

Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*

I — Stabilité des suspensions d'épreuve et détection des éventuels contaminants chimiques toxiques pour les larves de moustiques ⁽¹⁾

Gilbert SINÈGRE ⁽²⁾

Résumé

Des investigations réalisées pendant six mois avec des suspensions d'une poudre primaire du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis* dans cinq milieux liquides ont montré que l'activité biologique de ce produit disparaît rapidement dans l'éthanol alors qu'il n'y a pas d'altération détectable, à 15° comme à 30°C, dans l'eau distillée à pH7 et pH5. La stabilité est également bonne dans de l'eau distillée à pH9 à 10°C mais l'activité disparaît graduellement dans le même milieu à 35°C. Une légère perte d'activité est observée dans les suspensions dans l'acétone.

Bien que l'on ne puisse fournir des conclusions définitives, il semble très probable qu'un simple test de filtration pourrait être mis au point pour détecter la présence dans les formulations commerciales du sérotype H-14 de *B. thuringiensis*, de contaminants chimiques dont la présence résulterait en un titre artificiellement élevé de l'endotoxine delta spécifique lors du test biologique de ces formulations.

Mots-clés : *Culicidae* — Larves — Insecticides — Sensibilité — Formulation.

Summary

CONTRIBUTION TO STANDARDIZATION OF LABORATORY TESTS ON EXPERIMENTAL AND COMMERCIAL FORMULATIONS OF THE SEROTYPE H-14 OF *Bacillus thuringiensis*. I — STABILITY OF TESTED SUSPENSIONS AND DETECTION OF POSSIBLE CHEMICAL CONTAMINANTS TOXIC FOR MOSQUITOES LARVAE

Longitudinal investigations carried out during six months with suspensions of a primary powder of the serotype H-14 of *B. thuringiensis* in five liquid mediums have shown that the biological activity of this material is rapidly lost in ethanol while at 10 or 35°C it is preserved without any detectable alteration in neutral distilled water as well as in distilled water buffered at pH5. The stability of this material is also good in distilled water buffered at pH9, at 10°C, but the activity disappears progressively in the same medium kept at 35°C. A small loss of activity was observed with acetonic suspensions but it does not seem to be due to any alteration of the delta endotoxin itself. With further improvements, these observations could lead to the preparation of standard reference suspensions of the delta endotoxin of *B. thuringiensis* by a central laboratory as already done for the solutions

(1) Cette étude a bénéficié d'une aide financière du programme spécial PNUD cf. Banque Mondiale-O.M.S. de Recherche et de Formation concernant les Maladies Tropicales.

(2) Laboratoire d'Évaluation des Insecticides, Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen, B.P. 6036, 34030 Montpellier-Cedex France.

of conventional insecticides used for insecticide susceptibility monitoring. Such an approach might decrease the variability of bioassay results arising from different methods of preparation of the suspensions of the standard IPS.78.

Although definitive conclusions could not be reached, it seems highly probable that a simple filtration test could be developed to detect the presence in commercial formulations of the serotype H-14 of *B. thuringiensis* of chemical contaminants whose occurrence would otherwise result in an artificially high titer of specific delta endotoxin when bioassaying these formulations.

Key words : *Culicidae* — Larvae — Insecticides — Sensibility — Formulation.

1. INTRODUCTION

Des progrès notables ont été faits en 1979 pour normaliser les épreuves biologiques destinées à déterminer la teneur en matière active des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H-14 de *B. thuringiensis*. La préparation d'une formulation de référence (de Barjac, 1979) et l'étude systématique des facteurs de variation liés aux insectes cibles ont permis dans un premier temps de proposer différentes alternatives (de Barjac et Larget, 1979), puis de sélectionner la plus satisfaisante d'entre elles (OMS, 1979). Le choix d'une méthode normalisée servant de base aux titrages de laboratoire ne signifie évidemment pas que les recherches sur ce sujet doivent être interrompues car il ne constitue qu'une étape sur la voie de l'amélioration continue de cette méthode.

Les essais que nous avons réalisés au cours de cette première partie de notre étude avaient deux objectifs distincts, d'une part déterminer s'il serait possible de simplifier les manipulations de la formulation de référence IPS-78 ou de poudres primaires de même type en préparant les suspensions de matière active à l'avance, d'autre part de rechercher si un procédé simple permettrait de déceler la présence de contaminants chimiques toxiques pour les larves de moustiques susceptibles d'interférer avec le titrage de la delta endotoxine de *B. thuringiensis*.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les épreuves sur larves de moustiques ont été effectuées avec des larves au 4^e stade jeune de

Culex pipiens à raison de 4 lots de 25 larves par concentration étudiée. L'exposition à l'endotoxine a été faite à 25°C, pendant 24 heures pour l'étude de la stabilité, et pendant 48 heures pour l'étude sur les contaminants, dans 200 ml d'eau.

Le matériel biologique étudié a été la poudre primaire R.153-78 du Laboratoire R. Bellon dont nous possédons une quantité suffisante pour assurer une continuité dans nos recherches méthodologiques.

2.1. Stabilité des suspensions d'endotoxine

La stabilité en milieu liquide de la delta endotoxine a été étudiée pendant six mois sur des suspensions de la poudre primaire R.153.78 (fournie par le Laboratoire R. Bellon) effectuées avec différents liquides et conservées à 10°C et à 35°C. Les liquides choisis ont été l'éthanol à 95°, l'acétone, l'eau distillée voisine de la neutralité et des eaux distillées tamponnées à pH 5 ⁽¹⁾ et pH 9 ⁽²⁾ conformément à la méthode de Sørensen, Clark et Lubbs telle que donnée par Rodier (1966).

Cinq suspensions mères de 500 ml titrant 0,02 mg/ml de poudre primaire ont été préparées par brassage énergique. Chacune a été ensuite divisée en deux lots de 250 ml, l'un conservé à 10°C et l'autre à 35°C, à l'obscurité, en flacons bouchés.

Chaque semaine lors du début de l'étude, puis à intervalles plus espacés ensuite, les flacons ont été agités énergiquement avant prélèvement des échantillons servant au contrôle de la stabilité. Les épreuves ont été effectuées en ajoutant 1 ml de suspension à 199 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg/l de poudre primaire correspondant presque exactement à la CL.100 de la souche de *Cx. pipiens* utilisée.

(1) Soude au 1/5^e : 60 ml — phtalate acide de potassium : 5,1 g — eau distillée : q.s.p. 500 ml.

(2) Soude au 1/5^e : 53,2 ml — acide borique : 1,55 — chlorure de potassium 1,86 g — eau distillée q.s.p. 500 ml.

2.2. Recherche de contaminants chimiques

Bien que la présence de contaminants chimiques insolubles toxiques pour les larves de moustiques soit toujours possible, nous la considérons peu probable. Nous avons donc cherché à jeter les bases d'un procédé simple qui pourrait mettre en évidence la présence de contaminants solubles dans l'eau, soit dans l'un des milieux liquides précités. Le principe de l'opération serait alors la comparaison de la toxicité pour les larves de moustiques d'une suspension du matériel à étudier, et de son filtrat. Nous avons comparé la toxicité de suspensions de poudre primaire et du filtrat obtenu avec un filtre Whatman N° 2 pour déterminer dans quelle mesure les cristaux d'endotoxine se retrouveraient dans le filtrat.

Dans ce but, nous avons préparé une suspension mère à 40 mg/l de poudre primaire, avec une agitation magnétique de 10 minutes, puis une suspension secondaire de 0,4 mg/l par addition de 10 ml de suspension mère à 990 ml d'eau distillée. Cette suspension secondaire, filtrée et non-filtrée a

servi à effectuer des épreuves de sensibilité à l'endotoxine aux concentrations de 0,025 — 0,05 — 0,10 et 0,20 mg de poudre primaire par litre.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Stabilité biologique des suspensions d'endotoxine

Les résultats, résumés dans le tableau I, montrent que l'endotoxine delta du sérotype H-14 de *B. thuringiensis* conserve toute son efficacité après six mois de conservation à 10° dans l'eau neutre, à pH 5 et à pH 9, ainsi qu'à 35° dans l'eau neutre et à pH 5. Dans l'eau à pH 9, l'efficacité de l'endotoxine disparaît lentement. La stabilité biologique de la suspension d'endotoxine dans l'éthanol est nulle à 35° et très médiocre à 10°. Dans le cas des suspensions dans l'acétone, on observe une baisse du titre d'endotoxine dès le départ, qui ne s'accroît pas par la suite, les écarts observés d'une épreuve à l'autre étant de l'ordre de ceux dus au hasard.

TABLEAU I

Stabilité biologique comparée de suspensions de la poudre primaire R.153.78 du sérotype H-14 de *B. thuringiensis* dans différents milieux liquides conservés à 10° et 35° Celsius. Résultats exprimés en pourcentages de mortalité de larves 4^e stade jeune de *Cx. pipiens* exposées pendant 24 heures à 0,1 mg/l de poudre primaire provenant de ces suspensions.

Durée de conservation des suspensions avant emploi (en jours)	Températures et milieux de conservation									
	10°C					35°C				
	Éthanol	Acétone	Eau	Eau pH5	Eau pH9	Éthanol	Acétone	Eau	Eau pH5	Eau pH9
Pourcentages de mortalité observés										
3	52	72	100	96	100	0	100	100	100	92
10	14	64	100	96	90	0	54	98	92	60
17	66	98	98	100	100	2	88	100	100	84
24	52	66	98	100	94	0	62	100	100	74
31	4	68	100	98	92	0	62	96	98	38
45	0	94	100	100	100	—	94	100	100	62
59	—	94	100	100	100	—	74	96	98	50
66	—	64	96	100	94	—	76	90	100	14
73	—	96	100	100	100	—	80	100	98	42
80	—	96	90	98	100	—	90	98	96	48
87	—	90	100	100	98	—	94	94	100	60
120	—	88	100	100	98	—	78	98	100	0
135	—	94	100	100	100	—	96	98	100	0
143	—	100	100	100	100	—	88	98	100	0
180	—	98	100	100	92	—	84	94	100	0

TABLEAU II

Mortalités induites par exposition de larves 4^e stade jeune de *Cx. pipiens* à des suspensions filtrées et non filtrées du sérotype H-14 de *B. thuringiensis* pour des périodes de contact comprises entre 3 et 48 heures. Concentrations exprimées en mg de poudre primaire R.153.78/litre avant filtration.

Mg/l	Heures de contact (en heures)	Pourcentages de mortalité observés			
		Premier essai		Second essai	
		Suspension normale	Suspension filtrée	Suspension normale	Suspension filtrée
0,025	3	0	0	0	1
0,05		11	0	1	0
0,10		33	0	15	0
0,20		66	0	80	1
0,025	6	3	0	2	1
0,05		40	0	21	0
0,10		75	0	72	0
0,20		100	0	95	2
0,025	9	6	0	8	1
0,05		61	0	47	0
0,10		91	2	94	0
0,20		100	22	100	16
0,025	24	9	0	12	1
0,05		75	0	57	0
0,10		95	11	94	1
0,20		100	49	100	24
0,025	48	23	0	16	1
0,05		81	0	64	0
0,10		97	15	99	5
0,20		100	65	100	32

Lors des épreuves, la mortalité des larves de moustiques est influencée par la quantité d'endotoxine et son accessibilité, cette dernière dépendant en partie de la taille des particules contenant l'endotoxine. La stabilité biologique des suspensions aqueuses laisse penser que non seulement l'endotoxine elle-même est stable dans ces milieux, mais aussi que la taille des particules en suspension ne se modifie pas au fil des semaines. La faible chute d'efficacité biologique observée lors de la mise en suspension de la poudre primaire R.153.78 dans l'acétone pourrait être due à une mauvaise dispersion de la matière active dans ce liquide, ou à une diminution de l'accessibilité de l'endotoxine pour les larves de moustiques une fois la poudre

primaire mise en suspension dans l'acétone ; la première de ces hypothèses pourrait être la bonne car si l'on regroupe les séries de résultats à 10 et 35° par groupes de deux épreuves consécutives, la mortalité moyenne observée s'accroît avec la période de conservation, et donc d'agitation de la suspension puisque cette dernière est agitée avant chaque épreuve.

3.2. Recherche des contaminants chimiques

Les résultats de deux séries d'épreuves faite à quelques jours d'intervalle sont résumés dans le tableau II. Ils montrent clairement que le filtrage

au papier Whatman N° 2 laisse passer une partie des cristaux d'endotoxine.

L'étude de la cinétique de la mortalité montre une grande différence entre l'action sur les larves de moustiques de suspensions filtrées et non filtrées. Cette différence ne permettrait cependant pas de distinguer l'action d'un contaminant chimique à action lente (tel le DDT) de celle des cristaux passant à travers le filtre. Il conviendrait donc de reprendre ces essais avec des filtres à pores plus fins.

Sous réserve d'une amélioration de cette approche, il semble que l'on pourrait aisément traiter les poudres à évaluer avec un solvant à large spectre peu toxique pour les larves de moustiques, tel l'acétone, et comparer ensuite la cinétique de mortalité des larves mises au contact d'une part de suspensions de la poudre à évaluer et d'autre part des quantités correspondantes des extraits acétoniques filtrés. Toute présence d'une quantité appréciable d'un contaminant chimique toxique pour les larves de moustiques, par exemple un insecticide conventionnel, serait alors très facilement décelée.

Il est intéressant de noter que les résultats résumés dans le tableau II montrent nettement que, pendant les neuf premières heures de contact, la probabilité de mortalité est proportionnelle au logarithme du temps de contact. Pour chacune des quatre concentrations étudiées, les lignes de régression tracées sur papier gaussien-logarithmique mortalité/temps de contact sont alors des droites à forte pente. Ces lignes de régression tendent ensuite vers l'horizontale. Cela justifie pleinement de limiter la durée des épreuves à 24 heures pour la comparaison des formulations avec le standard IPS.78.

BIBLIOGRAPHIE

- DE BARJAC (H.), 1979. — Note sur la préparation d'une formulation de référence, IPS.78, pour le titrage biologique des formulations expérimentales et industrielles du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. *Doc. mimeogr.* OMS, WHO/VBC/79.741, Genève, 6 pp.
- DE BARJAC (H.) & LARGET (I.), 1979. — Proposals for the

4. CONCLUSIONS

La stabilité biologique des suspensions aqueuses de la poudre primaire R.153.78 indique qu'il devrait être possible de préparer à l'avance des suspensions normalisées de l'endotoxine delta du sérotype H-14 de *B. thuringiensis*. Cette préparation pourrait être effectuée par une seule institution, de façon à permettre à tous les laboratoires contribuant au titrage des formulations expérimentales et industrielles de ce larvicide bactérien, d'utiliser les mêmes suspensions du standard IP.78. Nos études devraient cependant être confirmées par d'autres essais indépendants et poursuivies pendant une période plus longue. Il serait également important de déterminer quel agent conservateur non-actif sur les larves de moustiques conviendrait le mieux pour améliorer encore la stabilité des suspensions de référence.

La mise au point d'une méthode simple de détection des contaminants chimiques n'en est qu'à ses débuts mais les premiers résultats obtenus permettent de penser que la voie que nous avons choisie est satisfaisante sous réserve d'améliorer la méthode de filtration.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tous les personnels de l'EID qui ont facilité la réalisation de cette étude, et en particulier M. G. Vigo, chimiste auprès de cet organisme. Nous souhaitons associer à ces remerciements les Dr J. Mouchet et J. Coz de l'ORSTOM et les spécialistes de la Division de la Biologie et du Contrôle des Vecteurs de l'OMS, avec lesquels nous avons discuté des résultats présentés ci-dessus.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M. le 17 avril 1981

adoption of a standardized bioassay method for the evaluation of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. *Doc. mimeogr.* OMS, WHO/VBC/79.744, Genève, 15 pp.

OMS, 1969. — Report of the Third Meeting of the Scientific Working Group on Biological Control of Insect Vectors of Diseases. *Doc. mimeogr.* OMS, TDR/BCV-SWG (3)/79.03, Genève, 40 pp.

RODIER (J.), 1966. — L'analyse chimique et physicochimique de l'eau. Dunod éd., Paris, 412 pp.