

**Étude comparative au laboratoire  
du devenir de la matière active  
et des spores de *Bacillus sphaericus*  
souche 2362  
et de *Bacillus thuringiensis* sérotype  
H 14 en milieu aqueux**

Said KARCH<sup>(1)</sup>, Jean-Marc HOUGARD<sup>(1)(2)</sup>

---

**Résumé**

*Une expérimentation menée au laboratoire avec deux suspensions concentrées de Bacillus sphaericus 2362 et de Bacillus thuringiensis H 14 a mis en évidence les faits suivants :*

- la matière active de Bacillus thuringiensis H 14 sédimente dans l'eau au bout de quelques heures, alors qu'elle reste en suspension avec Bacillus sphaericus ;*
- les spores des deux bactéries se dispersent de façon homogène et restent en suspension pendant toute la durée de l'expérimentation.*

*La plus grande persistance de la matière active de Bacillus sphaericus serait due à une localisation particulière des inclusions toxiques dans la spore qui ferait en quelque sorte office de flotteur.*

**Mots-clés :** *Bacillus sphaericus — Bacillus thuringiensis H 14 — Spores — Matière active — Sédimentation.*

---

**Summary**

COMPARATIVE STUDY IN THE LABORATORY OF THE BEHAVIOUR OF THE ACTIVE INGREDIENT AND SPORES OF *BACILLUS SPHAERICUS* 2362 AND *BACILLUS THURINGIENSIS* H 14 IN AQUEOUS MEDIUM. *Studies of both Bacillus sphaericus 2362 and Bacillus thuringiensis H 14 behaviour have been carried out under laboratory conditions. They showed :*

- the active ingredient of Bacillus thuringiensis H 14 settles in tap water after some hours while it remains in suspension with Bacillus sphaericus ;*
- the spores of both bacteria are homogeneously distributed in the whole volume of water during the experiment time.*

---

(1) ORSTOM, 70-74 route d'Aulnay, 93140 Bondy, France.

(2) Entomologiste médical ORSTOM.

*The relations between the toxin and the spores seem to be the main cause of the different persistence of Bacillus thuringiensis H 14 and Bacillus sphaericus. In the case of Bacillus thuringiensis H 14, crystals are not linked to the spores and they settle more rapidly than the latter, while, in the case of Bacillus sphaericus, the toxic agents are closely linked to the spore which would, then, be used as a kind of float.*

**Key words :** *Bacillus sphaericus* — *Bacillus thuringiensis* H 14 — Spores — Active ingredient — Sedimentation.

## Introduction

Évalués tant au laboratoire que sur le terrain, les deux agents entomopathogènes *Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis* H 14 font l'objet depuis ces dernières années de nombreuses investigations, particulièrement pour la lutte contre différentes espèces de moustiques.

Les multiples travaux concernant l'évaluation de ces deux bactéries montrent qu'elles possèdent une très bonne activité larvicide (de Barjac, 1979 ; Lacey *et al.*, 1984 ; Mulla *et al.*, 1984), mais que leur rémanence dans les conditions naturelles est très variable et liée essentiellement à un problème de sédimentation de la matière active (Guillet *et al.*, 1980 ; Sinègre *et al.*, 1981 ; Hougard *et al.*, 1985 ; Mulla *et al.*, 1984).

Ainsi dans des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus*, Hougard *et al.* (1983), ont montré que la rémanence d'une suspension concentrée de *Bacillus thuringiensis* H 14 (Teknar<sup>®</sup>) n'excède pas cinq jours alors qu'elle atteint cinq à six semaines avec une formulation similaire de *Bacillus sphaericus* 2362 (Nicolas *et al.*, 1985) dans les mêmes conditions d'expérimentation et à la même concentration.

C'est pourquoi nous avons entrepris quelques études de laboratoire, basées à la fois sur des études entomologiques et bactériologiques, afin de comparer en milieu aqueux le devenir des spores et de la matière active de ces deux bactéries.

## Matériel et méthodes

Les deux formulations utilisées dans cette étude sont des suspensions concentrées de *Bacillus thuringiensis* H 14 (Teknar<sup>®</sup>) et de *Bacillus sphaericus* souche 2362 (BSP1).

Nous avons déterminé tout d'abord par titrage biologique les DL 90 de chacun des deux produits conformément à la méthode préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S., 1985). L'efficacité larvicide de *Bacillus thuringiensis* H 14 est testée sur des stades 4 jeunes d'*Aedes aegypti* souche « Bora

Bora » et celle de *Bacillus sphaericus* sur des larves au même stade de *Culex pipiens* souche « Montpellier ».

Nous avons, dans un deuxième temps, rempli une éprouvette graduée de 40 cm de hauteur, d'1 litre d'eau permutée, à la surface de laquelle on répand 10 ml d'une suspension concentrée de *Bacillus sphaericus* préalablement diluée dans de l'eau.

On procède de la même manière avec une suspension concentrée de *Bacillus thuringiensis* H 14.

Des prélèvements d'eau sont pratiqués, à des temps différents après le traitement, en surface, au milieu et au fond des éprouvettes.

Ces échantillons font ensuite l'objet d'un test biologique pour évaluer leur activité larvicide sur les mêmes stades larvaires de *Culex pipiens* et d'*Aedes aegypti*, ainsi que d'un comptage des spores viables selon la technique suivante.

Après un bain-marie à 80° C pendant 12 minutes, tous les prélèvements examinés sont cultivés sur un milieu gélosé (gélose nutritive) pour *Bacillus thuringiensis* H 14 et sur le milieu MBS (Kalfon *et al.*, 1983) pour *Bacillus sphaericus*. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve à 35° C ; après 48 h d'incubation, la lecture est effectuée après identification des colonies de spores au microscope à contraste de phase.

## Résultats

### VOLET ENTOMOLOGIQUE

Les deux formulations de *Bacillus thuringiensis* H 14 et de *Bacillus sphaericus* 2362 possèdent chacune une très bonne efficacité respectivement sur *Aedes aegypti* et *Culex pipiens*. La DL 90 pour le Teknar est de l'ordre de 0,23 mg/l et de 0,14 mg/l pour le BSP1.

En terme de perte de toxicité, la sédimentation de la matière active des deux formulations semble s'opérer de façon tout à fait différente : la matière active du Teknar sédimente très rapidement par rap-

port au BSP1, si bien qu'après 12 heures une partie de la matière active du Teknar a déjà sédimenté et la quasi-totalité au bout de 24 heures ; en revanche, aucune sédimentation n'est décelée pour la formulation BSP1 de *Bacillus sphaericus* même après sept jours d'expérimentation (fig. 1).

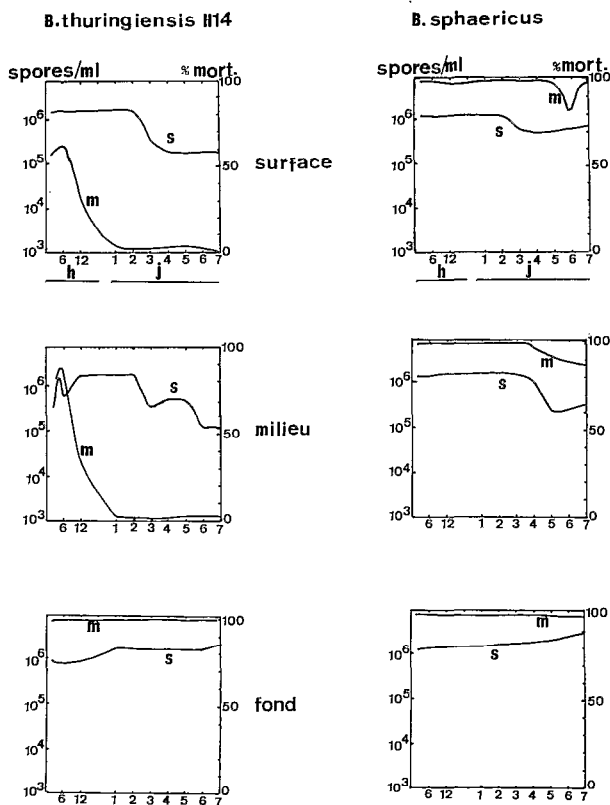


FIG. 1. — Sédimentation dans l'eau des spores (s) et de la matière active (m) de deux suspensions concentrées de *Bacillus thuringiensis* H 14 et de *Bacillus sphaericus*

#### VOLET BACTÉRIOLOGIQUE

La sédimentation des spores de *Bacillus thuringiensis* H 14 et de *Bacillus sphaericus* 2362 semble se dérouler de façon identique. Cependant, bien qu'une légère baisse du nombre des spores soit observée après 48 heures dans les deux cas, leur répartition dans l'eau reste homogène pendant toute la durée de l'étude (fig. 1).

#### Discussion

Si les résultats des analyses bactériologiques mettent en évidence une répartition homogène des spores de *Bacillus sphaericus* et de *Bacillus thuringiensis* H 14, il n'en est pas de même pour la matière active dont le comportement est tout à fait différent suivant la bactérie considérée : avec la formulation Teknar, la matière active sédimente au bout de quelques heures alors qu'elle persiste beaucoup plus longtemps dans le milieu avec la formulation BSP1.

Cette différence de rémanence entre ces deux bactéries semble liée essentiellement aux rapports existant entre la toxine et la spore et non à la formulation : dans le cas de *Bacillus thuringiensis* H 14 les cristaux ne sont pas liés aux spores (photo 1) et sédimentent plus rapidement que ces dernières, alors que dans le cas de *Bacillus sphaericus*, les facteurs toxiques sont étroitement associés à la spore (photo 2) qui ferait en quelque sorte office de flotteur, car moins dense que la toxine.

#### Conclusion

Cette expérimentation a permis de mettre en évidence au laboratoire une différence dans la sédimentation des facteurs toxiques entre *Bacillus thuringiensis* H 14 et *Bacillus sphaericus*, liée semble-t-il à la nature des relations existant entre les spores et les cristaux de chacune des bactéries.

Ces résultats confirment par conséquent ceux obtenus sur le terrain avec les mêmes formulations dans des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus*.

Dans le cas de *Bacillus thuringiensis* H 14, la réapparition de la population préimaginale dans le gîte serait liée essentiellement à une sédimentation de la matière active en dehors de la zone de nutrition des larves et non à une perte de toxicité de l'endotoxine bactérienne.

Dans le cas de *Bacillus sphaericus*, les résultats obtenus révèlent l'importance du maintien de la matière active dans la zone de nutrition des larves, à condition toutefois que le complexe spore-toxine ne soit pas dégradé par les diverses conditions physico-chimiques régnant dans les gîtes larvaires (Karch *et al.*, 1986).

Ce phénomène de flottabilité de la matière active devrait être pris en considération par l'industrie afin qu'elle oriente ses recherches vers des formulations mieux adaptées à chaque type de biotope.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 3 juin 1986



PHOTO 1. — Spores (s) et cristaux libres (c) de *Bacillus thuringiensis* H 14 après lyse du sporange (microscopie électronique à transmission ; cliché J.-F. Charles, Institut Pasteur, Paris). Le trait représente 0,5  $\mu$ m

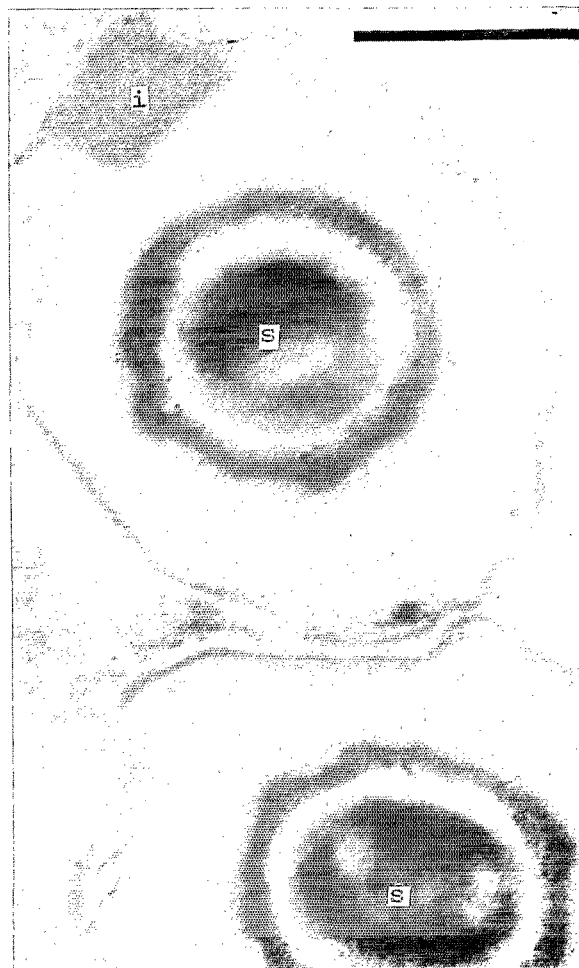


PHOTO 2. — Spores (s) de *Bacillus sphaericus* souche 2362, montrant l'inclusion toxique (i) dans la paroi de l'exosporium de la spore (microscopie électronique à transmission ; cliché J.-F. Charles). Le trait représente 0,5  $\mu$ m

#### BIBLIOGRAPHIE

- BARJAC (H. de), 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. mimeo. OMS, WHO/VBC/79.741.
- GUILLET (P.), DEMPAN (J.) et COZ (J.), 1980. — Évaluation de *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14 de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. III. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale. Doc. mimeo. OMS, WHO/VBC/80.756.
- HOUGARD (J.-M.), DARRIET (F.) et BAKAYOKO (S.), 1983. — Évaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14 sur *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 et *Anopheles gambiae* Giles, 1902 s.l. (Diptera : Culicidae) en Afrique de l'Ouest. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 21, 2 : 111-117.
- HOUGARD (J.-M.), KOHOUN (G.), GUILLET (P.), DOANNIO (J.), DUVAL (J.) et ESCAFFRE (H.), 1985. — Évaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 souche 1593-4 dans des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus*

- Say, 1823 en Afrique de l'Ouest. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 23, 1 : 35-44.
- KALFON (A.), LARGET-THIÉRY (I.), CHARLES (J.-F.) et BARJAC (H. de), 1983. — Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18 : 168-173.
- KARCH (S.), COZ (J.), JULLIEN (J.-L.), VIGO (G.), et SINÈGRE (G.), 1986. — Viabilité et persistance des spores de *Bacillus sphaericus* dans divers milieux aquatiques. IV<sup>e</sup> Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical, Marseille, 2-4 juillet 1986.
- LACEY (L. A.), URBINA (M. J.) et MEITZMAN (C. M.), 1984. — Sustained release formulations of *Bacillus thuringiensis* (H 14) for Control of container-breeding *Culex quinquefasciatus*. *Mosq. News.*, 44, 1 : 26-32.
- MULLA (M. S.), DARWAZEH (H. A.), DAVIDSON (E. W.), DULMAGE (H. T.) et SINGEK (S.), 1984. — Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to non-target organisms. *Mosq. News*, 44, 3 : 336-342.
- NICOLAS (L.), HOUGARD (J.-M.), DOSSOU-YOVO (J.), DOANIO (J. M. C.), DUVAL (J.) et ESCAFFRE (H.), 1985. — Persistence et recyclage de *Bacillus sphaericus* 2362 dans les gîtes urbains à *Culex quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest. Doc. multigr. OCCGE, n° 24/IPR/Rap/85, 12 p.
- O.M.S., 1985. — Informed consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide, Genève, 7-11 octobre 1985.
- SINÈGRE (G.), GAVEN (B.) et JULLIEN (J.-L.), 1981. — Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. III. Influence séparée ou conjointe de la densité larvaire, du volume ou profondeur de l'eau et de la présence de terre sur l'efficacité et l'action larvicide résiduelle d'une poudre primaire. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 19, 3 : 157-163.