cette bactérie n'a pas été citée parmi les agents de lutte biologique de perspective contre *Varroa destructor* (D. CHANDLER, 2001).

Enterobacter cloacae est de façon taxonomique définie comme gram-négative, aérobie et nonsporulante. Sa structure antigénique représente une mosaïque typique. La température optimale de croissance se situe entre 30-37°C. La température de 100°C la tue dans deux minutes. L'activité biochimique spécifique pour cette espèce est mentionnée dans les travaux de spécialité.

Tableau I

L'activité biochimique de *Enterobacter cloacae*

	Resultats pour standards <i>Enterobacter cloacae</i>	Resultats de souche isolée <i>Varroa destructor</i> isoliert
Urease	d	+
Indol	-	-
Phénylalaninaminase	-	-
H ₂ S	-	-
VP	+	+
Gelatine (22 C)	-	-
Malonate	D	+
Dulzite	(d)	-
Raffinose	+	+
Rhamnose	+	+
Trehalose	+	+
Mannitol	+	+
Saccharose	+	+

Glukose/Gas	+	+
-------------	---	---

- = < 10% positive Stämme, (d) = 11-50% positive Stämme, d = 51-89% positive Stämme, + = >90% positive Stämme

Tableau II

L'activité biochimique d'espèce *Enterobacter*

	Argininhydrolase	Lysin-dekarboxylase	Ornithin-dekarboxylase	Adonitol	Sorbitol
<i>E. aerogenes</i>	-	+	+	+	+
<i>E. agglomerans</i>	-	-	-	-	d
<i>E. sakazakii</i>	+	-	+	-	-
<i>E. gergoniae</i>	-	+	+	-	-
<i>E. cloacae</i>	+	-	+	d	+
Aus Varroa isolierter Stamm	+	-	+	+	-

- = <10% positive Stämme, (d) = 11-89% positive Stämme, d = 51-89% positive Stämme, + = >90% positive Stämme

RÉFÉRENCES

- Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species, *Experimental and Applied Acarology* 24, 165-189
- Bircher S. et al. (1990) Medical Microbiology, The C.V. Mosby Company, Maning, USA.
- Camazine S., Liu T.P. (1998) A putative iridovirus from the honey bee mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 177-178.
- Chandler D., Sunderland K.D., Ball B.V., Davidson G. (2001) Prospective Biological Control Agents of *Varroa destructor* n.sp., an Important Pest of the European Honeybee, *Biocontrol Science and Technology* 11, 429-448.
- Glinski Z.F., Jarosz J. (1990) Micro-organisms associated fortuitously with *Varroa jacobsoni*, *Microbios* 62, 59-68.
- Goettel M.S., Johnson D.L. (1992) Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents, in Lomer C.J. (Ed.), Biological control of locusts and grasshoppers, International Wallingford, pp. 356-361.
- Hall I.M., Hunter D.K., Arakawa K.Y. (1971) The effect of the β -exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on the citrus red mite, *Journal of Invertebrate Pathology* 18, 359-362.
- D'Herelle F.H. (1911) Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles du Mexique, *C.R.Acad.Sci.* 152, 1413-1415.
- D'Herelle F.H. (1912) Sur la propagation dans la République Argentine de l'épizootie des sauterelles, *C.R.Acad.Sci.* 152, 1413-1415.
- Kanga L.H.B., James R.R., Boucias D.G. (2002) *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite, *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 175-184.
- Kleespies R.G., Radtke J., Bienefeld K. (2000) Virus-like particles found in the ectoparasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 15, 87-90.
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P., Winston M.L. (2000) Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite, *Journal of economic entomology* 93(2), 189-198.
- Liu T.P., Ritter W. (1988) Morphology of some microorganisms associated with the female mite *Varroa jacobsoni*, a survey by electron microscopy, in Needham E. et al. (Ed.), Africanized honeybees and bee mites, Ellis Horwood, Chichester, pp. 467-474.
- Martignoni M.E. (1984) Baculoviruses: an attractive biological alternative, in Burges H.D. (Ed.), Chemical and Biological Controls in Forestry, Seattle Washington, pp. 55-67.
- Weiser J. (1966) *Nemoci hmyzu*, Academia, Praha.