

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

II — Influence de la température, du chlore résiduel, du pH et de la profondeur de l'eau sur l'activité biologique d'une poudre primaire ⁽¹⁾

Gilbert SINÈGRE ⁽²⁾
Bruno GAVEN ⁽²⁾
Gérard VIGO ⁽²⁾

Résumé

Des tests de laboratoire ont été réalisés avec l'endotoxine delta du sérotype H-14 de B. thuringiensis pour étudier l'influence de différents facteurs sur la sensibilité des larves au 4^e stade jeune de Culex pipiens et d'Aedes aegypti.

Entre 19 et 33°C, la mortalité larvaire n'était pas influencée par la température. Il existe une corrélation positive en dehors de ces limites.

La présence de chlore libre dans l'eau inhibe ou détruit l'endotoxine.

Il pourrait exister une corrélation légère entre pH et efficacité de l'endotoxine entre pH5 et pH7.

La forme des récipients et la profondeur de l'eau, dans les limites de l'expérience (superficie du fond comprise entre 28 et 227 cm²) n'influençaient pas l'efficacité de l'endotoxine. Ces conclusions ne s'appliquent que si le volume de poudre primaire reste constant.

Dans les conditions opérationnelles, les dosages de formulations devraient probablement être calculés sur la base de surface et non de volume d'eau.

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*. II — INFLUENCE OF TEMPERATURE, FREE CHLORINE, PH AND WATER DEPTH ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF PRIMARY POWDER

The authors have investigated the influence of temperature, pH, free chlorine, water depth and shape of the container on the susceptibility of mosquito larvae to the delta endotoxin of the serotype H-14 of B. thuringiensis. The source of endotoxin used was the primary powder R.153.78 produced experimentally by the Laboratory R. Bel-

(1) Cette étude a bénéficié d'une aide financière du programme spécial PNUD — 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.

lon. All bioassays were carried with young 4th instar larvae of *Culex pipiens* or *Aedes aegypti* with four batches of 25 larvae per concentration and parameter under investigation. Mortality readings were made after a 24-hour exposure to the endotoxin.

There is probably a positive correlation between water temperature and the efficacy of the endotoxin. However this correlation is only obvious below 19°C and above 33°C. Within the range 19 to 33°C the larval mortality was not influenced by the temperature.

Free chlorine either inhibits or destroys the endotoxin. There was a very clear inverse correlation between water free chlorine and endotoxin effectiveness. This should be taken into account whenever bioassays are carried out with tap water.

There might be a slight correlation between pH and endotoxin effectiveness within the pH range 5 to 7. However full regression lines were not obtained and results are considered as inconclusive. Should such a correlation exist it would be a very slight one.

Container shape and water depth, within the limits of the experiment (container bottom surface comprised between 28 and 227 cm² — water depth comprised between 0,5 and 7 cm), did not influence the endotoxin effectiveness. It is however pointed that these conclusions apply only when the volume of primary powder suspension is kept constant and larvae of *Ae. aegypti* or *Cx. pipiens* are used as target insects; the situation might be different should the volume of suspension be modified and or a surface-feeding species, such as *Anopheles* sp. be used instead of *Culex* or *Aedes*.

The authors emphasize that, under operational conditions, dosages of the formulations derived from the serotype H-14 of *B. thuringiensis* should probably be applied on an area basis and not on a water volume basis. They also underline that this material might be of limited effectiveness against species of mosquitoes breeding in very cold water.

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

1. INTRODUCTION

La première partie de notre étude sur l'amélioration continue de la normalisation des épreuves biologiques destinées à déterminer la teneur en matière active des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H-14 de *B. thuringiensis* avait porté sur la stabilité des suspensions d'épreuve et la détection d'éventuels contaminants chimiques (Sinègre, 1980 et 1981). Cette seconde partie a été consacrée à la détermination de l'influence d'un certain nombre de paramètres physicochimiques courants sur l'activité biologique d'une poudre primaire de cet agent.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

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. Les concentrations d'épreuve ont été préparées par dilutions successives juste avant l'exé-

cution des essais, comme recommandé par le Groupe de Travail scientifique pour la Lutte biologique contre les Vecteurs du Programme spécial de Recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales (OMS-1979). Toutes ces opérations ont été effectuées avec de l'eau distillée. Des ingrédients complémentaires ont été ajoutés juste avant l'exécution des essais pour les études sur l'influence du chlore libre et du pH.

Les épreuves elles-mêmes ont comporté la mise en exposition, pour chaque concentration de matière active et condition de milieu, de quatre lots de 25 larves 4^e stade jeune de *Culex pipiens* ou d'*Aedes aegypti* dans 200 ml de liquide. La lecture de la mortalité a été faite après 24 heures de contact.

2.1. Influence de la température

Pour cette étude les épreuves ont été effectuées à 17 températures régulièrement espacées entre 7 et 39°C. La régulation thermique a été assurée, à $\pm 0,2^\circ\text{C}$, par une cellule climatique éclairée 12 heures par jour par des tubes fluorescents ayant un spectre comparable à celui de la lumière solaire.

Les récipients d'épreuve, jamais réutilisés, sont

remplis d'eau, reçoivent les larves de moustiques, et sont placés dans la cellule climatique quatre heures avant l'introduction des suspensions de poudre primaire. L'eau et les larves sont ainsi portées à la température de l'essai avant que celui-ci ne commence. Après 24 heures de contact avec les suspensions du larvicide bactérien, les larves sont transférées pendant 15 minutes dans de l'eau pure à 25°C. Ce transfert permet une lecture de mortalité dans des conditions identiques pour toutes les épreuves.

2.2. Influence du chlore libre

Pour cette étude, les épreuves ont été effectuées avec cinq séries de récipients contenant soit de l'eau distillée, soit de l'eau additionnée d'une solution d'hypochlorite de sodium de façon à assurer des concentrations de chlore libre de respectivement 0,05 — 0,10 — 0,46 et 0,75 mg/litre. Les suspensions de poudre primaire ont été introduites juste avant l'hypochlorite de sodium, et les larves de moustiques quelques minutes après. Le chlore libre a été dosé par colorimétrie au moment de l'introduction des larves d'*Ae. aegypti*.

2.3. Influence du pH de l'eau

Pour cette étude, les épreuves ont été effectuées avec l'eau du réseau de distribution de la ville de Montpellier aérée pendant plusieurs heures pour éliminer les traces éventuelles de chlore résiduel. L'équilibre ionique des différents lots d'eau a été modifié, sous contrôle d'un pH-mètre, par addition de petits volumes d'acide chlorhydrique pour les pH bas et d'une solution de soude N/5 pour les pH élevés, de manière à obtenir juste avant l'introduction des suspensions de poudre primaire et des larves de moustiques une gamme pH 5 — pH 6 — pH 7 — pH 8 et pH 9. Dans le cas des lots à pH 9, l'eau a dû être filtrée après addition de la soude pour éliminer un précipité de bicarbonates. La résistivité des lots d'eau ainsi préparés a été mesurée en début d'épreuve et le pH contrôlé en fin d'épreuve. Toutes les épreuves ont été effectuées à la concentration unique de 0,1 mg de poudre primaire par litre avec *Ae. aegypti* comme insecte cible.

2.4. Influence de la profondeur d'eau et de la forme des récipients

Pour cette étude, quatre séries d'épreuves ont été effectuées dans des béciers de 6 et 7 cm de dia-

mètre à la base et des cristallisoirs de 12 et 17 cm de diamètre correspondant pour un volume de 200 ml à des profondeurs d'eau respectivement de l'ordre de 7 cm, 5 cm, 1 cm et 0,5 cm. Les concentrations de poudre primaire utilisées ont été de 0,025 — 0,05 et 0,10 mg/l et l'insecte-cible *Cx. pipiens*.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Influence de la température

Les résultats des épreuves, résumés dans le tableau I, montrent que les concentrations létales 50 % et 90 % mesurées lors de cette étude sont pratiquement les mêmes entre 19 et 33°C, alors qu'elles diminuent au-dessus de 33°C et augmentent en-dessous de 19°C. On ne peut exclure la possibilité qu'une analyse statistique mette en évidence une très légère corrélation positive entre la température et l'efficacité biologique de l'endotoxine delta du sérotype H-14 de *B. thuringiensis* à l'intérieur de la gamme de températures 19-33°C. Si elle existait, cette corrélation serait cependant d'un ordre de grandeur négligeable par rapport à la variabilité intrinsèque des larves de moustiques elles-mêmes dans leur réponse à l'exposition à l'endotoxine.

L'épreuve effectuée à 39°C a donné des résultats inutilisables du fait d'une mortalité témoin très élevée. Les résultats obtenus entre 7° et 17° d'une part, et 35° et 37° d'autre part, confirment les observations préliminaires antérieures (Sinègre *et al.*, 1979c) montrant une faible activité de l'endotoxine aux basses températures et les complètent en montrant une activité accrue aux températures élevées.

On peut conclure qu'en pratique, dans les conditions habituelles d'un laboratoire d'entomologie, les résultats des épreuves de sensibilité à l'endotoxine sont indépendants de la température. On ne doit cependant pas extrapoler ces observations aux évaluations du sérotype H-14 de *B. thuringiensis* faites sur le terrain car les larves des espèces de moustiques se développant à très basse température présentent fréquemment une diminution du métabolisme, voire une diapause larvaire, sans commune mesure avec la diminution de l'activité métabolique entraînée par l'exposition temporaire des larves d'*Ae. aegypti* à des températures de 7° et 9°C. On peut donc s'attendre à une faible

TABLEAU I

Influence de la température des eaux, en degré Celsius, sur l'efficacité de l'endotoxine de *B. thuringiensis* H-14 vis-à-vis des larves stade 4 jeune d'*Ae. aegypti*. Concentrations d'endotoxine exprimées en mg de poudre primaire R.153.78 par litre. Résultats exprimés en pourcentages de mortalité. (*) : mortalité corrigée

Concentrations d'endotoxine	Température		Température														
	7°	9°	11°	13°	15°	17°	19°	21°	23°	25°	27°	29°	31°	33°	35°	37°	39°
Témoin	0	0	4	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	10	88
0,1	0	17	—	—	—	—	—	1	0	3	0	—	0	0	2	0*	91
0,2	0	28	1	3	1	0	7	2	4	8	1	4	0	19	3	0*	98
0,4	5	41	14	38	11	20	29	29	37	42	16	32	31	33	54	38*	98
0,8	15	62	69	89	71	60	87	89	93	91	77	89	85	89	86	100	100
1,6	13	70	92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	—
3,2	26	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CL50 mg/l	?	0,5	0,09	0,05	0,08	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05*	Invalide
CL90 mg/l	?	4 extra- polé	0,18	0,1	0,14	0,12	0,1	0,1	0,1	0,1	0,12	0,1	0,1	0,1	0,09	0,07*	Invalide

efficacité opérationnelle des formulations de cet agent vis-à-vis des moustiques se développant dans les eaux très froides.

3.2. Influence du chlore libre

Les résultats de l'étude, résumés dans le tableau II, montrent une corrélation négative très

TABLEAU II

Influence de différentes concentrations en chlore libre sur l'efficacité de l'endotoxine de *B. thuringiensis* H-14 vis-à-vis des larves au 4^e stade jeune de *Cx. pipiens*. Concentrations d'endotoxine exprimées en mg de poudre primaire R.153.78 par litre.

Résultats exprimés en pourcentage de mortalité (la mortalité témoin fut nulle).

Concentrations d'endotoxine	Chlore, en mg/litre				
	0,05	0,1	0,46	0,75	1
0,025	14	6	0	0	0
0,05	34	32	4	0	0
0,1	96	90	20	2	0
0,2	100	98	58	10	2

marquée entre la teneur en chlore libre et l'efficacité de l'endotoxine. Cette influence du chlore libre, pressentie lors d'études antérieures (Sinègre *et al.*, 1979d) est probablement due à une destruction de l'endotoxine. Une action similaire était déjà connue vis-à-vis de certains insecticides organophosphorés, notamment le fenthion (Metcalf *et al.*, 1963 — Mouchet *et al.*, 1972) et le temephos (Sinègre *et al.*, en préparation). Il faut donc, lors de l'exécution d'épreuves avec l'eau des circuits de distribution urbaine, s'assurer que cette eau ne contient pas de chlore (ou d'agent oxydant similaire) ou bien éliminer ce chlore avant d'utiliser l'eau.

3.3. Influence du pH de l'eau

Les résultats des épreuves, résumés dans le tableau III, semblent indiquer pour la gamme de pH utilisée une corrélation positive entre le pH et d'efficacité de l'endotoxine. Ils montrent aussi une augmentation sensible du pH au cours des 24 heures de l'épreuve. Il nous semble cependant prématuré de conclure au vu de ces seuls résultats car d'autres facteurs, et notamment l'action chimique directe des ions chlore et sodium, pourrait avoir joué un rôle. Cette étude devrait être reprise avec des gammes complètes de concentration et d'autres

procédés de modification du pH. On doit d'ailleurs signaler que Garcia et Desrochers (1979) n'ont observé aucune corrélation entre le pH des eaux de trous d'arbres et l'efficacité du sérotype H14 de *B. thuringiensis* vis-à-vis d'*Ae. sierrensis* dans ces mêmes eaux.

TABLEAU III

Influence du pH de l'eau sur l'efficacité de l'endotoxine de *B. thuringiensis* H-14 vis-à-vis des larves au stade 4 jeune d'*Ae. aegypti* pour concentration d'endotoxine équivalant à 0,1 mg de poudre primaire R.153.78 par litre (la mortalité témoin fut nulle).

pH en début d'essai	pH en fin d'essai	Résistivité en début d'essai $\Omega/cm^2/cm$	Mortalité %
5,0	6,1	1 460	70
6,0	7,4	1 600	92
7,0	8,2	1 640	98
8,0	8,1	1 800	98
9,0	8,6	2 240	100

3.4. Influence de la profondeur d'eau et de la forme des récipients

Les résultats de l'étude, résumés dans le tableau IV, montrent que l'action de la poudre primaire n'est pas influencée par la profondeur d'eau dans les récipients d'épreuve, à l'intérieur de la gamme utilisée. Cette profondeur d'eau pourrait cependant influencer de deux façons l'action de l'endotoxine, d'une part en la mettant

hors de portée de l'insecte-cible lorsque la formulation utilisée sédimente rapidement, d'autre part en diminuant la concentration de matière active par unité de surface au fond des récipients d'épreuve en-dessous de la concentration permettant aux larves de s'intoxiquer.

La sédimentation joue certainement un rôle important pour modifier la distribution de la matière active dans la masse d'eau comme l'ont montré Guillet *et al.* (1980). L'emploi d'insectes-cibles se nourrissant en brossant les parois et le fond des récipients d'épreuve diminue cependant considérablement l'influence pratique de la sédimentation. Il pourrait en être tout autrement si l'on effectuait les épreuves avec des larves d'*Anopheles* qui se nourrissent de façon préférentielle à la surface de l'eau. Le facteur sédimentation garde par ailleurs toute son importance sur le terrain, une sédimentation rapide de la matière active la mettant généralement hors de portée des larves de moustiques.

La diminution de concentration de la matière active par unité de surface aurait pu avoir une plus grande importance. Ces concentrations étaient respectivement dans notre étude de 8,8 — 6,5 — 2,2 et 1,1 mg de poudre primaire par mètre carré, en supposant une sédimentation totale. Ce facteur ne paraît pas avoir influencé les résultats. On doit d'ailleurs noter que profondeur d'eau et densité de matière active par unité de surface variant dans des directions opposées leurs effets s'annulent probablement dans une large mesure lorsque l'espèce d'insecte-cible est convenablement choisie.

Bien que nos observations amènent à conclure à une influence faible ou nulle de la profondeur d'eau et de la forme des récipients d'épreuve sur

TABLEAU IV

Influence du diamètre des récipients d'épreuve sur l'efficacité de l'endotoxine de *Bacillus thuringiensis* H-14 vis-à-vis des larves au 4^e stade jeune de *Cx. pipiens*. Concentration d'endotoxine exprimée en mg de poudre primaire R.153.78 par litre. Mortalité exprimée en pourcentage (extrêmes observés lors des épreuves individuelles indiqués entre parenthèses).

Concentrations d'endotoxine	Type de récipient et diamètre au fond			
	Bécher \varnothing 6 cm	Bécher \varnothing 7 cm	Cristallisoir \varnothing 12 cm	Cristallisoir \varnothing 17 cm
0,025	37 (40-34)	42 (46-38)	37 (46-28)	30 (36-24)
0,05	75 (78-72)	76 (78-74)	70 (74-66)	76 (74-78)
0,1	93 (96-90)	99 (100-98)	95 (96-94)	99 (98-100)

les résultats des épreuves de sensibilité, nous tenons à souligner que l'expérimentation a été faite avec un volume constant, donc avec une quantité d'endotoxine par larve d'insecte-cible constante pour une concentration donnée. Comme nous le verrons dans la troisième partie de cette étude, les conclusions ne seraient plus les mêmes si le volume de suspension insecticide était modifié, comme l'ont noté de Barjac et Larget (1979). Nous pensons aussi devoir souligner que, sur le terrain, la notion de quantité de matière active par unité de surface traitée pourrait être plus importante que celle de concentration de matière active par unité de volume traité.

4. CONCLUSIONS

Nos observations montrent que, parmi les quatre paramètres physico-chimiques étudiés, le seul extrêmement important est la teneur en chlore libre de l'eau utilisée pour les épreuves. Le pH de

l'eau joue peut-être un rôle mais nos résultats ne permettent pas de conclure de façon certaine. La profondeur d'eau et la forme des récipients utilisés pour les épreuves, de même que la température, semblent n'influencer que de façon négligeable ou nulle l'action de l'endotoxine sur les larves d'*Ae. aegypti* et de *Cx. pipiens*. On peut donc escompter que dans ces domaines la normalisation des épreuves de détermination de la sensibilité des larves d'*Ae. aegypti* et de *Cx. pipiens* aux formulations expérimentales et industrielles dérivées du sérotype H-14 de *B. thuringiensis* ne posera pas plus de problèmes qu'il n'en fut rencontrés et résolus lors de la mise au point des épreuves de détermination de la sensibilité aux insecticides conventionnels.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux personnels de l'EID ayant facilité l'exécution de cette étude par leurs contributions techniques. Nous souhaitons remercier tout particulièrement M^{lle} O. Moussié, traductrice-documentaliste, pour son aide précieuse, et même indispensable, lors de la recherche des informations utilisées dans notre étude.

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

BIBLIOGRAPHIE

- DE BARJAC (H.) & COZ (J.), 1979. — Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bull. Org. mond. Santé*, 57, 1 : 139-141.
- DE BARJAC (H.) & LARGET (I.), 1979. — Proposals for the adoption of a standardized method for the evaluation of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. *Doc. miméogr. OMS, WHO/VBC/79.744*, Genève, 15 pp.
- DEMPAH (J.) & COZ (J.), 1979. — Essais de *Bacillus thuringiensis israelensis* sur les moustiques. *Doc. miméogr. OMS, WHO/VBC/79.719*, Genève, 10 pp.
- GARCIA (R.) & DESROCHERS (B.), 1979. — Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to some California mosquitoes under different conditions. *Mosquito News*, 39 : 541-544.
- GUILLET (P.), DEMP AH (J.) & COZ (J.), 1980. — Évaluation de *Bacillus thuringiensis* sérotype 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 la stabilité en zone tropicale. *Doc. miméogr. OMS, WHO/VBC/80.756*, Genève, 9 pp.
- METCALF (R. L.), FUKUTO (T. R.) & WINTON (M. Y.), 1963. — Chemical and biological behaviour of fenthion residues. *Bull. Org. mond. Santé*, 29 : 219-226.
- MOUCHET (J.), DEJARDIN (J.), BARATHE (J.), SANNIER (C.) & SALES (S.), 1972. — Doses discriminatives pour la résistance d'*Aedes aegypti* aux insecticides organophosphorés et étude de quelques éléments susceptibles de modifier les résultats des tests. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. X, n° 1 : 77-83.
- OMS, 1979. — Report of the Third Meeting of the Scientific Working Group on Biological Control of Insect Vectors of Diseases. *Doc. miméogr. OMS, TDR/BCV-SWG (3)/79.3*, Genève, 40 pp.
- SINÈGRE (G.), GAVEN (B.), JULLIEN (J.-L.) et CRESPO (O.), 1979a. — Activité du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis* vis-à-vis des principales espèces de moustiques anthropophiles du littoral méditerranéen français. *Doc. miméogr. OMS, WHO/VBC/79.743*, Genève, 7 pp.
- SINÈGRE (G.), GAVEN (B.) & JULLIEN (J.-L.), 1979b. — Essai de titrage de deux poudres primaires expérimentales du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis* par comparaison avec la formulation de référence IPS.78 en employant des larves de *Culex pipiens* et d'*Aedes caspius*. *Doc. miméogr. OMS, WHO/VBC/79.745*, Genève, 18 pp.
- SINÈGRE (G.), GAVEN (B.), JULLIEN (J.-L.), CRESPO (O.) & VIGO (G.), 1979c. — Activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur quelques espèces de moustiques. Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, Chambre de Commerce et d'Industrie, Marseille, 13-16 mars 1979, 2^e partie : 1277-1281.
- SINÈGRE (G.), GAVEN (B.) & JULLIEN (J.-L.), 1979d. —

NORMALISATION DES ÉPREUVES DE LABORATOIRE DE *BACILLUS THURINGIENSIS*. II

Évaluation de l'activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les Culicidés — Performances comparées des formulations commerciales — Impact du produit sur la faune non cible. *Doc. miméogr.*, EID N° 40, Montpellier, 23 pp.

SINÈGRE (G.), 1980. — 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. *Doc. miméogr.* OMS, WHO/VBC/80.769.

1981. — *Idem*, *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XIX, n° 3 : 143-147.