

## Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus*

### 2. Influence de la température et du temps de contact sur l'activité larvicide de *B. sphaericus*

Mamadou DAGNOGO <sup>(1)</sup>

Jean COZ <sup>(2)</sup>

#### Résumé

Dans ce travail, nous avons étudié d'une part l'action de la température sur la conservation de l'activité larvicide de *B. sphaericus* en utilisant des larves du 4<sup>e</sup> stade d'*Anopheles stephensi* ST15, d'autre part la relation entre le temps de contact et la mortalité des larves de moustiques, en utilisant des larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* STR.

Les résultats permettent de dégager les points suivants :

- une bonne conservation de l'activité toxique de *B. sphaericus*, culture de l'Institut Pasteur, due aux basses températures (— 20°C et — 80°C),
- une diminution de cette activité toxique de *B. sphaericus*, poudre Stauffer, à 70°C,
- une perte totale de l'activité larvicide de *B. sphaericus*, poudre Stauffer, à 100°C.

L'efficacité de *B. sphaericus*, poudre Stauffer sur les larves 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* STR ne varie pas avec le temps de contact lorsque celui-ci passe de 1/8 heure à 48 heures.

**Mots-clés :** *Bacillus sphaericus* — Insecticide — Température — Temps de contact — Larves de moustiques.

#### Summary

A BIOLOGICAL INSECTICIDE : *Bacillus sphaericus*. 2. INFLUENCE OF TEMPERATURE AND EXPOSURE TIME ON LARVICIDAL ACTIVITY OF *B. sphaericus*

The authors have studied the influence of temperature of preservation and exposure time on the larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* using fourth instar larvae of *Anopheles stephensi*.

For different temperatures of preservation, the results show :

- a good toxical activity of *B. sphaericus*, culture of Pasteur Institute, kept at — 20°C and — 80°C during four months,
- a decrease of toxical activity of *B. sphaericus*, Stauffer powder, kept at 70°C for 24 or 48 hours,
- a total destruction of larvicidal activity of *B. sphaericus*, Stauffer powder, kept at 100°C for 48 hours.

(1) Centre Universitaire de Formation en Entomologie médicale et vétérinaire, Bouaké, Côte d'Ivoire.

(2) Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., Laboratoire d'Entomologie médicale, Services Scientifiques Centraux, O.R.S.T.O.M., 70, route d'Aulnay, 93140 Bondy, France.

Using different concentrations of *B. sphaericus*, Stauffer powder, we do not observe a relation between mortality and exposure time; this one varying from 1/8 hour to 48 hours.

Key words : *Bacillus sphaericus* — Insecticide — Temperature — Exposure time — Mosquitoes larvae.

## 1. INTRODUCTION

Dans le précédent article (Dagnogo et Coz, 1982) nous avons analysé l'activité larvicide de *B. sphaericus*, culture de l'Institut Pasteur, sur les larves du 4<sup>e</sup> stade de six espèces de moustiques. Cette étude a montré :

- la forte sensibilité de *Culex pipiens* Linné, 1758 (CL 50 = 0,001 ml/l),
- la bonne sensibilité d'*Anopheles gambiae* Giles, 1902 (CL 50 = 0,02 ml/l),
- une sensibilité moyenne d'*Anopheles stephensi* Liston, 1901 (CL 50 = 0,16 ml/l) et d'*Aedes albopictus* Skuse, 1894 (CL 50 = 0,15 ml/l),
- une moindre sensibilité d'*Aedes caspius* Pallas, 1771 (CL 50 = 5 ml/l) et d'*Aedes aegypti* Linné, 1762 (CL 50 = 6,5 ml/l).

Dans cette deuxième partie, nous étudions l'influence de la température et du temps de contact sur l'activité larvicide de *B. sphaericus*.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 2.1. Matériel

#### *B. sphaericus*

Nous avons utilisé dans nos tests deux préparations de la souche 1593-4 de *B. sphaericus*, c'est-à-dire : la culture de l'Institut Pasteur de Paris et la poudre Stauffer (U.S.A.).

10 g de la poudre Stauffer ou 10 ml de la culture de l'Institut Pasteur dilués dans un litre, donne une solution à  $10^{-2}$ , qui servira à préparer les autres dilutions.

#### LARVES DE MOUSTIQUES TESTÉES

*Anopheles stephensi* Liston, 1901 :

souche sensible au d.d.t. et à la dieldrine (ST15), souche résistante à ces deux insecticides (STR).

### 2.2. Méthode

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la méthode normalisée O.M.S. pour la détermination

de la sensibilité aux insecticides des larves de moustiques.

Les tests ont été faits sur des jeunes larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* sensible ou non au d.d.t. et à la dieldrine. La mortalité dans les lots témoins étant inférieure à 5 %, la mortalité n'a pas été corrigée par la formule d'Abbott.

## 3. ACTION DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CONSERVATION DE L'ACTIVITÉ LARVICIDE DE *B. SPHAERICUS*

La mort des larves de moustiques par *B. sphaericus* est due à l'action d'une endotoxine polypeptidique. Cette toxine dont la structure et la composition sont à l'étude (O.M.S., 1979) se localise à la fois dans la paroi et le cytoplasme cellulaire.

Une série de tests ont été entrepris afin de tester les effets de la chaleur et ceux du froid sur le maintien de l'activité larvicide de la toxine produite par *B. sphaericus*.

### 3.1. Température élevées

Quatre lots A, B, D, C, de *B. sphaericus*, poudre Stauffer, sont placés à différentes températures de la façon suivante :

lot A à 21 — 22°C (température du laboratoire),  
lot B à 70°C pendant 24 heures (étuve),  
lot C à 70°C pendant 48 heures (étuve),  
lot D à 100°C pendant 48 heures (étuve).

Des tests de sensibilité sont faits avec ces différents lots de *B. sphaericus* sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* ST 15, c'est-à-dire sensible au d.d.t. et à la dieldrine.

Les résultats de ces tests sont portés au tableau I et représentés sur la figure 1.

Les CL 50 observées sont :

0,0022 g/l (21 — 22°C),  
0,0025 g/l (70°C pendant 24 heures),  
0,0022 g/l (70°C pendant 48 heures),  
0 (100°C pendant 48 heures).

Quelle que soit la température de conservation (sauf à 100°C où il y a une perte totale d'acti-

TABLEAU I

Action de la chaleur sur la conservation de l'activité de *B. sphaericus*, poudre Stauffer.  
Tests réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* ST15

21 — 22° C				70°C (24 h)			70°C (48 h)			100°C (48 h)		
C (g/l)	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M
1	100	100	100,0	96	85	88,5	98	85	86,7	99	0	0,0
0,1	100	100	100,0	99	85	85,5	98	77	78,6	90	0	0,0
0,01	199	192	96,5	96	62	64,6	100	74	74,0	100	0	0,0
0,001	100	22	22,0	75	60	80,0	96	38	39,6	99	0	0,0
Te	200	0	0,0	89	1	1,1	89	1	1,1	96	0	0,0
CL 50 (g/l)		0,0022			0,0025			0,0022			0	
CL 50 (g/l)		0,007			asymptotique			asymptotique			0	

C = Concentration ; T = Nombre de larves testées par concentration ; M = Nombre de larves mortes par concentration ; %M = Pourcentage de mortalité ; Te = Témoin.

vitité larvicide) la CL 50 de *B. sphaericus* reste sensiblement la même.

Si à 100°C la perte de l'activité larvicide de *B. sphaericus* est totale, à 70°C une nette diminution de cette activité se traduit par une forte augmentation de la CL 90 qui n'a pu être mesurée expérimentalement.

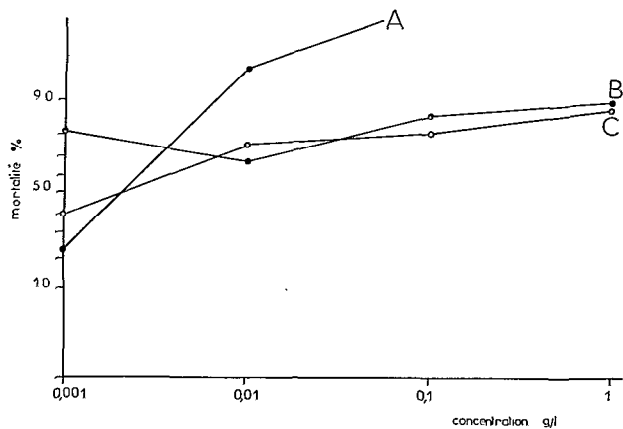


FIG. 1. — Action de la température sur *B. sphaericus*, poudre Stauffer. Tests réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* ST15. A : courbe de sensibilité à 21-22°C (Laboratoire) ; B : courbe de sensibilité à 70°C pendant 24 heures ; C : courbe de sensibilité à 70°C pendant 48 heures. (à 100°C pendant 48 heures : mortalité nulle quelle que soit la concentration)

Myers *et al.*, 1979 constatent aussi qu'un chauffage à 80°C pendant 15 minutes de la souche SS 11-1 de *B. sphaericus* entraîne une perte totale de la toxicité de cette souche.

Nos résultats montrent donc que :

- la toxine de *B. sphaericus* est assez résistante à l'action de la chaleur jusqu'à un seuil de rupture, au-delà duquel la toxicité sur les larves de moustique est nulle,
- les effets de la chaleur entraînent une réduction de l'activité larvicide de *B. sphaericus* qui apparaît bien avant le seuil de rupture.

### 3.2. Températures basses

Trois flacons A, B et C contenant une culture de *B. sphaericus*, souche de l'Institut Pasteur de Paris, ont été conservés durant 4 mois de la façon suivante :

- le flacon A est placé à 21 — 22°C (température du laboratoire),
- le flacon B est placé à — 20°C (réfrigérateur),
- le flacon C est placé à — 80°C (congélateur).

Des tests de sensibilité sont faits avec ces différents lots de *B. sphaericus* sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* ST15, c'est-à-dire sensible au d.d.t. et à la dieldrine. Les résultats de ces tests sont portés au tableau II et représentés sur la figure 2.

TABLEAU II

Action du froid sur la conservation de l'activité de *B. sphaericus*, Culture de l'Institut Pasteur.  
Tests réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* ST15

4 mois à 21 — 22° C			4 mois à — 20° C			4 mois à — 80° C			
C (ml/l)	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M
1	100	87	87,0	100	95	95,0	98	93	94,9
0,5	100	65	65,0	100	62	62,0	100	57	57,0
0,1	100	29	29,0	99	15	15,0	97	29	29,9
Te	100	0	0,0	100	0	0,0	100	0	0,0
CL 50 (ml/l)		0,27			0,35			0,35	
CL 90 (ml/l)		1,2			0,85			0,9	

Les CL 50 observées sont :

0,27 ml/l (21 — 22°C),  
0,35 ml/l (— 20°C),  
0,35 ml/l (— 80°C).

Il convient d'abord de noter que ces CL 50 sont environ 100 fois plus élevées que celles obtenues avec la poudre Stauffer. La toxicité de la

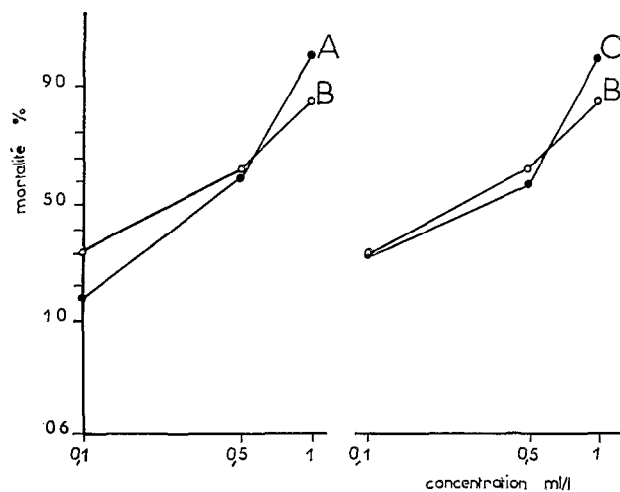


Fig. 2. — Action de la température sur *B. sphaericus*, culture de l'Institut Pasteur. Tests réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* ST15. A : courbe de sensibilité à — 20° C (réfrigérateur) ; B : courbe de sensibilité à 21-22°C (Laboratoire) ; C : courbe de sensibilité à — 80°C (congélateur)

culture de l'Institut Pasteur est donc bien moindre que celle de la poudre Stauffer comme nous l'avons constaté précédemment (Dagnogo et Coz, 1982). Quelle que soit la température de conservation de *B. sphaericus*, culture de l'Institut Pasteur, la CL 50 obtenue change peu.

La CL 90 de *B. sphaericus*, culture de l'Institut Pasteur, conservée à — 20°C ou à — 80°C est la même (0,85 et 0,90 ml/l) ; elle est sensiblement identique à celle de la culture conservée à la température du laboratoire (1,2 ml/l). Il apparaît donc que les basses températures n'entraînent aucune diminution ou perte de l'activité de la toxine de *B. sphaericus*, au contraire elles permettent une bonne conservation de cette toxicité.

#### 4. RELATION ENTRE LE TEMPS DE CONTACT ET LA MORTALITÉ

En règle générale, l'activité des insecticides sur les insectes suit une loi gaussio-logarithmique, la mortalité variant de façon normale en fonction du logarithme de la concentration ou du temps de contact.

Nos premières observations semblaient montrer une relation entre le temps de contact et la mortalité. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait varier ce temps de contact de 1/3 d'heure à 48 heures en utilisant 4 concentrations de *B. sphaericus*, poudre Stauffer. La lecture de la mortalité était faite 48 heures après le début du test, quelle que soit la durée du temps de contact ; en fin

TABLEAU III

Évaluation de la relation entre le temps de contact et la mortalité pour quelques concentrations de *B. sphaericus*, poudre Stauffer. Tests réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* STR

7 minutes 30 de contact 47 h 52' 30" d'observation				15 minutes de contact et 47 h 45' d'observation			30 minutes de contact et 47 h 30' d'observation		
C (cg/l)	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M
0,01	72	51	70,8	75	59	78,7	75	64	85,3
0,005	71	19	26,8	73	27	37,0	73	27	37
0,001	67	8	11,9	72	13	18,1	72	17	23,6
0,0005	72	4	5,5	73	13	17,8	70	8	11,4
Témoin	73	1	1,4	73	1	1,4	73	1	1,4

N.B. : Après les temps de contact 1/8, 1/4 et 1/2 d'heure, nous retirons les larves en contact avec les produits insecticides et nous les mettons dans l'eau permutée ; les mortalités sont lues après 48 heures.

TABLEAU III (suite)

Évaluation de la relation entre le temps de contact et la mortalité pour quelques concentrations de *B. sphaericus*, poudre Stauffer. Tests réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* STR

1 h de contact et 47 h d'observation				2 h de contact et 46 h d'observation			4 h de contact et 44 h d'observation			6 h de contact et 42 h d'observation			24 h de contact et 24 h d'observation			48 h de contact et lecture		
C (g/l)	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M	T	M	%M
0,01	72	72	100,0	72	70	97,2	75	72	96,0	97	89	91,8	100	92	92,0	50	45	90,0
0,005	74	53	71,6	72	60	81,1	74	74	100,0	95	82	86,3	99	87	87,9	47	33	70,2
0,001	73	17	23,3	70	26	37,1	74	45	60,8	92	47	51,1	100	59	59,0	49	22	44,9
0,0005	65	5	7,7	67	2	3,0	74	27	36,5	97	10	10,3	95	14	14,7	49	9	18,4
Témoin	94	3	3,2	94	3	3,2	94	3	3,2	94	3	3,2	94	3	3,2	94	3	3,2

N.B. : Après les temps de contact 1, 2, 4, 6 et 24 heures, nous retirons les larves en contact avec le produit insecticide et nous les mettons dans l'eau permutée ; les mortalités sont lues après 48 heures.

TABLEAU IV

Tableau des doses léthales 50 et 90, du Chi<sup>2</sup> et du facteur d'hétérogénéité aux différents temps de contact de *B. sphaericus*, poudre Stauffer. Test réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* STR

Temps de contact (heure)	CL 50 (g/l)	CL 90 (g/l)	Chi <sup>2</sup> (2 ddl) **	Facteur d'hétérogénéité
1/8	0,0063	0,0126	18,6 — S	9,29
1/4	0,0065	0,0130	19,1 — S	9,53
1/2	0,0065	0,0110	17,9 — S	9,98
1	0,0025	0,0110	8,2 — S	4,13
2	0,0020	0,0063	8,1 — S	4,06
4	0,0008	0,0050	9,3 — S	4,67
6	0,0016	0,0080	13,9 — S	6,96
24	0,0013	0,0080	16,4 — S	8,21
48	0,0019	0,0100	2,8 — NS	0,00

(\*) : S = Significatif ; NS = non significatif

d'exposition à *B. sphaericus*, les larves étaient placées dans de l'eau permutée jusqu'au moment de la lecture. Les résultats sont portés au tableau III et représentés sur la figure 3. L'analyse statistique de ces résultats est portée au tableau IV.

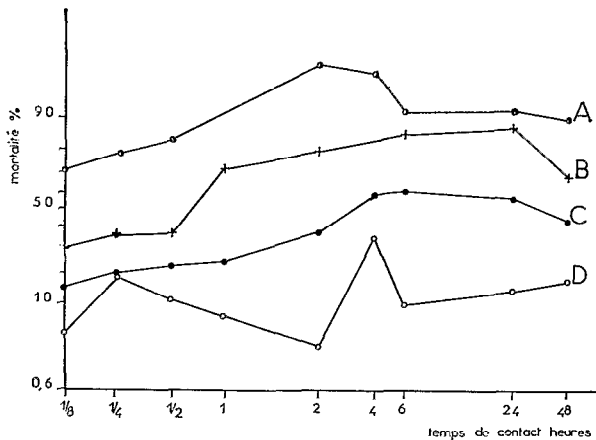


Fig. 3. — Influence du temps de contact de *B. sphaericus*, poudre Stauffer, sur la mortalité. Tests réalisés sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* STR. Pour chaque concentration, nous avons tracé les pourcentages de mortalité en fonction du temps de contact. A : courbe de concentration 0,01 g/l ; B : courbe de concentration 0,005 g/l ; C : courbe de concentration 0,001 g/l ; D : courbe de concentration 0,0005 g/l

Les CL 50 et les CL 90 subissent des fluctuations sensibles mais ne traduisent aucune relation normale mortalité/temps de contact. Il faut ajouter

que pour chaque temps de contact, à l'exception de 48 heures, la mortalité ne varie pas de façon normale en fonction de la concentration.

Ces résultats sont difficiles à interpréter et semblent indiquer des modalités complexes d'action liées soit au bacille, soit à la formulation, soit à l'insecte. Les travaux récents de Davidson (1979) ont montré comment la toxine est libérée et agit au niveau de l'intestin de l'insecte. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour préciser la nature de l'action toxique de *B. sphaericus*.

## 5. CONCLUSION

La température a une influence certaine sur le maintien (basses températures : — 20°C et — 80°C) et la perte totale (100°C) de l'activité larvicide de *B. sphaericus* sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* ST15. Il faut cependant noter qu'une diminution de la toxicité apparaît bien avant sa perte totale (à 70°C la CL 90 n'est pas atteinte).

L'étude de différents temps de contact de *B. sphaericus* sur les larves du 4<sup>e</sup> stade d'*A. stephensi* STR montre qu'il n'y a pas de relation de proportionnalité entre le temps de contact et la mortalité. Des études complémentaires permettraient peut-être de mieux comprendre le mode d'action de la toxine de *B. sphaericus* afin d'améliorer les formulations.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.,  
le 8 février 1982

## BIBLIOGRAPHIE

- DAGNOGO (M.) et COZ (J.), 1982. — Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus*. 1. Activité larvicide de *B. sphaericus* sur quelques espèces et souches de moustiques. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XX, n° 2 : 133-138.
- DAVIDSON (E. W.), 1979. — Ultrastructure of mid guts events in the pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SS 11-1 infection of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae. *Can. J. Microbiol.*, 25 : 178-184.
- MYERS (P.), YOSTEN (A. A.) and DAVIDSON (E. W.), 1979. — Comparative studies of mosquito larvae toxin of *Bacillus sphaericus* SS 11-1 and 1593. *Can. J. Microbiol.*, 25 : 1227-1231.
- O.M.S., 1979. — *Bacillus sphaericus*, strain 1593-4. Rap. miméogr. WHO/VBC — DS/79.09.