

Effet des conditions de stockage sur la relation viabilité des spores - toxicité des poudres primaires de *Bacillus sphaericus* et de *B. thuringiensis* H-14

Saïd KARCH ⁽¹⁾

Résumé

La stabilité des poudres de Bacillus sphaericus à température élevée (50 °C) varie en fonction de la souche. La poudre de la souche 1593-4 est beaucoup plus stable que celle de la souche 2297. La toxicité et la viabilité des spores de cette dernière diminuent progressivement sous l'action de la chaleur. La poudre IPS 82 de Bacillus thuringiensis H-14 a été stable pendant les neuf mois de stockage à la même température.

Mots-clés : *Bacillus sphaericus* - *Bacillus thuringiensis* H-14 - Thermostabilité - Viabilité - Activité larvicide.

Summary

RELATIONSHIP BETWEEN SPORE VIABILITY AND TOXICITY OF PRIMARY POWDERS FROM *BACILLUS SPHAERICUS* AND *B. THURINGIENSIS* H-14 UNDER STORAGE CONDITIONS. *Three primary powders based on Bacillus sphaericus strains 1593-4 and 2297 and Bacillus thuringiensis H-14 were stored at 50 °C and bioassayed for larvicidal activity against Culex pipiens and Aedes aegypti larvae. The stability of Bacillus sphaericus powders stored at high temperature (50 °C) depends upon the strain. The 1593-4 strain is much more stable than that of the 2297. The toxicity and viability of spores of the strain 2297 decrease gradually with the heat. The IPS 82 of Bacillus thuringiensis H-14 was stable during the nine months period of storage at the same temperature.*

Key words : *Bacillus sphaericus* - *Bacillus thuringiensis* H-14 - Thermostability - Viability - Larvicidal activity.

Introduction

Bacillus sphaericus et *Bacillus thuringiensis* H-14, deux bactéries entomopathogènes, sont actuellement très prometteuses pour la lutte contre les moustiques et les simules. La stabilité de leurs toxines est influencée par plusieurs facteurs parmi lesquels les rayons solaires qui

réduisent l'activité larvicide et la viabilité des spores (Mulligan *et al.*, 1980 ; Ignoffo *et al.*, 1981 ; Karch *et al.*, 1986). D'autre part, Wraight *et al.* (1987) ont noté que les basses températures peuvent faire baisser la mortalité en diminuant ou empêchant l'ingestion de la bactérie par les larves des moustiques. Lacey et Smittle (1985) ont observé

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

une diminution de la viabilité de spores de *B. sphaericus* et *B. thuringiensis* H-14 et une perte d'activité larvicide de *B. thuringiensis* H-14 après irradiation aux rayons gamma. Ces différents résultats mettent en évidence le rôle non négligeable de la température, car dans certaines régions chaudes comme en Afrique, la matière active des deux bactéries peut être soumise à des températures élevées. Dans le but d'en évaluer l'influence, nous avons entrepris une étude basée sur l'analyse bactériologique et l'activité larvicide de trois souches de *B. sphaericus* et de *B. thuringiensis* H-14.

Matériels et méthodes

LE STOCKAGE

Deux souches de *B. sphaericus* 2297 (poudre SPH 84) et 1593-4 (poudre RB 80), ainsi que la poudre IPS 82 de *B. thuringiensis* H-14, produites par l'Institut Pasteur - Paris, sont conditionnées en flacons (100 mg/flacon) stockés dans une étude à température élevée (50 °C). Deux flacons de chaque poudre ont été prélevés mensuellement, placés ensuite dans un réfrigérateur à + 4 °C jusqu'à l'exécution des tests de viabilité et de toxicité des spores.

TESTS SUR L'ACTIVITÉ LARVICIDE

Des essais biologiques sont effectués afin de déterminer les DL 50 et DL 90 de chacune des poudres conformément à la méthode préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S., 1985). L'activité larvicide de deux souches 2297 et 1593-4 de *B. sphaericus* est testée sur des larves de stade IV jeune de *Culex pipiens*, et celle de *B. thuringiensis* H-14 sur des larves d'*Aedes aegypti* du même stade.

TESTS SUR LA VIABILITÉ DES SPORES

Le nombre de spores viables dans les poudres a été déterminé en employant la technique suivante : une série de dilutions s'étendant de 10^{-1} à 10^{-10} , selon le cas, est réalisée à partir d'une suspension à 10 mg/l de poudre primaire. Après un choc thermique à 80 °C pendant 12 minutes, 0,1 ml des dilutions est étalé dans des boîtes de Pétri, contenant un milieu de culture M.B.S. (Kalfon *et al.*, 1983) dans le cas de *B. sphaericus*, et un milieu de gélose nutritif (Institut Pasteur-Production) dans le cas de *B. thuringiensis* H-14. Après ensemencement, les boîtes sont placées dans une étuve à 35 °C. Au bout de 48 h, les colonies issues des spores viables se sont développées ; elles sont alors dénombrées.

Résultats

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA VIABILITÉ DES SPORES

Les résultats des analyses bactériologiques sur la viabilité des spores sont présentés sous forme d'histogrammes (fig. 1).

Dans le cas de la souche 2297, les spores ont rapidement perdu leur viabilité : le nombre de spores viables par mg, de l'ordre de $4,9 \times 10^8$ au départ de l'expérience, tombe à $7,2 \times 10^2$ spores/mg après six mois de stockage à 50 °C ; la décroissance est régulière et de type exponentiel.

La viabilité des spores de la souche 1593-4 de *B. sphaericus* et de celles de *B. thuringiensis* H-14 est plus stable pendant neuf mois, avec toutefois une légère baisse au début de l'expérience.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA TOXICITÉ DES SPORES

Une chute d'activité larvicide de la souche 2297 en fonction du temps a été observée : après un mois de stockage à 50 °C, la CL 50 était de l'ordre de 0,02 mg/l, alors qu'après neuf mois elle s'élève à 0,35 mg/l. En revanche, l'activité larvicide de la matière active de la souche 1593-4 de *B. sphaericus* (spores) et celle de *B. thuringiensis* H-14 (cristaux) a été quasiment stable tout au long de la durée du stockage à 50 °C.

Discussion-Conclusion

La résistance des spores de *B. sphaericus* aux températures élevées varie d'une souche à l'autre. Les spores de la souche 1593-4 sont beaucoup plus résistantes à la chaleur que celles de la souche 2297. Il semble qu'il y ait un lien étroit entre la viabilité et la toxicité des spores, car plus la viabilité baisse, plus la toxicité diminue. Quant à *B. thuringiensis* H-14, la matière active (cristaux) ainsi que les spores ont été quasiment stables pendant toute la période du stockage, contrairement aux résultats de Ignoffo *et al.* (1982) qui ont observé une baisse de l'efficacité et de la viabilité d'une poudre formulée de *B. thuringiensis* H-14 (ABG 6108) à la température de 50 °C.

Balaraman et Hoti (1984) ont constaté une diminution de l'activité larvicide de la souche H5 a et b de *B. sphaericus* après un stockage de 30 semaines à 30 °C, mais pas de celle de *B. thuringiensis* H-14 dans les mêmes conditions. Nos résultats vont dans le même sens de ceux de Bourgoin *et al.* (1984) montrant une légère diminution d'efficacité de la poudre RB 80 de la souche 1593, après

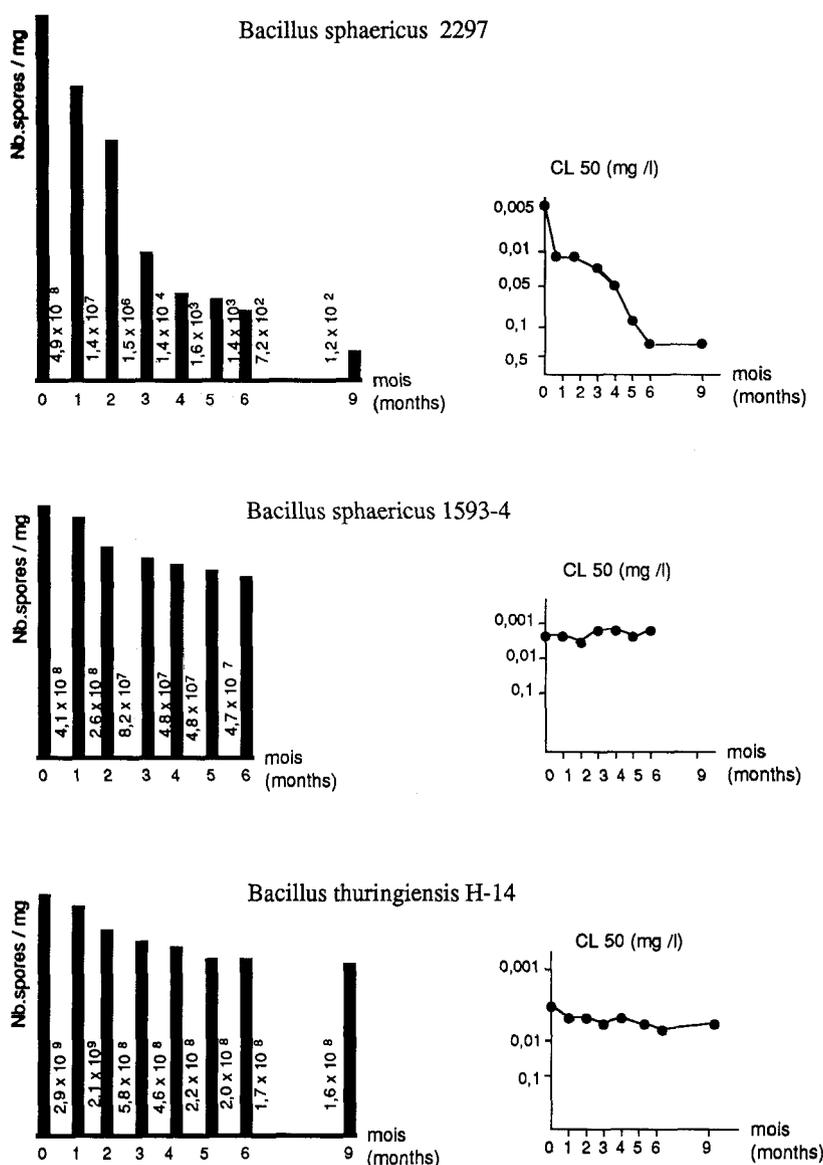


FIG. 1. — Viabilité des spores et stabilité de l'activité larvicide à la température de 50 °C de trois souches appartenant à deux bactéries : *B. sphaericus* et *B. thuringiensis* H-14.

+ : Les histogrammes sont en échelle logarithmique.

Viability of spores and stability of larvicidal activity of three powders of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 stored at a high temperature 50 °C.

+ : Histograms on logarithmic scale.

un stockage de quatre semaines à 50 °C.

La stabilité des toxines des deux bactéries est apparemment liée à l'ultrastructure des spores ou à la nature de la toxine. En fait, comme le ou les composants cristallins (inclusions) sont les plus toxiques chez *B. sphaericus*

(Yousten et Davidson, 1982 ; de Barjac et Charles, 1983 ; Payne et Davidson, 1984), il semble que l'action de la chaleur ne modifie pas les composants toxiques mais détruit une certaine quantité de spores. Pour *B. thuringiensis* H-14 dont les cristaux seuls contiennent la matière active

TABLEAU I

Toxicité de trois poudres stockées à 50 °C dont deux de *B. sphaericus* testées sur des larves stade 4 jeune de *Culex pipiens* et la troisième de *B. thuringiensis* H-14 testée sur larves d'*Aedes aegypti* du même stade
 + : (CL 50) concentration létale exprimée en mg/l
 Toxicity of three powders of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 stored at 50 °C. Two powders were bioassayed against early 4th instar *Culex pipiens* larvae and the third one of *B. thuringiensis* H-14 was bioassayed against the same instar of *Aedes aegypti*
 + : (CL 50) lethal concentration mg/l

période de stockage/mois period of storage/months	<i>B. sphaericus</i> souche 2297 strain 2297		<i>B. sphaericus</i> souche 1593-4 strain 1593-4		<i>B. thuringiensis</i> H-14	
	(+) CL 50	CL 90	CL 50	CL 90	CL 50	CL 90
0	0,004	0,017	0,007	0,015	0,001	0,040
1	0,020	0,026	0,007	0,021	0,004	0,027
2	0,015	0,188	0,007	0,018	0,004	0,046
3	0,030	1,470	0,009	0,037	0,005	0,036
4	0,047	0,860	0,009	0,088	0,003	0,023
5	0,120	2,450	0,008	0,027	0,004	0,028
6	0,330	2,600	0,008	0,014	0,006	0,031
9	0,350	10,82	-	-	0,002	0,028

(Karch et Hougard, 1986), les spores sont inactives ; ces deux composants sont relativement stables à 50 °C durant neuf mois.

Dans les pays tropicaux, sur le terrain ou sans abri, la poudre primaire de *B. thuringiensis* H-14 a été stable après trois mois de stockage (Guillet *et al.*, 1980). Pour *B. sphaericus*, il semble que la stabilité dépend de la souche et que la souche 1593-4 paraît être aussi stable que celle de *B. thuringiensis* H-14. En revanche, la souche 2297 ne l'est pas et cela devra être pris en compte dans le choix des souches pour le développement des formulations

et leur utilisation en milieu tropical où la température peut atteindre dans certaines régions 50 °C.

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le professeur Jean Coz, Directeur du Laboratoire d'Entomologie médicale de l'ORSTOM à Bondy, pour sa direction scientifique et ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail. Je tiens à remercier également Madame Nicole Monteny pour son aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 15 janvier 1988.

BIBLIOGRAPHIE

- BARJAC (H. de) et CHARLES (J.F.), 1983. — Une nouvelle toxine active sur les moustiques, présente dans des inclusions cristallines produites par *Bacillus sphaericus*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 296, 3 : 905-910.
- BALARAMAN (K.) et HOTI (S.L.), 1984. — Impact of storage period and temperature on the larvicidal activity of bacterial pesticide formulations. *Indian. J. Med. Res.*, 80, July 1984 : 71-73.
- BOURGOIN (C.), LARGET-THIERY (I.) et BARJAC (H. de), 1984. — Efficacy of dry powders from *Bacillus sphaericus* : RB 80, a potent reference preparation for biological control. *J. Invert. Path.*, 44 : 146-150.
- 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. WHO/VBC/80. 756, 9 p.
- IGNOFFO (C.M.), GARCIA (C.), KROHA (M.), FUKUDA (T.) et COUCH (T.L.), 1981. — Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* H-14 for use against mosquito. *Mosq. News*, 41 : 85-93.
- IGNOFFO (C.M.), GARCIA (C.), KROHA (M.) et COUCH (T.L.), 1982. — High-temperature sensitivity of formulations of *Bacil-*

- lus thuringiensis* H-14. *Environ. Entomol.*, 11, 2 : 409-411.
- KALFON (A.), LARGET-THIERY (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 SINEGRE (G.), 1986. — Viabilité et persistance des spores de *Bacillus sphaericus* dans divers milieux aquatiques. VI^e Congrès sur la protection de la Santé Humaine et des Cultures en Milieu Tropical - Marseille, 2-4 juillet 1986, 374-379.
- KARCH (S.) et HOUGARD (J.M.), 1986. — Étude comparative au laboratoire du devenir de la matière active et des spores de *Bacillus sphaericus* 2362 et de *Bacillus thuringiensis* H-14 en milieux aqueux. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 24, 3 : 175-179.
- LACEY (L.A.) et SMITTLE (B.J.), 1985. — The effects of gamma radiation on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14. *Bull. Soc. Vector. Ecol.*, 10, 2 : 98-101.
- MULLIGAN (F.S.), SCHAEFER (C.H.) et WILDER (W.H.), 1980. — Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. *J. Econ. Ent.*, 73 : 684-688.
- O.M.S., 1985. — Informed consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Genève, 7-11 octobre 1985.
- PAYNE (J.M.) et DAVIDSON (E.W.), 1984. — Insecticidal activity of the crystalline parasporal inclusion and other components of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. *J. Pathol.*, 43 : 383-388.
- WRAIGHT (S.P.), MOLLOY (D.P.) et SINGER (S.), 1987. — Studies on the culicine mosquito host range of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 with notes on the effects of temperature and instar on bacterial efficacy. *J. Invert. Path.*, 49 : 291-302.
- YOUSTEN (A.A.) et DAVIDSON (E.W.), 1982. — Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals formed by *Bacillus sphaericus* 2297. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 6 : 1449-1455.