

# Toxicité et rémanence d'une nouvelle formulation du *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* sur les larves de *Culex pipiens* L. et *Aedes geniculatus* (Oliver) (Diptera: Culicidae) en eaux usées

David Damiens<sup>(1)</sup>, Gauthier Martin<sup>(1)</sup>, Philippe Deswattines<sup>(2)</sup> & Thierry Hance<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Earth and Life Institute, Centre de recherche sur la Biodiversité, Place Croix du Sud 5, 1348 Louvain-la-Neuve.

<sup>(2)</sup> IDRABEL, 1348, Louvain-la-Neuve, Belgique, Rue Saint Denis 51, 1190, Bruxelles.

Idrabel est une société biotechnologique qui développe et fournit des produits pour traiter la pollution organique d'origine industrielle et municipale dans l'eau. Ainsi, leur produit de type "Biocol" permet un traitement des eaux usées municipales, des réseaux d'égouts et des collecteurs qui sont également des sites de pontes potentiels pour de nombreuses espèces de moustiques. L'idée a donc été développée de traiter simultanément les eaux avec le Biocol et une nouvelle formulation de *Bacillus thuringiensis* (Bti) active contre les larves de moustique. En effet, un des éléments limitant l'efficacité de Bti est sa faible rémanence particulièrement dans les eaux riches en matière organique. De nouvelles formulations ont donc été conçues pour augmenter la durée de vie du produit après traitement. Cette recherche avait donc pour objectif de mettre au point et d'étudier l'efficacité larvicide d'un prototype "Bti-Biocol" sur les larves de *Culex pipiens*. Ainsi, deux formulations ont été sélectionnées et testées dans les eaux usées. Une efficacité proche de 100 % de mortalité se manifeste encore 17 jours après le traitement pour une des formulations. Les tests effectués sur les larves d'*Aedes geniculatus* confirment ces résultats.

**Mots-clés:** *Bacillus thuringiensis*, *Culex pipiens*, *Aedes geniculatus*, eaux usées, Biocol, toxicité, rémanence.

**Toxicity and persistence of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) on the larvae of *Culex pipiens* L. and *Aedes geniculatus* (Oliver) (Diptera: Culicidae) in waste water.** Idrabel is a biotechnology company that develops and provides products to treat any organic pollution in industrial and municipal water. For instance, one of their products "Biocol" permits treatment of municipal wastewater, sewer systems and collectors that are also potential nesting sites for many species of mosquitoes. The idea has been developed to deal simultaneously with Biocol waters and a new formulation of *Bacillus thuringiensis* (Bti) active against mosquito larvae. Indeed, one of the factors limiting the effectiveness of Bti is its low persistence particularly in waters rich in organic matter. A new formulation has been designed to increase the lifetime of the product after processing. This research therefore aims to develop and study the larvicidal efficacy of a prototype "Bti-Biocol" on the larvae of *Culex pipiens*. Different active ingredients, various natural materials and various manufacturing processes were tested, each with interesting characteristics in the development of a prototype. Two formulations were selected; their toxicity and persistence were studied in clean waters on *Culex pipiens*. These complexes "Bti-support" were then incorporated to Biocol and tested, in this work, in wastewater. Efficiency approaching 100 % mortality occurs still 17 days after treatment. Tests on larvae of *Aedes geniculatus* confirm these results.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, *Culex pipiens*, *Aedes geniculatus*, waste water, Biocol, toxicity, persistence.

## 1. INTRODUCTION

Depuis quelques années, l'augmentation des cas de résistance aux insecticides chimiques et les effets néfastes sur les espèces non cibles (Milam *et al.*, 2000) ont conduit à la recherche de

nouvelles solutions de lutte contre les insectes vecteurs de maladies comme les moustiques. Cette volonté écologique de protection de l'environnement associée à une très grande sélectivité des bactéries entomopathogènes ont favorisé le développement et l'application des

agents biologiques tels que le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). Le *Bti* a en effet démontré un effet larvicide important sur plus de 115 espèces de moustiques et 40 espèces de mouches noires (Glare & O'Gallaghan, 1998). Depuis, les produits larvicides commerciaux à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sont de plus en plus utilisés pour le contrôle de ces insectes.

Cependant, le *Bti* présente une rémanence limitée dans les systèmes aquatiques, et plus particulièrement en eaux polluées où il est adsorbé aux matières organiques et sédiments rapidement hors de la zone de nutrition des larves (Thiery *et al.*, 1996; Walker & Lynch, 2007). Une des méthodes permettant d'améliorer la rémanence est la fixation des organismes sur un support. Idrabel, une société bruxelloise a mis au point un système de "bio fixation"; des micro-organismes sont fixés sous forme active dans les capillaires microscopiques d'un support poreux naturel et non toxique. Des bactéries vivantes et actives ainsi associées à un support spécifique ont été utilisées efficacement pour traiter les pollutions organiques dans les eaux. Vu le succès de ce principe, l'idée suivante était d'appliquer ce système aux bactéries entomopathogènes pour favoriser leur activité en milieu aquatique. Par la "bio fixation" du *Bti* au sein des supports, l'adsorption aux matières organiques devrait être réduite voire empêchée. La nouvelle formulation du prototype permettrait dès lors d'obtenir une meilleure efficacité larvicide en eaux polluées et d'augmenter la rémanence et la période d'activité du biocide contre les larves de moustiques.

Le présent travail avait pour objectif de tester la toxicité et la rémanence de deux formulations de complexe "*Bti*-support" fournie par la société Idrabel, en eaux usées sur deux espèces de moustiques *Culex pipiens* L. et *Aedes geniculatus* (Oliver).

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Elevage de la colonie de *Culex pipiens*

La colonie est maintenue dans un insectarium à 28 degrés, 40 % d'humidité avec une photopériode de 14h (jour)/10h (nuit). Les larves sont nourries avec de l'alimentation pour poissons rouges (TETRAMIN) et les adultes sont nourris *ad libitum* avec une solution de sucrose à 10 %. Les femelles sont gorgées avec du sang de rat tous les deux jours (méthode du cotton-stick feeding). Dans les expérimentations suivantes, les stades larvaires utilisés sont les stades III et IV.

### 2.2. Toxicité et rémanence

Les essais sont réalisés sous conditions contrôlées en laboratoire dans des bacs de 2,45 litres (12cm x 17cm x 12cm) contenant des eaux usées (en provenance de la station d'épuration de Bruxelles Sud (non traité) ou d'un égout se déversant dans le Geer (traitée au Biocol), selon le cas). Deux formulations sont testées (support 1 ou 2). Pour chaque formulation, six réplicats sont réalisés avec 5 types d'eau.

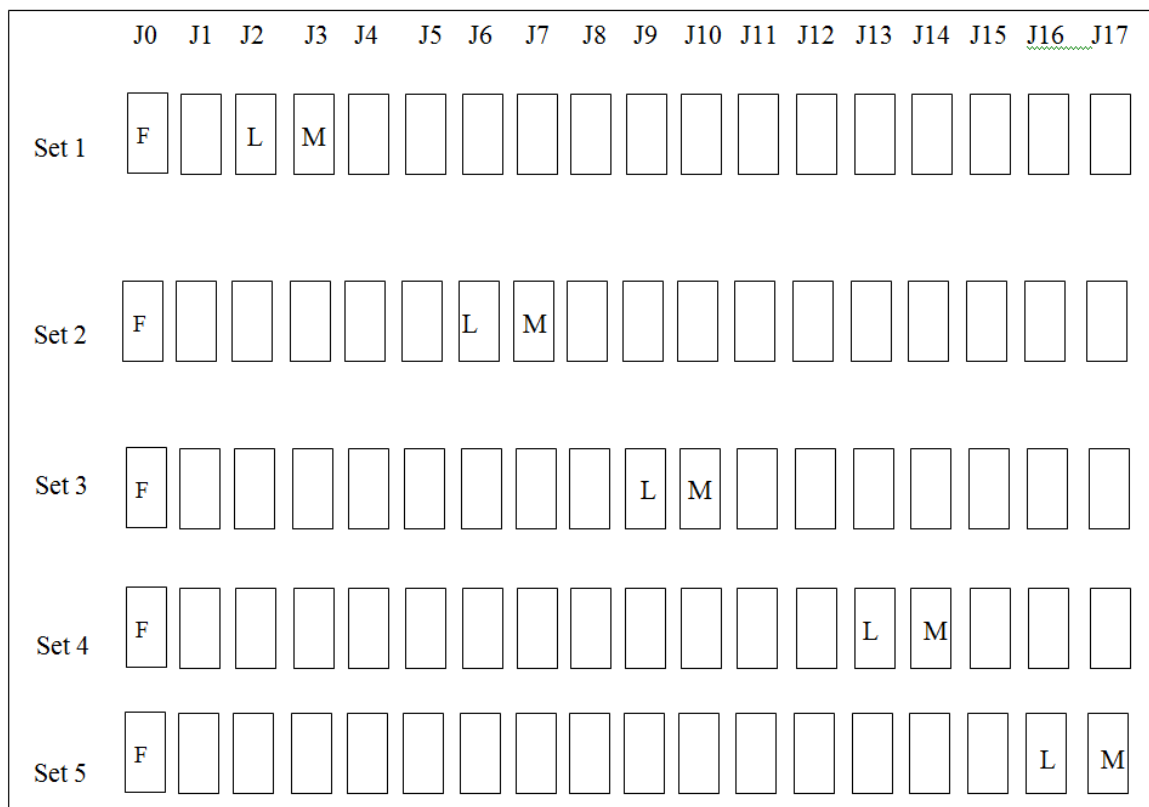
Les 5 types d'eau testés sont:

Témoin eau usée: eau usée provenant de la station d'épuration de Bruxelles Sud.

Témoin Biocol: eau usée préalablement traitée au Biocol (égout à Geer).

Biocol + Bio(1ou 2) "Biocol-*Bti* pur- Support (1ou 2)": eau usée préalablement traitée au Biocol (égout à Geer) + Bio "*Biocol-Bti* pur-support" à la concentration de 1400 ITU/l (correspondant à la LD90).

Eau usée + MA (1 ou 2): eau usée provenant de la station d'épuration de Bruxelles Sud + "*Bti* pur" à la concentration retrouvée dans la formulation "*Biocol-Bti* purSupport" à LD90.



**Figure 1:** Schéma du protocole utilisé pour les tests de rémanence. Tous les traitements sont effectués au jour 0 (F). Dans le premier Set d'expérimentation, les larves sont ajoutées le deuxième jour (L) et la mortalité est enregistrée au jour suivant (M). Dans le Set 2, les larves sont ajoutées 6 jours après le traitement et la mortalité est enregistrée le lendemain, ainsi de suite. J0, J+1, J+2, ...: Jour 0, premier jour, deuxième jour, ...

\*Set: Set d'expérimentation contenant les différents traitements, \*\*F: Ajout des différentes formulations dans les bacs, \*\*\*L: Ajout de 10 larves dans chaque bac, \*\*\*\*M: Mortalité observée à 24h post-traitement.

Biocol+ MA (1 ou 2): eau usée préalablement traitée au Biocol (égout à Geer) + "Bti pur" à la concentration retrouvée dans la formulation "Biocol-Bti pur- Support 1" à LD90.

Au premier jour de l'expérimentation (Jour 0), les différents traitements sont ajoutés dans les bacs.

Ainsi, 5 sets d'expérimentation sont préparés sous conditions contrôlées: aux jours 3, 7, 10, 14 et 17, sept larves de stades III et IV sont ajoutées dans chaque type d'eau (Figure 1).

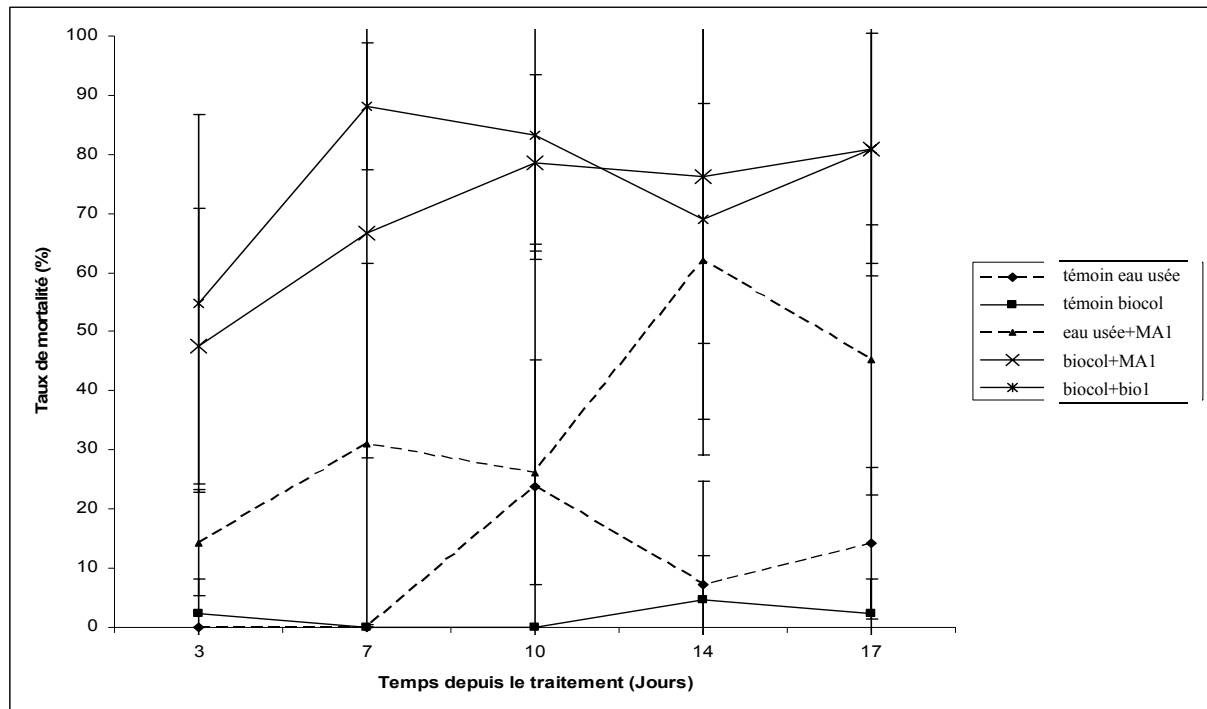
La mortalité des larves, le nombre de pupes et le nombre d'adultes émergents sont observés 24 heures après leur mise dans l'eau traitée. La mort et le manque de réaction des larves à un stimulus sont considérés dans le calcul de la mortalité. Les pupes formées durant l'expérimentation sont considérées comme des larves vivantes.

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. *Culex pipiens*

##### *Support 1*

Une analyse ANOVA à deux facteurs a été réalisée sur les traitements montrant un effet extrêmement significatif du "type de traitement" ( $F=36,69$ ,  $DFn=4$   $DFd=100$ ,  $P < 0,0001$ ) et du "temps depuis le traitement" ( $F=6,23$   $DFn=4$   $DFd=100$ ,  $P=0,0002$ ). Les différences de mortalité observées sont donc liées aux traitements. On observe une différence significative entre les témoins et les autres traitements (figure 2). Le "temps depuis le traitement" influence également les valeurs de mortalité suggérant ainsi que la toxicité varie au cours du temps. La toxicité des



**Figure 2:** Taux de mortalité à 24h des larves de *Culex pipiens* dans les 5 traitements en fonction du temps depuis le début du traitement (2 blocs)

traitements Biocol + MA1 et Biocol +Bio1 reste élevée jusqu'au 17<sup>ème</sup> jour après le traitement.

### Support 2

Une analyse ANOVA à deux facteurs a été réalisée sur les traitements montrant un effet extrêmement significatif des facteurs "type de traitement" ( $F=47,90$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=100$ ,  $P<0,0001$ ) et très significatif pour le "temps depuis le traitement" ( $F=4,28$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=100$ ,  $P<0,01$ ). Les différences de mortalité observées sont donc liées aux traitements (figure 3) et au "temps depuis le traitement" probablement expliqué par la baisse de toxicité des traitements après 10 jours.

Si on compare les traitements "Eau usée+MA1" vs "Biocol-Bio1" vs "Biocol+MA1" vs "Eau usée+MA2" vs "Biocol-Bio2" vs "Biocol+MA2", on retrouve l'effet "traitement" ( $F=5,95$ ,  $DFn=5$ ,  $DFd=120$ ,  $P<0,001$ ) et "temps depuis le traitement" ( $F=7,02$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=120$ ,  $P<0,001$ ). Les tests de Bonferroni testant les différences observées entre les courbes des différents traitements n'ont pas noté de différence

significative sur la plupart des courbes suggérant que chacune des associations pourraient être utilisée avec la même efficacité. Seul le traitement eau usée MA1 montre des différences significatives avec les autres courbes sur certains points.

### 3.2. *Aedes geniculatus*

#### Support 1

Une analyse ANOVA à deux facteurs a été réalisée sur les traitements montrant un effet extrêmement significatif du facteur "type de traitement" ( $F=63,28$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=100$ ,  $P<0,001$ ) et significatif sur le "temps depuis le traitement" ( $F=7,32$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=100$ ,  $P=0,001$ ). Les différences de mortalité observées sont donc en grande partie liées aux traitements (figure 3). Le temps depuis le traitement influence également les différences de mortalité, probablement dû à la chute de l'efficacité du produit dans les 3 traitements avec la matière active 1 à partir du 10<sup>ème</sup> jour.

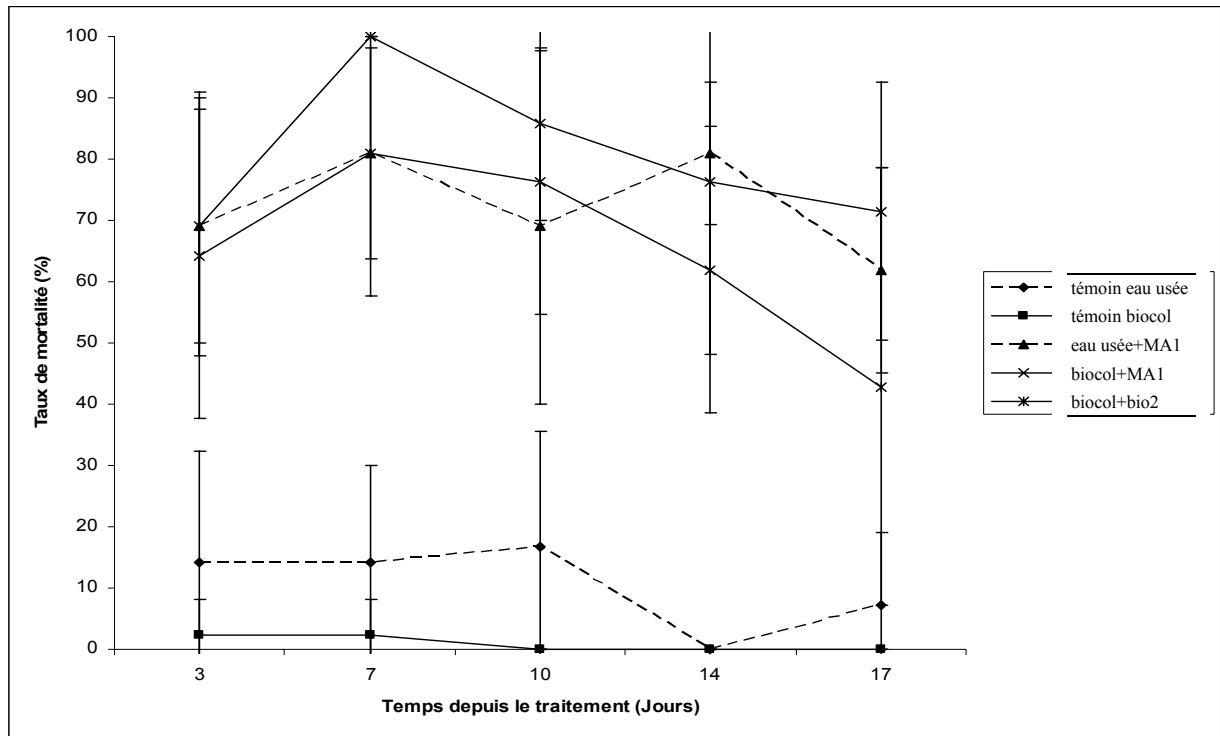


Figure 3: Taux de mortalité à 24h des larves de *Culex pipiens* dans les 5 traitements en fonction du temps depuis le début du traitement (deux blocs), support 1 en fonction du temps depuis le début du traitement.

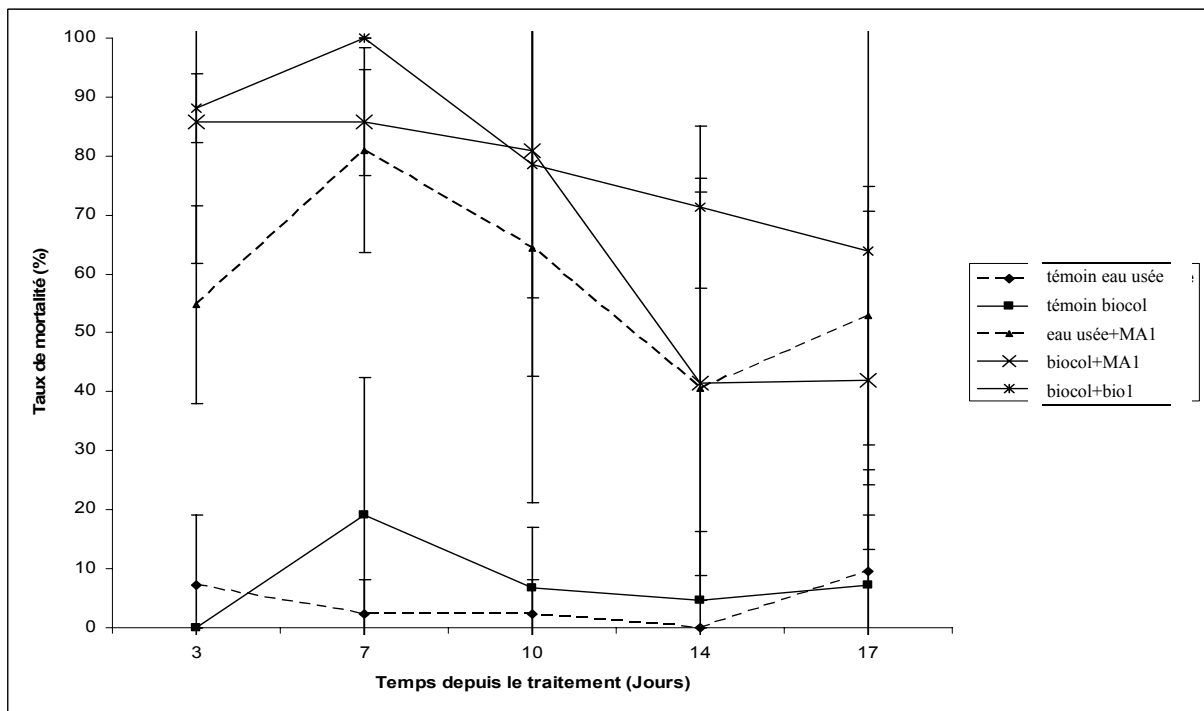


Figure 4: Taux de mortalité des larves de *Aedes geniculatus* à 24h de la formulation Bio1 "Biocol-Bti pur-support 1" en fonction du temps depuis le traitement.

## Support 2

Une analyse ANOVA à deux facteurs a été réalisée sur les traitements montrant un effet extrêmement significatif du « type de traitement » ( $F=44,98$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=100$ ,  $P<0,001$ ). Il y a une différence significative entre les témoins et les autres traitements (figure 4). Mais le "temps depuis le traitement" n'affecte pas les résultats ( $F=0,26$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=100$ ,  $P=0,9048$ ) suggérant que la toxicité au cours du temps de tous les traitements ne varie pas. La rémanence de ces trois formules est donc de 17 jours.

En comparant les différents traitements "Eau usée+MA1" vs "Biocol-Bio1" vs "Biocol+MA1" vs "Eau usée+MA2" vs "Biocol-Bio2" vs "Biocol+MA2", les tests de Bonferroni n'ont pas montré de différences significatives entre aucune courbe suggérant que chacune des associations pourrait être utilisée avec la même efficacité.

## 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le but du travail était de tester la toxicité et la rémanence de deux formulations de complexe "Bti-support" en eaux usées sur deux espèces de

moustiques *Culex pipiens* et *Aedes geniculatus* dans le but de créer un prototype dont l'action est un compromis entre une bonne efficacité larvicide et une bonne efficacité d'assainissement.

Les résultats montrent que pour *Culex pipiens*, les traitements Biocol+bio et Biocol+MA des 2 formulations sont efficaces jusqu'à 17 jours pour le support 1 et 14 jours pour le support 2 (même si à 17 jours, ils présentent encore une efficacité comprise entre 60 et 80 %).

Pour *Aedes geniculatus*, les trois traitements avec les 2 formulations présentent une efficacité équivalente. Le support 2 apparaît plus toxique et a une rémanence supérieure au support 1. Pour le support 2, la rémanence est équivalente pour les 3 traitements (17 jours). Pour le support 1, Biocol+bio semble cependant présenter une bonne rémanence (70 % de mortalité à 17 jours). Les meilleurs traitements apparaissent être le Biocol+bio2 et Biocol+MA2 avec une rémanence d'au moins de 17 jours avec une efficacité supérieure au support 1.

Ainsi pour lutter contre les deux genres *Culex* et *Aedes*, le développement des formulations à base du support 2 et de Biocol semble être les plus

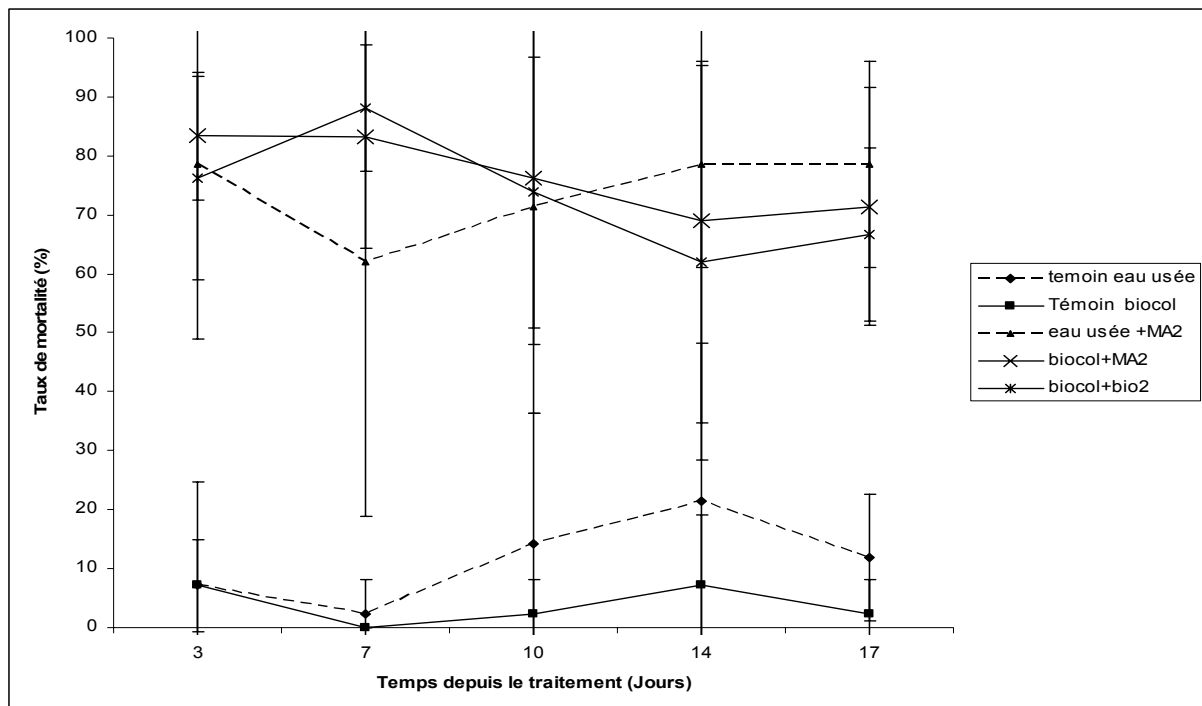


Figure 5: Taux de mortalité des larves de *Aedes geniculatus* à 24h de la formulation Bio1 "Biocol-Bti pur-support 2" en fonction du temps depuis le traitement.

avantageux en termes d'efficacité. Des essais seront nécessaires pour tester l'efficacité des formulations en situation naturelle.

Enfin, il serait intéressant de tester les formulations sur une espèce d'anophèle. En effet, les larves d'anophèle sont jusqu'à présent moins sensibles au Bti que les larves d'*Aedes* ou de *Culex*. Les larves d'anophèles se nourrissent en effet à la surface de l'eau pendant que les deux autres espèces se nourrissent sur toute la colonne d'eau. Si le Bti sédimente rapidement, les larves d'anophèles n'ont probablement pas le temps d'ingérer la quantité létale de cristaux. Les formulations testées pourraient limiter ce problème.

#### Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce à une subvention de l'Institut d'Encouragement de la Recherche Scientifique et de l'Innovation de Bruxelles (IRSIB).

#### Bibliographie

- Boisvert J. & Lacoursière J.O. (2004). *Le Bacillus thuringiensis israelensis et le contrôle des insectes piqueurs au Québec*. Québec, Ministère de l'Environnement, Envirodoq n° ENV/2004/0278, sur <http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti>.
- Glare T.R. & O'Callaghan M. (1998). *Environmental and health impacts of Bacillus thuringiensis israelensis*. Report for the Ministry of Health, New Zealand, 58 p.
- Milam C.D., Farris J.L. & Wilhide J.D. (2000). Evaluating mosquito control pesticides for effect on target and non-target organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**, p. 324-328.
- Thierry I., Back C., Barbazan P. & Sinègre G. (1996). Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. *Annales de l'Institut Pasteur* **7**(4), p. 247-260.
- Walker K. & Lynch M. (2007). Contributions of *Anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievement and potential. *Medical and veterinary entomology* **21**, p. 2-21.

(5 réf.)