

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

MARIO BOISVERT B.Sc.

ETUDE DE LA PERSISTANCE D'UN INSECTICIDE BIOLOGIQUE, BACILLUS

THURINGIENSIS SEROVARIETE ISRAELENSIS, DANS LE MILIEU

AQUATIQUE.

JANVIER 1988

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RESUME

La persistance de l'activité toxique de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis fut testée sur une période de 5 mois dans le milieu aquatique. Des chambres environnementales contenant une préparation commerciale de B.t.i. ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de produit formulé) et divers substrats naturels (eau, sédiments, végétation aquatique, périphyton) furent utilisés pour réaliser l'étude de persistance. Ces chambres environnementales furent placées dans un lac dystrophe peu profond et retirées à intervalles réguliers pour vérifier l'activité résiduelle du produit. Avec le substrat "eau du lac", on dénote une activité résiduelle qui demeure stable à 50% de la concentration initiale pendant le premier mois d'échantillonnage. Suite à cette stabilité, l'activité toxique décline brusquement à des concentrations inférieures à  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  dès la sixième semaine. Pour le substrat "périphyton", des résultats similaires sont obtenus. Cependant, en présence de deux types de végétation, l'activité résiduelle dans la fraction liquide des échantillons démontre une forte perte au profit de la fraction solide devenue toxique. Dans ces échantillons de végétation, une hausse de toxicité dans la fraction liquide

peut s'expliquer par un recyclage de spores ( relâchement de nouvelles toxines ) et/ou par une désorption de cristaux provenant de la fraction solide. Pour le substrat "sédiments", autant pour la fraction liquide que pour la fraction solide, l'activité résiduelle est très faible (inférieure à  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), et ce dès la première semaine.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier d'une façon toute spéciale le Docteur Jacques L. Boisvert pour m'avoir initié au cours de cette maîtrise, aux principes de base reliés à la recherche et à la rédaction scientifique. Je tiens aussi à le remercier pour sa compréhension, sa patience et sa grande disponibilité à mon égard.

Je remercie aussi le Docteur Guy Charpentier ainsi que mes collègues de travail, soit Mme. M. Chantal Alarie, Christian Back, Yvon Beaulieu, Alain Chalifour ainsi que Claude Dupont pour leur aide au cours de ces dernières années.

J'aimerais dédier des remerciements bien particuliers à Madame Liette Laganière ainsi qu'à Monsieur Marcel Kouassi pour leur précieuse collaboration et leur grande disponibilité au cours de cette étude.

Je tiens également à remercier mon amie Lyne Dupuis pour sa compréhension ainsi que ses encouragements qui m'ont grandement aidé à mener à bien cette maîtrise.

Je remercie aussi l'Université du Québec à Trois-Rivières, le Fond F.C.A.R. ainsi que la compagnie Zoecon Ltd pour leur aide financière tout au long de ce travail.

Finalement, je tiens à exprimer ma gratitude à M. Gilles Proteau du Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche ainsi qu'à toute son équipe pour les facilités et les commodités gracieusement fournies à la Réserve St-Maurice.

## TABLE DES MATIERES

	Page
PAGE TITRE . . . . .	i
RESUME . . . . .	ii
REMERCIEMENTS . . . . .	iv
TABLE DES MATIERES . . . . .	vi
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	ix
LISTE DES FIGURES . . . . .	xi
LISTE DES ABREVIATIONS . . . . .	xii
 CHAPITRES	
I. INTRODUCTION . . . . .	1
I.1 Historique du <u>Bacillus thuringiensis</u>	
sérovariété <u>israelensis</u> . . . . .	1
I.2 Caractéristiques et propriétés de	
B.t.i. . . . .	7
I.3 Situation de l'étude . . . . .	15
I.4 But et objectifs spécifiques . . . . .	30
II. MATERIEL ET METHODES . . . . .	32
II.1 Choix du site . . . . .	34
II.2 Chambre environnementale . . . . .	35
II.3 Préparation commerciale . . . . .	37
II.4 Substrats . . . . .	38
II.5 Nature et nombre d'échantillons . . .	40

II.6 Echantillonnage . . . . .	45
II.7 Préparation des fractions . . . . .	46
II.8 Essais biologiques et analyses	
statistiques des tests biologiques .	48
II.9 Décomptes de spores et de cellules	
végétatives . . . . .	52
II.10 Tests de protéases . . . . .	54
III. RESULTATS . . . . .	58
III.1 Les Témoins . . . . .	58
III.2 Les Substrats . . . . .	62
III.2.1 Substrat Eau du lac . . . . .	62
III.2.2 Substrat Périphyton . . . . .	63
III.2.3 Substrat Végétation A . . . . .	65
III.2.4 Substrat Végétation B . . . . .	67
III.2.5 Substrat Sédiments . . . . .	69
III.3 Température et pH . . . . .	71
IV. DISCUSSION . . . . .	85
IV.1 Les Témoins . . . . .	85
IV.1.1 Les Témoins sans B.t.i. ( avec	
membrane ) . . . . .	85
IV.1.2 Les Témoins avec B.t.i. ( avec	
couvercle ) . . . . .	86
IV.2 Les Substrats . . . . .	89
IV.2.1 Substrats Eau du lac et	
Périphyton . . . . .	90



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1. Résumé des différentes activités (cytolytiques, hémolytiques et larvicides) produites par divers polypeptides contenus dans le cristal . . . . .	10
2. Nombre d'échantillons pour chacun des substrats . . . . .	42
3. Volume et poids des différents substrats placés dans les chambres environnementales . . . . .	45
4. Pourcentages moyens de mortalité des témoins "eau du lac" et "TEKNAR <sup>R</sup> HPD sp- cr-" . . . . .	73
5. Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans le témoin TEKNAR <sup>R</sup> HPD scellé. . . . .	75
6. Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans l'eau du lac . . . . .	77
7. Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans les fractions liquides du périphyton. . . . .	79
8. Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans les fractions liquides de la végétation A et de la végétation B . . . . .	82

X

9. Activité toxique résiduelle (fraction liquide et solide), nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans les sédiments . . . . . 83

## LISTE DES FIGURES

Figure	page
1. Mécanisme d'action des cristaux conduisant à une activité toxique . . . . .	13
2. Schéma représentant les différentes composantes de la chambre environnementale . . . . .	36
3. Figure montrant le portoir avec lames servant à la colonisation par le périphyton . . . . .	41
4. Graphique de l'activité résiduelle du témoin TEKNAR <sup>R</sup> HPD scellé en fonction du temps. . . . .	74
5. Graphique de l'activité résiduelle de l'eau du lac en fonction du temps . . . . .	76
6. Graphique de l'activité résiduelle des fractions liquides et solides du périphyton en fonction du temps . . . . .	78
7. Graphique de l'activité résiduelle des fractions liquides de la végétation A et de la végétation B en fonction du temps . . . . .	80
8. Graphique de l'activité résiduelle des fractions solides de la végétation A et de la végétation B en fonction du temps . . . . .	81
9. Graphique des températures minima - maxima et du pH en fonction du temps . . . . .	84

## LISTE DES ABREVIATIONS

A.a.	<u>Aedes aegypti</u>
B.t.	<u>Bacillus thuringiensis</u>
B.t.i.	<u>Bacillus thuringiensis</u> sérovariété <u>israelensis</u>
° C	degré Celsius
cm	centimètre
DO 520	Densité optique (520 nanomètre)
g	gramme
HPD <sup>R</sup>	TEKNAR <sup>R</sup> HPD
HPD <sup>R</sup> sp- cr-	TEKNAR <sup>R</sup> HPD sans spores ni cristaux
kdal	kilodalton
L	litre
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
nm	nanomètre
NYPC	Nutrient agar, Yeast extract, Polymyxine B sulfate, Chloramphenicol
PBS	tampon phosphate salin
P.M.	poids moléculaire
u.a.e.	unité d'activité enzymatique
UFC	unité formatrice de colonies
µm	micromètre

## CHAPITRE I

### I. INTRODUCTION

#### I.1 HISTORIQUE DU BACILLUS THURINGIENSIS SEROVARIETE ISRAELENSIS.

Bacillus thuringiensis (B.t.) peut être considéré dans une classe à part dans le monde bactérien, à cause de son énorme potentiel pour le contrôle de plusieurs espèces d'insectes. Bien que d'autres bactéries soient d'excellents candidats pour leur utilisation comme insecticides biologiques, seuls B. thuringiensis (Bulla et al, 1980) et B. sphaericus ont été produits commercialement avec succès dans plusieurs pays.

Sa découverte remonte au début du vingtième siècle, plus précisément en 1905, lorsqu'un scientifique japonais isola chez des larves de vers à soie malades (Bombyx mori) une bactérie qu'il nomma Bacillus sotto (Ishiwata, 1905). Cette bactérie, responsable des symptômes observés chez le ver à soie, est aujourd'hui connue sous l'appellation de Bacillus thuringiensis sérovariété sotto (sérotype H4a4b).

Cependant, bien qu'Ishiwata en 1905 fut le premier à remarquer que des bactéries puissent être la cause de

certaines maladies chez les insectes, la dénomination Bacillus thuringiensis revient à un chercheur allemand du nom de Berliner. Ce dernier travailla entre 1909 et 1912 sur une maladie infectieuse de la pyrale méditerranéenne de la farine (Anagasta kuchniella), retrouvée originellement dans les moulins de la ville de Thuringe. Il isola la bactérie causant l'infection et la désigna sous le nom de Bacillus thuringiensis (Berliner, 1915) en souvenir de la ville de Thuringe. Aujourd'hui cette bactérie est désignée sous le nom de B.t. sérovariété thuringiensis ou Berliner.

Ces Bacillus (sotto et thuringiensis), de même que les autres sous-espèces de B.t., possèdent les principales caractéristiques suivantes : ils sont gram - positifs, aérobiques facultatifs, capables de sporulation (spore ovale, subterminale non-déformante) et largement répandus dans l'environnement (de Barjac et Bonnefoi, 1967).

Phénotypiquement très proche de Bacillus cereus (Carleton et Gonzalez, 1985), Bacillus thuringiensis se distingue de cette dernière espèce par sa propriété de synthèse d'une inclusion protéïnique lors de son cycle de sporulation. Cette inclusion protéïnique appelée "cristal", est pathogène pour les larves de certains insectes. La présence d'une endotoxine protéïnique (delta-endotoxine) dans le cristal (Lüthy et Ebersold, 1981) est responsable de la toxicité chez plus de 150 espèces de lépidoptères, dont

plusieurs causent d'importants dommages agricoles (Bulla et al., 1985). Cette propriété fait de B.t. l'un des microorganismes les plus utilisés pour le contrôle des insectes (exemple: la tordeuse de bourgeons d'épinettes).

De façon générale, en plus de la delta-endotoxine, certains B.t. peuvent produire plusieurs toxines, soit : a) la bêta-exotoxine, b) l'alpha-exotoxine, c) plusieurs exoenzymes et protoxines ne démontrant aucune activité biologique (LÜthy et Ebersold, 1981). La bêta-exotoxine thermostable, moins spécifique que la delta-endotoxine, peut être毒ique pour les mammifères tandis que l'alpha-exotoxine n'est produite que sous certaines conditions et présente peu d'intérêt dans le cadre d'un contrôle biologique.

Avec ces découvertes, de nouveaux horizons semblaient s'ouvrir pour le contrôle biologique des insectes. Cependant, il n'en demeurait pas moins que les insecticides chimiques à cette époque avaient une très forte emprise sur le marché. Au fil des années, l'apparition de résistances aux insecticides chimiques, combinée à de plus grandes préoccupations environnementales, firent en sorte que l'idée d'utiliser des insecticides biologiques refit surface après une quarantaine d'années de silence.

En quelques années, les recherches pour découvrir de nouveaux produits et de nouvelles souches de bactéries

entomopathogènes progressèrent très rapidement. A la fin des années 50, de nombreuses bactéries pathogènes pour les lépidoptères avaient été isolées de plusieurs insectes (Delaporte et Béguin, 1955; Talalaev, 1956; Heimpel et Angus, 1958; Isakova, 1958). Etant donné le nombre toujours croissant des nouveaux pathogènes, on a dû procéder en 1962 à la classification des différentes souches découvertes, afin de bien les distinguer. L'individualisation des diverses souches s'est faite par une étude sérologique basée sur la technique de l'agglutination flagellaire (de Barjac et Bonnefoi, 1962; Bonnefoi et de Barjac, 1963) et a permis de distinguer les différents sérotypes (différents antigènes flagellaires) ainsi que les différents biotypes (mêmes antigènes flagellaires, mais différents biochimiquement).

Jusqu'en 1977, toutes les souches présentaient une caractéristique commune, soit celle de n'être toxique que pour les larves de lépidoptères. Ces diverses souches (au nombre de 20) étaient caractérisées par les antigènes H1 à H13 (de Barjac et Bonnefoi, 1973a,b; de Barjac et al., 1977). Le B.t. n'était jusqu'alors utilisé que pour lutter contre les insectes nuisibles rencontrés surtout en agriculture et en foresterie.

Cependant, en 1977 on découvrit un quatorzième sérotype ayant une particularité très spéciale par rapport aux sérotypes précédents. Cette nouvelle souche, isolée par

Goldberg et Margalit (1977) à partir de moustiques morts provenant d'une mare en Israël, démontre un pouvoir larvicide très spécifique pour les larves de certains diptères aquatiques. Cette spécificité touchait les moustiques Anopheles, Uranotaenia, Culex et Aedes (Goldberg et Margalit, 1977), de même que plusieurs espèces de mouches noires (Undeen et Nagel, 1978; Undeen et Berl, 1979).

Cette nouvelle souche nommée israelensis et sérotypée H14 par de Barjac (1978a) fut la première à être utilisée dans le domaine de la santé publique. En effet, elle peut permettre le contrôle de plusieurs espèces de moustiques ou mouches noires vectrices de maladies importantes. En régions tropicales par exemple, ces insectes peuvent être vecteurs de graves maladies telles la fièvre jaune, la malaria, la dengue et l'onchocerchose; tandis qu'en Amérique du Nord certaines pathologies animales et humaines (encéphalites, filarioSES) peuvent être transmises par ces insectes (CNRC, 1982).

Ainsi, bien que de nombreuses souches soient maintenant connues et identifiées (en 1988, on dénombrait 41 sérovariétés de B.t. réparties en 23 sérotypes différents), peu de souches autres qu'israelensis n'ont démontré une activité larvicide aussi forte pour les moustiques et les mouches noires.

Toutefois, en plus de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis (B.t.i.), quatre souches différentes de B.t. ont démontré une spécificité face aux larves de moustiques (Padua et al., 1980; 1984). La première de ces souches est le sérototype H11a11c de la sous-espèce kyushuensis (Ohba et Aizawa, 1979). Deux autres souches, soit la souche 73 E10-2 et la souche 73 E10-16, appartenant au sérototype H10 de la sous-espèce darmstadiensis démontrent aussi un pouvoir larvicide contre les moustiques (Kim et al., 1984). Finalement, la quatrième souche, PG14, qui appartient au sérototype H8 de la sous-espèce morrisoni, produit des cristaux très similaires à ceux de B.t.i. (Ibarra et Federici, 1986a) mais qui sont toutefois beaucoup moins toxiques que ces derniers face aux larves de moustiques.

Avant la découverte de B.t.i., la seule espèce bactérienne retenue pour son pouvoir pathogène vis-à-vis les larves de moustiques était le Bacillus sphaericus (Singer, 1973; Davidson et al., 1975). Des études ont démontré que certaines souches de Bacillus sphaericus étaient très toxiques contre les larves de moustiques des genres Culex et Anopheles mais présentaient une très faible toxicité pour les larves de la plupart des espèces d'Aedes (de Barjac et al., 1985). Le B.t.i. montre une activité 100 fois supérieure à celle de Bacillus sphaericus face aux larves d'Aedes aegypti (de Barjac, 1978b). Toutefois, contrairement au B.t.i., le

Bacillus sphaericus présente l'avantage d'être plus efficace en eaux polluées où il démontre une plus grande persistance, mais il est cependant inefficace contre les simulies (mouches noires) (Nicolas, 1986).

## I.2 CARACTERISTIQUES ET PROPRIETES DE B.T.I.

L'intérêt majeur suscité par Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis (B.t.i.) est son pouvoir larvicide spécifique pour certains diptères aquatiques, plus précisément les moustiques et les mouches noires (de Barjac, 1978a; Undeen et Nagel, 1978).

Cette propriété que possède la bactérie est associée à la présence d'un cristal protéïnique produit lors de la sporulation du bacille. Chez la sous-espèce israelensis, ce cristal (ou inclusion) possède une forme ovoïde, irrégulière et multisegmentée (Insell et Fitz-James, 1985; Lee et Bulla, 1986). Il est donc très différent des formes bi-pyramidales des autres sous-espèces de B.t. (Bulla et al, 1980).

Le cristal possède une grosseur moyenne d'environ 0,6 µm de diamètre (Charles, 1984) mais il est toutefois possible de le retrouver sous des grosseurs allant de 0,2 µm jusqu'à 1,5 µm de diamètre (Lee et al, 1985). Le cristal est entouré d'une enveloppe (Bulla et al, 1980; LÜthy et Ebersold, 1981; Insell et Fitz-James, 1985) et il se compose de 79 à 92 % de protéines (variable selon la méthode de dosage employée) et

environ 6 % d'hydrates de carbone dont le glucose, le mannose, le fucose, le rhamnose, le xylose et le galactosamine. Mentionnons que l'on retrouve seulement le glucose et le mannose chez les autres sous-espèces de B.t. (Bulla et al., 1980).

Cette inclusion multisegmentée est formée de deux composantes distinctes du point de vue structural et biochimique. La microscopie électronique révèle que l'inclusion se compose de segments clairs et foncés contenant différents peptides. Après analyse par électrophorèse, on a observé à partir des bandes claires, 13 polypeptides de poids moléculaires différents (25.0 à 145 kdal) tandis que sur les bandes foncées, on en identifiait seulement que deux (35 et 70 kdal) (Insell et Fitz-James, 1985).

Selon Insell et Fitz-James (1985), des polypeptides d'environ 28 kdal et associés aux bandes claires seraient responsables de l'activité toxique chez les larves d'espèces visées. Bien que plusieurs auteurs corroborent les affirmations de Insell et Fitz-James, d'autres auteurs croient plutôt que l'activité larvicide serait causée par un ou des polypeptides de poids moléculaires plus élevés, soit les fractions polypeptidiques de 31-35, 130 ou même 230 kdal. Certains auteurs ont même démontré que l'action combinée de polypeptides de poids moléculaires différents (ex. 28 et 65

kdal) pouvait avoir un effet larvicide plus grand que chacun pris séparément (synergie) (tableau 1).

Par contre, les auteurs s'entendent pour dire que le poids moléculaire de la fraction toxique chez B.t.i. (voir tableau 1) est très différent de celui retrouvé chez les autres sous-espèces de B.t., qui est de 134 kdal pour la protoxine (Huber et al., 1981; Tyrell et al., 1981) et d'environ 66 Kdal pour la fraction toxique proprement dite.

Les résultats obtenus par Yamamoto et al. (1983) suggèrent qu'étant donné que certaines souches de B.t.i. produisent de fortes quantités de protéases, il y aurait une possibilité que les fractions de poids moléculaires différents soient dérivées de un ou deux précurseurs de poids moléculaires plus élevés (ex. 130 ou 230 kdal). Dépendant des fractions qui sont alors analysées, il se pourrait que la fraction causant l'activité toxique soit différente selon les auteurs. Cependant, d'autres études produites à partir d'hybridation (Bourgouin et al., 1986), ainsi que des études faites à partir de mutants (Yamamoto et al., 1983) tendent à démontrer une fois de plus qu'une fraction bien précise causerait l'effet toxique, mais encore là on ne s'entend pas sur l'identité de cette protéine.

Bien que le cristal ne possède aucune particularité spéciale du point de vue de sa composition en acides aminés,

sa dissolution à pH alcalin (pH 10-11) libère des fragments polypeptidiques ayant certaines propriétés lytiques.

Tableau I

Résumé des différentes activités (cytolytiques, hémolytiques et larvicides) produites par divers polypeptides contenus dans le cristal.

Activités	Polypeptides	Auteurs	Années
larvicide	28 kdal	Armstrong <u>et al</u> Insell et Fitz-James Davidson et Yamamoto Thomas et Ellar Yamamoto	1985 1985 1984 1983 1983
	31,34,35 kdal	Cheung et Hammock	1985
	65 kdal	Hurley <u>et al</u> Hurley <u>et al</u> Lee <u>et al</u> Ward <u>et al</u>	1987 1985 1985 1984
	130 kdal	Bourgouin <u>et al</u> Visser <u>et al</u>	1986 1986
	230 kdal	Visser <u>et al</u>	1986
synergie	28,65,130 kdal	Hurley <u>et al</u> Ibarra et Federici Wu et Chang	1987 1986 1985
cytolytique et hémolytique	28 kdal	Hurley <u>et al</u> Bourgouin <u>et al</u> Pfannenstiel <u>et al</u> Visser <u>et al</u> Hurley <u>et al</u> Lee <u>et al</u> Wu et Chang Armstrong <u>et al</u> Davidson et Yamamoto Thomas et Ellar Yamamoto	1987 1986 1986 1986 1985 1985 1985 1984 1984 1983 1983

En effet, la fraction polypeptidique de 28 kdal, qui selon certains auteurs est responsable de l'effet larvicide, peut causer la lyse d'érythrocytes de mammifères et aussi produire des altérations cytologiques sur des cultures de cellules d'insectes (tableau 1). En ce qui a trait aux altérations cytologiques, on observe des altérations stucturales, dont le fractionnement et la dilatation du réticulum endoplasmique, la condensation puis le gonflement des mitochondries avec disparition des crêtes internes, et finalement la lyse des cellules (Johnson, 1980; Charles, 1983a,b; Thomas et Ellar, 1983).

Malgré ces diverses propriétés lytiques, le principal attribut de B.t.i. demeure son utilisation comme insecticide biologique (agent larvicide). Son épandage en milieu aquatique (rivière ou étangs) vise à éliminer certains diptères aquatiques cibles au stade larvaire (moustiques et mouches noires).

En condition normale d'utilisation, l'activité toxique ne peut se manifester par la mort de la larve tant que certaines étapes n'auront pas été respectées. La figure 1 nous représente ici, les différentes étapes requises pour mener à la mort de la larve (bien que notre exemple soit schématisé en fonction d'une larve de mouche noire, il est

important de mentionner que les mêmes étapes sont réalisées avec des larves de moustiques).

Tout d'abord, que l'organisme soit filtreur ou brouteur, il faut que les cristaux présents dans le milieu aquatique puissent être capturés (figure 1a). Cette étape peut sembler banale mais considérant les multiples facteurs pouvant entraîner l'inaccessibilité des cristaux (sédimentation, adsorption, grosseur des particules, etc...), la capture demeure l'étape primordiale pour la réalisation d'une activité toxique.

Une fois le cristal capturé, il faut qu'il soit ingéré par l'organisme (figure 1b). Encore là, il peut sembler superflu de mentionner cette étape qui logiquement succède à la capture. Cependant, il arrive parfois que des larves puissent rejeter des particules ingérées (particules trop grosses, effets répulsifs, etc...). Si ce rejet se produisait avec des cristaux de B.t.i., les étapes conduisant à la mort de la larve seraient arrêtées.

Après l'ingestion des cristaux, il y a digestion de ces derniers au niveau de l'intestin moyen (figure 1c). L'intestin moyen des larves de diptères aquatiques est caractérisé par un pH alcalin (pH 10 à 11) et par une forte concentration et diversité en enzymes protéolytiques (Dadd, 1975). Le cristal et ses sous-unités sont des protoxines et

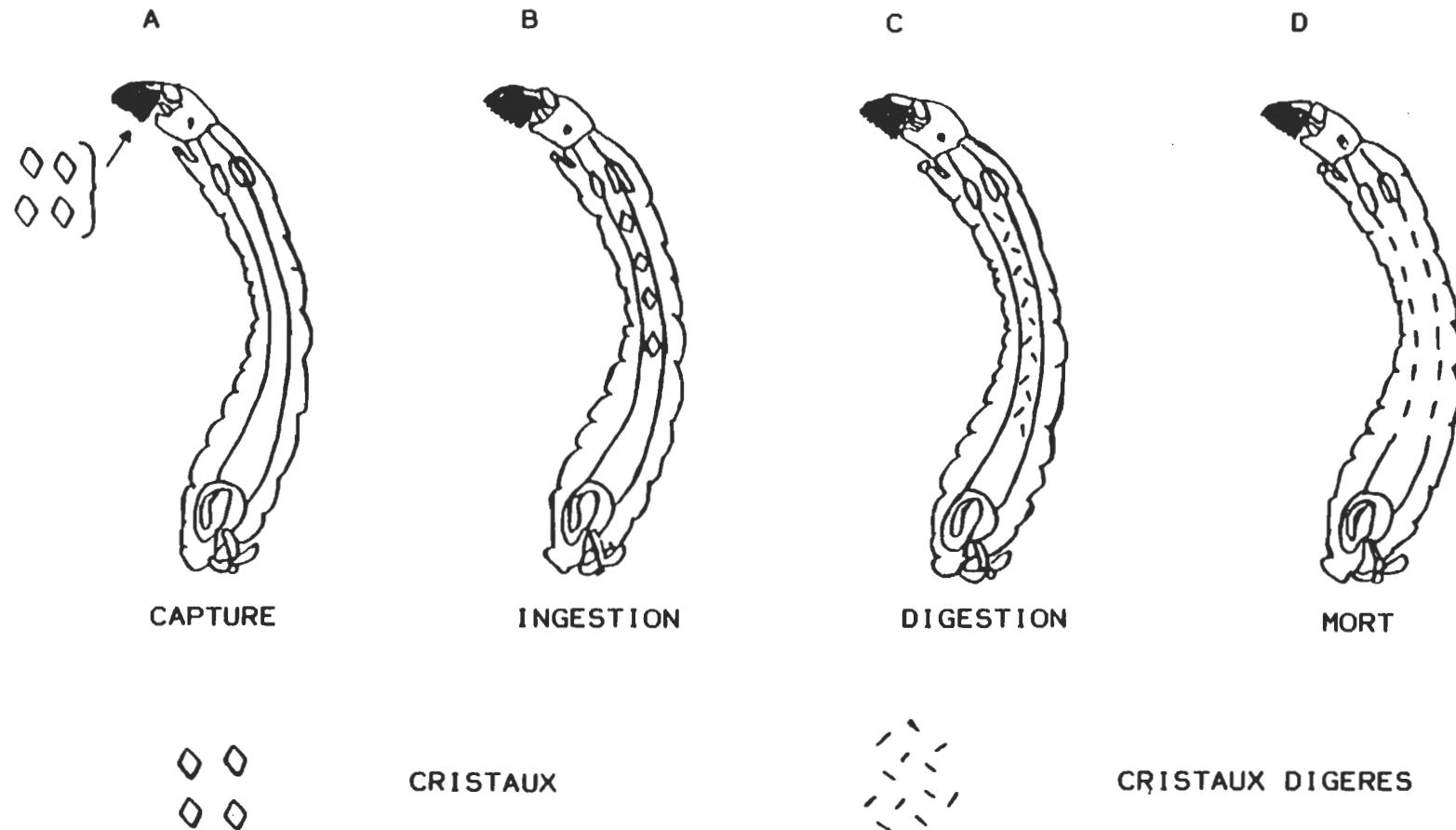


Figure 1. Mécanisme d'action des cristaux conduisant à une activité toxique.

ils ne démontrent aucune activité biologique sous cette forme. Cependant, lors de la digestion, la protoxine est transformée par les protéases et le pH basique de l'intestin sous sa forme de delta-endotoxine (LÜthy et Ebersold, 1981). La dissolution et l'activation se produisent rapidement et les premiers symptômes reliés à la toxicité se manifestent peu de temps après la dissolution, pour conduire finalement à la mort de la larve (figure 1d).

Du point de vue physiologique, le B.t.i. cause des effets myotoxiques et neurotoxiques chez les moustiques et les mouches noires (Federici, 1983). Chez des larves d'Aedes aegypti traitées au B.t.i., Singh et al (1986a,b) ont démontré que les muscles squelettiques gonflaient, la membrane plasmique se séparait des myofibrilles sous-jacentes et les mitochondries perdaient leur intégrité structurale.

La séparation de la membrane plasmique des myofibrilles sous-jacentes, qui coïncide dans plusieurs cas à une dépolarisation membranaire, suggère que l'effet causé par B.t.i. peut affecter la perméabilité membranaire et détruire l'intégrité osmotique des cellules musculaires. Une telle perte de la régulation osmotique peut en retour causer la destruction d'organelles cellulaires telles que les bandes d'actine et myosine, rendant ainsi les muscles squelettiques inopérants malgré les signaux du système nerveux central,

expliquant ainsi l'état de paralysie générale de la larve que l'on observe lors d'une intoxication au B.t.i..

Au niveau de l'intestin moyen, les principaux effets histopathologiques sont : 1) l'endommagement de l'épithélium strié bordant l'intestin, 2) le gonflement des cellules épithéliales, 3) la destruction des organelles cellulaires. Six heures après le traitement au B.t.i., on observe une sévère rupture de la paroi intestinale ainsi que le bris de la membrane péritrophique et de la lame basale (base lamina). Le gonflement des cellules épithéliales coïncide avec la cessation de la prise de nourriture tandis que l'état de paralysie générale (décrit précédemment) correspond à la rupture de la paroi intestinale.

### I.3 SITUATION DE L'ETUDE

Jusqu'à ce jour, un certain nombre de travaux ont été faits relativement à l'activité toxique de B.t.i. sous différentes conditions. La température, le pH, la toxicité pour des organismes cibles et non-cibles (faune annexe), les matières en suspension, la persistance, etc... sont autant de paramètres pouvant influencer l'activité toxique, qui ont été étudiés sur le terrain ou en laboratoire.

Depuis que l'utilisation de B.t.i. se fait sur une grande échelle, les études de persistance du produit dans l'environnement aquatique ont suscité un vif intérêt. Les

expériences faites par différents chercheurs démontrent que le temps de persistance de l'activité toxique est relativement court en milieu aquatique. Ces chercheurs semblent unanimes pour reconnaître que l'activité larvicide de B.t.i. était totalement disparue de 3 à 14 jours après le début de l'expérimentation (Lüthy et al., 1980; Sinègre et al., 1980c; Larget, 1981; Ramoska et al., 1981; Standaert, 1981; Hougard et al., 1983).

Toutefois, ces expériences ont été réalisées dans des conditions où la température de l'eau était relativement élevée (16 à 25° C). Dans ces expériences, le seuil où l'activité toxique devenait non-détectable par des essais biologiques justifiait l'arrêt des travaux. Les auteurs ne prenaient pas en considération qu'une réapparition éventuelle de la toxicité pourrait survenir plus tard.

Mais hypothétiquement, qu'arrive-t-il à la suspension larvicide une fois dans le milieu aquatique (par exemple, dans une mare à moustiques)?

L'activité toxique peut suivre différents cheminements dans le temps, soit :

- I) subir une baisse
- II) subir une augmentation
- III) demeurer stable
- IV) avoir un comportement cyclique dans le temps

Avant de voir en détail les différents cheminements possibles, il serait bon de bien distinguer la notion d'"activité toxique" par rapport "aux cristaux". En effet, une augmentation ou une baisse d'activité toxique n'est pas obligatoirement reliée à une augmentation ou une baisse de la quantité des cristaux dans l'environnement. Dans certains cas (ex.: un recyclage de spores ou une dénaturation du cristal), il se peut que l'activité toxique soit corrélée de façon positive avec les cristaux (soit dans le cas d'une augmentation ou d'une baisse). Toutefois, un nombre constant de cristaux dans l'environnement peut parfois amener une augmentation (ex.: remise en suspension de cristaux sédimentés) ou encore une baisse de l'activité toxique (ex.: adsorption sur divers substrats). L'important ici est de bien comprendre que l'activité toxique peut varier selon la quantité de cristaux présents dans le milieu ou encore selon leur disponibilité et ce indépendamment de leur nombre.

Maintenant voyons en détail les différents cheminements de l'activité toxique dans le temps.

I) Dans le cas d'une baisse, certains facteurs sont susceptibles d'affecter la toxicité ainsi que l'accessibilité des cristaux. Parmi ces facteurs, nous pouvons retrouver :

1) La dégradation et/ou la dénaturation de la protoxine par :

- a) la température
- b) le pH
- c) l'activité enzymatique
- d) les radiations solaires

2) L'inaccessibilité du cristal suite à :

- a) l'adsorption sur divers substrats naturels
- b) la sédimentation
- c) la modification de l'activité toxique sans dégradation ni dénaturation
- d) l'ingestion par d'autres organismes

Maintenant, regardons de plus près les facteurs qui peuvent conduire à une baisse d'activité.

1) La dégradation et/ou la dénaturation de la protoxine.

Ces facteurs peuvent être causés par les radiations solaires, dont les rayons ultra-violets, ou encore l'activité protéolytique du milieu. La température et le pH sont aussi d'autres facteurs pouvant affecter la protoxine.

a) La température

En ce qui concerne la température, les auteurs ne sont pas tous d'accord sur l'effet causé à l'activité toxique.

Ignoffo (1982) stipule qu'une formulation (liquide ou une poudre primaire) de B.t.i. peut perdre entre 85 et 98% de son activité insecticide après 28 jours d'exposition à 50° C. La structure amorphe du cristal de B.t.i. par rapport à la structure bi-pyramidaile des autres sous-espèces de B.t. serait la cause de cette perte d'activité. Dans cette structure amorphe, la toxine serait plus vulnérable aux effets de la température.

Cependant, Dempah (1979) mentionne que la température ne peut pas être considérée comme un facteur de dégradation de l'endotoxine puisqu'une exposition de 24 heures à 80° C n'entraîne pas de baisse d'activité. De plus, Sinègre (1980b) dit que la stabilité de l'endotoxine en milieu aqueux est totale après six mois de conservation à 10 et 35° C, tandis qu'Ignoffo et al (1981) mentionne qu'une suspension aqueuse contenant du B.t.i. reste stable pendant plus de 120 jours lorsque conservée à 30° C.

#### b) Le pH

Dans le cas du pH, certains auteurs ont trouvé une augmentation de la toxicité quand les larves de moustiques (Sinègre et al, 1980b) ou de mouches noires (Lacoursière et Charpentier, 1988) étaient exposées à des suspensions de B.t.i. à des pH croissants (5 à 9). Cependant, cette observation n'a pas été corroborée par d'autres auteurs

(Garcia et Desrochers, 1979; Mulligan et al., 1980; Ignoffo et al., 1981).

c) L'activité enzymatique

West (1984) suggère, à la suite de ses expériences sur la persistance des cristaux de B.t. sérovariété aizawa dans le sol, qu'une hydrolyse du cristal protéinique par des protéases pourrait dénaturer la toxine et compter pour une grande partie de la diminution de l'activité toxique.

Il est intéressant de noter que jusqu'à ce jour très peu de travaux ont traité de l'effet des protéases de l'environnement sur la toxine du cristal. Ces dernières peuvent pourtant jouer un rôle très important sur la persistance de l'insecticide, étant donné le nombre considérable de protéases présentes dans l'environnement qui peuvent dégrader la toxine de nature protéinique.

d) Les radiations solaires

Les auteurs ne semblent pas toujours s'accorder sur les effets des radiations solaires sur la persistance du larvicide.

Plusieurs s'entendent pour dire qu'une trop grande exposition aux rayons solaires contribue grandement à diminuer la viabilité des spores et des cellules végétatives (Ignoffo et Garcia, 1978), d'où une plus faible possibilité

pour le recyclage de spores. La viabilité des spores serait directement proportionnelle au temps d'exposition (Leong et al., 1980; Ishiguro et Miyazono, 1982). Cependant, des études par Mulligan et al. (1980) démontrent qu'une suspension larvicide de B.t.i. exposée directement aux rayons du soleil (700 - 11000 lux) pendant cinq heures conserve 100% d'efficacité. Par contre, une suspension larvicide de Bacillus sphaericus exposée dans les mêmes conditions voit son activité toxique réduite à 0% d'efficacité. Les deux mêmes suspensions placées à l'ombre pendant cinq heures ne subiront aucune diminution de leur activité (100% d'efficacité).

Si les divers facteurs mentionnés ci-haut réussissent à dégrader ou dénaturer la protoxine, celle-ci n'a plus aucun effet léthal, même si le cristal est ingéré et digéré.

## 2) L'inaccessibilité du cristal

Plusieurs facteurs peuvent faire en sorte que le cristal ne soit plus disponible pour la larve (au niveau de la capture) sous sa forme originale. Jusqu'à ce jour, peu d'auteurs se sont pourtant attardés sur ces facteurs. Ces derniers sont tout de même très importants à considérer, car bien que les cristaux conservent leur potentiel toxique, leur inaccessibilité compromet leur activité larvicide.

impliquant les ruisseaux avec et sans végétation (Frommer et al., 1981a,b,c,d). De plus, les résultats montrent de très fortes variations de toxicité (entre 30 et 90 %) et ils ne tiennent pas compte de la température ni de la variation des débits dans aucune de ces deux séries d'expériences.

Par contre, Dupont et Boisvert (1986) ont démontré que des morceaux de végétation, mis en présence de B.t.i. dans des conditions naturelles, pouvaient demeurer toxiques plus d'un an, ceci démontrant ainsi que les cristaux peuvent demeurer adsorbés très longtemps.

### b) La sédimentation

Dans ce cas, la perte de matière active peut être très considérable. Guillet et al (1980) ont démontré que 50 à 75% de la matière active contenue dans une suspension de B.t.i., faite à partir d'une poudre primaire pouvait être sédimentée après 4 heures et que la quasi-totalité était sédimentée après 24 heures. Sinègre et al (1981) ont aussi testé une suspension faite à partir d'une poudre primaire et ont évalué de leur côté, une perte de matière active par sédimentation de l'ordre de 90 à 95% après 24 heures.

Karch et Hougard (1986b) ont cependant observé à partir d'une suspension concentrée (TEKNAR<sup>R</sup>), une sédimentation de la matière active au bout de quelques heures, tandis que les spores demeuraient en suspension beaucoup plus longtemps. Chez Bacillus sphaericus, l'inclusion toxique étant associée à la spore (inclusion produite à l'intérieur de l'exosporium), la matière active demeure plus longtemps en suspension dans l'eau, augmentant du même coup la persistance de la toxicité (Karch et Hougard, 1986b). Si un jour, ce phénomène de flottabilité pouvait être exprimé génétiquement chez B.t.i., la persistance du produit pourrait alors être améliorée de beaucoup.

Toutes ces expériences ont été faites en bêcher et sont donc peu représentatives d'expériences qui seraient menées dans des mares à moustiques ou en ruisseau.

Comme on peut le voir, l'adsorption et la sédimentation sont des éléments qui peuvent causer l'inaccessibilité des cristaux et être à l'origine d'une baisse de toxicité dans le milieu. Cependant, il faut mentionner qu'ils concernent surtout les organismes filtreurs tels les mouches noires et certaines espèces de moustiques qui se nourrissent à la surface de l'eau (top feeders). Les organismes brouteurs pourraient encore subir les effets létaux de la toxine (adsorbée ou sédimentée) à condition que celle-ci n'ait pas été dénaturée ou dégradée. Cependant, étant donné que certains organismes brouteurs font une sélection des particules qu'ils ingèrent, il se pourrait que le cristal ne soit pas ingéré car il aurait acquis une nouvelle configuration (voir section "C" qui suit) ou parce qu'il serait devenu répulsif.

c) Modification de l'activité toxique sans dégradation ou dénaturation de la protoxine.

Cette modification peut prendre la forme d'une aggrégation ou d'une fragmentation des particules toxiques. Si par exemple nous avons 10 larves en présence de 10 cristaux et que chaque larve ingère et digère un cristal,

nous pourrions avoir 100 % de mortalité si on prend pour acquis qu'un seul cristal peut tuer une larve. Toutefois, si ces 10 cristaux s'agglomèrent en 2 groupes de 5 cristaux, ceci donne une nouvelle configuration au cristal qui ne sera peut-être plus susceptible d'être capturé (0% de mortalité). Advenant le cas où il pourrait être encore capturé, ingéré et digéré, nous n'aurions alors que 20% de mortalité (2 larves / 10). Donc, comme on peut le constater, il peut y avoir une baisse de l'activité, sans qu'il y ait eu une dégradation ou une dénaturation du cristal.

D'un autre côté, si nos cristaux se fragmentent en plusieurs petits cristaux, la toxicité peut demeurer inchangée s'il n'y a qu'une fraction毒ique dans le cristal. Donc, il n'y aura mort de la larve seulement si la fraction毒ique est ingérée et digérée. Ceci agit alors comme s'il n'y avait qu'un seul cristal, les autres fractions du cristal étant inactives. Cependant si la fraction毒ique est répartie partout dans le cristal et que les fragments sont capturés, il peut y avoir augmentation de la toxicité.

Bien que ces différents énoncés ne constituent que des hypothèses qui restent à être prouvées, il n'en demeure pas moins qu'elles sont tout à fait plausibles et démontrent que la capture et l'ingestion des cristaux sont des facteurs non négligeables à considérer lors d'études sur la persistance de la toxicité en milieu naturel.

#### d) Ingestion par d'autres organismes

L'ingestion des cristaux de B.t.i. peut être faite par certains organismes non-cibles, rendant ainsi ces cristaux inaccessibles pour les organismes visés. Selon les organismes impliqués (filtreurs ou brouteurs), certains pourront subir l'effet léthal du larvicide; comme par exemple, certaines espèces de baétidés, de chironomides et de blépharicéridés (Miura et al., 1980; Garcia et al., 1981; Mohsen et Mulla, 1982; Mulla et al., 1982; Back et al., 1985; Treverrow, 1985).

II) Dans le cas d'une augmentation de l'activité毒ique, celle-ci peut être reliée entre autre à la modification du cycle de reproduction de la bactérie. Chez Bacillus thuringiensis, le cycle de reproduction peut être modifié du cycle normal lorsque la bactérie rencontre des conditions adverses.

Dans le cas d'un cycle normal de reproduction où les conditions de croissance sont favorables, il y aura accroissement des cellules végétatives.

Cependant dans des conditions moins favorables où il y aura épuisement des ressources nutritives et/ou dans un contexte physico-chimique non-adéquat, la bactérie aura recours à la sporulation (propriété particulière des bactéries formant une endospore de résistance) pour pallier

aux conditions défavorables à la survie de la cellule végétative.

Chez le B.t.i., et aussi chez d'autres Bacillus, la formation de la spore s'accompagne de la production d'un cristal protéinique qui sera libéré dans le milieu ambiant.

Dans les formulations commerciales, nous retrouvons des cristaux, des spores et possiblement des cellules végétatives. Si ces cellules végétatives se retrouvent face à des conditions favorables, elles pourront produire d'autres cellules végétatives et les spores pourront aussi donner de nouvelles cellules végétatives, si les conditions pour germer sont présentes. Cependant, face à des conditions environnementales hostiles, des cellules végétatives pourraient sporuler et de ce fait, libérer de nouveaux cristaux. Ces derniers, relâchés en milieu aquatique, seront susceptibles de faire augmenter l'activité toxique ou de la faire réapparaître si celle-ci était devenue absente.

Cet aspect est important à considérer car une réapparition de toxicité peut survenir plusieurs jours ou mois après que la toxicité initiale soit disparue. C'est de cette éventualité que les premiers chercheurs n'ont pas tenu compte, ce qui les amenait à conclure sur la courte persistance de B.t.i..

Aujourd'hui, nous savons qu'un recyclage de spores est possible dans les cadavres de larves de moustiques, et ce autant de la part de B.t.i. (Aly, 1985; Aly et al., 1985; Khawaled et al., 1986; Zaritsky et Khawaled, 1986a,b,c) que chez Bacillus sphaericus (Davidson et al., 1984; Charles et Nicolas, 1986; Desrochers et Garcia, 1986; Karch et Coz, 1986a; Nicolas et al., 1987c). De plus, Dupont et Boisvert (1986) ont démontré que B.t.i. pouvait se recycler et relâcher de nouveaux cristaux en milieu naturel. Il est donc possible que les conditions environnementales (températures froides, manque de nutriments, etc...) favorisent la sporulation de cellules végétatives et causent une augmentation de la toxicité.

De plus, une désorption de cristaux rendus inaccessibles suite à une adsorption à des substrats naturels et/ou encore une remise en suspension de cristaux sédimentés peuvent aussi provoquer une augmentation de toxicité.

III) Comme troisième cheminement, il se pourrait que l'activité demeure stable dans le temps. Nous pouvons avancer l'hypothèse que les conditions environnementales (protéases, pH, u.v., etc...) favorisant la dégradation des vieux cristaux peuvent induire la formation de nouveaux cristaux via le processus de sporulation, ce qui pourrait créer une certaine stabilité au niveau de la toxicité. Il se pourrait

aussi que la toxine demeure stable à cause des températures froides.

IV) Considérant les nombreux facteurs qui peuvent entrer en interaction avec les cristaux, il est possible que la toxicité subisse des variations cycliques. Une influence combinée des trois éléments précédents (baisse, augmentation ou stabilité) sur la toxicité semble beaucoup plus probable que chacun des éléments pris individuellement.

#### I.4 BUT ET OBJECTIFS SPECIFIQUES

En milieu aquatique, les études de persistance de l'activité毒ique ont surtout été faites dans des régions comme le sud des Etats-Unis et l'Afrique, où les températures sont élevées.

Les conditions d'eaux froides et les variations importantes de température que l'on retrouve au Canada dans les zones nordiques d'épandage, représentent donc un élément important peu étudié.

Jusqu'à maintenant, quelques auteurs (Lacey et al., 1978; Molloy et al., 1981a,b; Wraight et al., 1981; Olejnicek, 1985; Lacoursière et Charpentier, 1988) ont démontré que l'activité toxicité était influencée (diminuée) par les basses températures, surtout au niveau de la capture, de l'ingestion et de la digestion des cristaux par les larves de mouches

noires. Les basses températures jouent un rôle non seulement sur l'efficacité du larvicide mais aussi sur la persistance de celui-ci.

Le but de notre étude est d'étudier la persistance de l'activité toxique du larvicide sous nos conditions environnementales. Les principaux objectifs spécifiques que nous nous sommes fixés pour mener à bien la réalisation de cette étude furent premièrement, d'étudier l'importance de facteurs environnementaux tels le pH, les protéases, la présence de divers substrats et les variations de température sur la persistance du B.t.i. en milieu aquatique; deuxièmement, de déterminer le rôle des cellules végétatives et des spores de B.t.i. dans un cas de recyclage de l'activité toxique résiduelle.

## CHAPITRE II

### MATERIEL ET METHODES

Dans le but de réaliser nos objectifs spécifiques, des expériences ont été effectuées sur le terrain ainsi qu'en laboratoire.

Pour étudier l'importance de différents facteurs environnementaux (pH, protéases, présence de substrats naturels et variations de température) sur une formulation de B.t.i., nous avons décidé de soumettre cette dernière à des conditions naturelles qui peuvent varier de façon aléatoire et non pas à des conditions contrôlées de laboratoire.

De plus, pour notre expérimentation, nous avons choisi une formulation commerciale de préférence à des cristaux purifiés de B.t.i., car nous voulions savoir si la présence de spores (que l'on retrouve dans les formulations commerciales) pouvait faire varier la persistance du larvicide.

Nous avons donc placé dans un étang des chambres environnementales contenant un insecticide biologique à base de B.t.i., et des substrats pouvant interagir avec celui-ci. La concentration de la formulation est bien définie, de même

que les quantités (volumes et/ou poids) des substrats mis en sa présence. Après un certain temps, des chambres environnementales sont retirées de l'étang et des tests en laboratoire sont effectués pour quantifier l'activité résiduelle du produit dans les chambres.

Nous devons quantifier et analyser l'effet des paramètres environnementaux qui ont pu affecter la persistance de l'insecticide. Tout d'abord, nous déterminons l'activité毒ique résiduelle présente dans la chambre environnementale à l'aide d'essais biologiques (bioessais). Ensuite, nous analysons les différents facteurs qui peuvent causer une variation potentielle d'activité, soit la température, le pH et les protéases.

Les résultats concernant la température et le pH sont obtenus lors des sessions d'échantillonnage, tandis qu'un test enzymatique sert à quantifier les protéases au laboratoire.

Toutefois, une variation de l'activité toxicité doit aussi être envisagée. Des décomptes bactériens (spores et cellules végétatives) sont alors faits en laboratoire, afin de vérifier s'il n'y aurait pas eu un recyclage de ces éléments dans le temps.

Finalement, l'analyse de toutes ces données, soient prises individuellement ou de façon combinée, nous aidera à

mieux comprendre le(s) mécanisme(s) de disparition du B.t.i. en milieu naturel.

### III.1 CHOIX DU SITE

Le choix d'un site représentatif des conditions climatiques des zones habituelles d'épandage est de rigueur pour étudier la persistance de l'insecticide.

Le site choisi fut le lac Troglodyte situé à la Réserve St-Maurice, localisée à environ 100 km au nord-ouest de Trois-Rivières (Québec, Canada) ( $46^{\circ} 57'$  Nord,  $73^{\circ} 02'$  Ouest).

Les caractéristiques recherchées sont simples, mais essentielles pour la bonne marche de l'étude. Tout d'abord, précisons que le Troglodyte est un lac dystrophe, légèrement acide (pH 6) et dont la profondeur n'excède pas deux mètres. Le pourtour du lac est circulaire et le diamètre d'environ 200 mètres. La bordure du lac se compose d'herbes aquatiques et de petits arbustes. Son aspect général rappelle celui d'un étang et ses caractéristiques en font un excellent gîte à moustiques. De plus, il est très accessible lors des échantillonnages.

Ce site reflète bien les diverses conditions qui caractérisent les zones cibles de traitement retrouvées habituellement dans les sites d'épandage plus nordiques.

### III.2 CHAMBRE ENVIRONNEMENTALE

Pour évaluer l'activité résiduelle du larvicide dans le milieu aquatique, nous devons être capable de le soumettre aux conditions environnementales tout en ayant la possibilité de le récupérer après un temps déterminé.

Le système qui permet la réalisation de ces diverses conditions consiste en l'emploi d'une chambre environnementale. La principale caractéristique de cette chambre est de contenir une quantité connue de larvicide en présence de divers substrats et ainsi permettre au larvicide d'être soumis aux différentes conditions régnant dans le lac, grâce à une membrane semi-perméable.

La chambre se compose d'un pot Mason (pot en verre de borosilicate) d'un volume de 525 ml. Le couvercle, ouvert en son centre, maintient une membrane semi-perméable et son rebord est scellé par un joint d'étanchéité (voir figure 2).

Les membranes utilisées sont faites de difluoride polyvynilidène (Millipore, U.S.A.) et possèdent une porosité de 0,22 µm , ce qui empêche les bactéries, spores et cristaux de sortir de la chambre environnementale. Une fois dans le lac, la porosité permet les échanges de gaz dissous, de protéases et de divers éléments chimiques et nutritifs dissous. De plus, le matériau composant la membrane rend

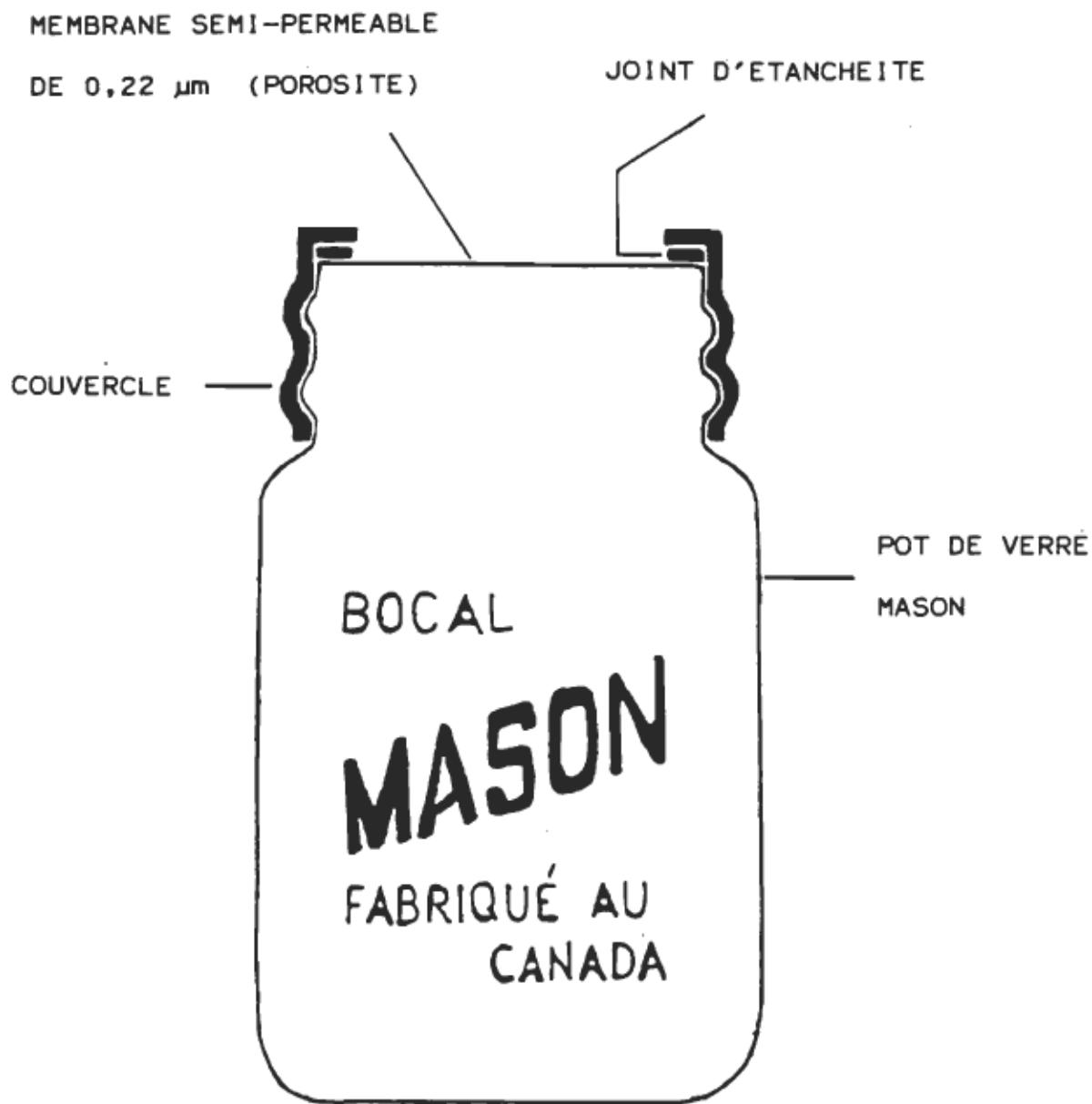


Figure 2. Schéma représentant les différentes composantes de la chambre environnementale.

celle-ci inerte, donc elle n'absorbe pas les sels minéraux, protéases, etc... et est non-biodégradable.

Donc les conditions du lac sont très semblables à l'intérieur comme à l'extérieur de la chambre environnementale. Nous avons alors comme avantage, la possibilité d'avoir un reflet assez précis de notre environnement aquatique.

### III.3 PREPARATION COMMERCIALE

La préparation commerciale utilisée est le TEKNAR<sup>R</sup> HPD (High Potency Dispersable) produit par la firme ZOECON LTD (Texas, U.S.A.). Cette préparation a été produite en 1985 et n'a fait l'objet que de très peu de travaux, ce qui contraste avec le TEKNAR<sup>R</sup> WDC (Water Dispersable Concentrate). Le TEKNAR<sup>R</sup> HPD est moins visqueux, se disperse mieux et contient deux fois plus d'unités toxiques que le WDC (3000 AA unités.mg<sup>-1</sup> par rapport à 1500). De plus, le HPD contient environ 10,000 fois moins de spores que le WDC.

Des essais biologiques en laboratoires ont déjà permis de déterminer que la CL<sub>50</sub> (concentration léthale qui tue 50% des individus) de l'insecticide face aux moustiques était inférieure à 1.6 mg.L<sup>-1</sup>. Etant donné les diverses conditions rencontrées dans le milieu aquatique, il est probable que notre activité毒ique subisse une baisse tout au long de la durée de l'expérimentation. Face à cette éventualité, nous

avons placé dans nos chambres environnementales une suspension larvicide concentrée de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . Ceci nous permet donc de pouvoir calculer de façon précise une perte d'activité de plus de 99%. Cette suspension est faite avec de l'eau déminéralisée stérile pour éviter les effets de contaminants indésirables.

#### III.4 SUBSTRATS

Pour la réalisation de l'étude, il est important de choisir des substrats représentatifs du milieu étudié. La végétation aquatique avec ses grandes surfaces de contact ainsi que le périphyton sont considérés comme une cause potentielle d'adsorption des cristaux. Cette adsorption pouvant amener une inaccessibilité des cristaux et du même coup une diminution de toxicité. De plus, la fraction active des cristaux étant de nature protéinique, l'adsorption peut aussi se faire aux sédiments sous l'effet d'interactions électrostatiques (Pussemier et de Borger, 1984).

Considérant les éléments exposés précédemment, les substrats choisis pour l'étude de persistance furent :

- 1) de l'eau de surface provenant du lac Troglodyte
- 2) des sédiments de surface (3-5 cm)
- 3) deux types de végétation
- 4) du périphyton

L'eau du lac a été récoltée à l'aide de bouteilles en plastique. Pour les sédiments, la récolte s'est faite à l'aide d'une benne Ekman (modèle 21 W 0156). Après analyse en laboratoire, les résultats ont démontré que les sédiments étaient constitués de 86,4% d'eau, de 8,5% de résidus volatiles (composés organiques) et de 5,1% de résidus fixes (composés inorganiques) (Standard method for the examination of water and wastewater, 15<sup>ème</sup> édition, 1981).

Le choix de deux types de végétation est justifié par le fait que l'on désire vérifier si les différentes surfaces de contact disponibles jouent un rôle sur la quantité de cristaux adsorbés. Le premier type recueilli est représenté par une graminée, soit le calamagrostis du Canada (Calamagrostis canadensis) qui pousse généralement dans les lieux humides et près des rivages. Le deuxième type est représenté par un mélange de feuilles et de racines de différentes graminées décomposées. Le calamagrostis du Canada est caractérisé par de longues feuilles effilées d'environ 2 à 5 mm de largeur tandis que le mélange de feuilles et de racines de graminées décomposées ressemble plutôt à de longs filaments très fins (comme des mèches de cheveux). Cependant à poids égaux, l'ensemble de feuilles et de racines possède une surface de contact plus grande que le calamagrostis.

En ce qui concerne le périphyton, des lames de verre ont été colonisées pendant un mois dans le lac, avant de les

placer en présence du larvicide dans les chambres environnementales. Les lames (lames pour microscopie), au nombre de 10, étaient placées sur un portoir (voir figure 3). Ce portoir avec lames nous permettait d'avoir une surface connue couverte par le périphyton.

### III.5 NATURE ET NOMBRE D'ECHANTILLONS

Voici maintenant les différents types d'échantillons qui ont été placés dans le lac Troglodyte :

- 1) Des échantillons contenant les divers substrats, plus du TEKNAR<sup>R</sup> HPD (HPD<sup>R</sup>) à 100 mg.L<sup>-1</sup>. Ces échantillons servent à suivre l'activité résiduelle du produit.
- 2) Des échantillons contenant les divers substrats, plus de l'eau du lac Troglodyte. Ces échantillons agissent comme des témoins servant à déterminer si les divers substrats ou encore les facteurs physico-chimiques diffusant dans les chambres environnementales ne deviendront pas une source de toxicité durant la durée de l'étude.
- 3) Des échantillons contenant les divers substrats, plus une formulation de TEKNAR<sup>R</sup> HPD mais sans spores ni cristaux (HPD<sup>R</sup> sp- cr-) à 100 mg.L<sup>-1</sup> (formulation fournie par ZOECON LTEE, U.S.A.). Ces échantillons servent à vérifier si cette suspension ( où baignent habituellement les cristaux ) ne



Figure 3. Figure montrant le portoir avec lames servant à la colonisation par le périphyton.

devient pas toxique dans le temps, en présence des divers substrats.

4) Des échantillons contenant seulement du TEKNAR<sup>R</sup> HPD (HPD<sup>R</sup>) ou du TEKNAR<sup>R</sup> HPD sans spores ni cristaux (HPD<sup>R</sup> sp-cr-); tous à une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup> d'eau déminéralisée stérile. Toutefois ici la membrane semi-perméable a été remplacée par un couvercle scellé. Ces échantillons (témoins scellés) ont pour but de vérifier la stabilité relative du larvicide dans le temps lorsque celui-ci n'est pas en contact avec les éléments diffuseurs, ni les substrats. Il ne subit que les variations de température.

Le tableau 2 présente ici le nombre d'échantillons pour chacun des substrats.

Tableau 2

Nombre d'échantillons pour chacun des substrats.

Substrats	HPD <sup>R</sup>	Eau du lac (témoins)	HPD <sup>R</sup> sp- cr-
Eau	10	5	3
Sédiments	10	5	3
Vég. type 1	10	5	3
Vég. type 2	10	5	3
Périmphyton	8	4	3
Témoin scellé	5	-	3

Le nombre total d'échantillons placés dans le lac a été déterminé en fonction de raisons bien précises, soit :

1) Considérant le fait que nous avions cinq substrats et que nous couvrions une période de cinq mois, le nombre d'échantillons placés dans le lac (95 échantillons) constituait un éventail assez grand pour avoir des résultats valables. Nous avons décidé de prendre cinq substrats plutôt qu'un seul car nous voulions connaître le comportement de l'activité toxique face à plusieurs substrats. Cependant, selon les résultats obtenus, il sera possible plus tard d'étudier 1 ou 2 substrats plus spécifiquement et ainsi avoir plus d'échantillons par substrat; donc une plus grande précision dans le temps des variations de la toxicité.

2) La préparation et la mise à l'eau de ces 95 échantillons ainsi que le traitement de ces mêmes échantillons (séparation des fractions, analyses microbiennes, enzymatiques et bioessais) demandaient beaucoup de temps pour une seule personne.

3) Nous devions prévoir à ce que l'élevage de moustiques puisse être capable de subvenir à nos besoins lors des essais biologiques.

## Exemple :

nombre minimal de larves (excluant les témoins) pour effectuer un bioessai :

Fourchette : 3 dilutions  $\times$  10 larves = 30

échantillon : 8 dilutions  $\times$  30 larves  $\times$  triplicat =  $\frac{720}{750}$

On a 95 fractions liquides et 69 fractions solides, ce qui fait en tout 164 essais biologiques (bioessais) à faire.

Donc, 164 bioessais  $\times$  750 larves = 123,000 larves  
bioessai

Pour les échantillons où il y a présence d'un substrat, chaque chambre environnementale se voit attribuer une quantité suffisante du substrat pour permettre une interaction significative avec la suspension larvicide. Pour chaque échantillon, nous notons le poids ou le volume de tous les éléments présents dans la chambre environnementale (tableau 3).

Toutes les chambres environnementales sont mises à l'eau dans des paniers de plastique et placées à l'aide d'ancres et de bouées de façon à être maintenues verticales à environ 0,5 m du fond et ce dans la partie la plus profonde du lac (2 mètres). En suspendant nos échantillons de cette façon, nous évitons ainsi le risque d'enlisement dans la boue et cela permet une meilleure circulation de l'eau autour de la chambre environnementale.

Tableau 3

Volume et poids des différents substrats placés dans les chambres environnementales.

Substrats	Poids ou volume	Volume de HPD <sup>R</sup> , eau du lac ou de HPD <sup>R</sup> sp- cr-
Eau	250 ml	complète à 525 ml
Sédiments	100 g	" " " "
Vég. type 1	30 g	" " " "
Vég. type 2	30 g	" " " "
Périmphyton	10 lames colonisées	" " " "

#### II.6 ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage s'est fait sur une période d'environ cinq mois. A partir du mois de mai, jusqu'à la fin de juin, nous avons récolté des échantillons à toutes les semaines. Pour cette période, quatre sessions d'échantillonnage ont été effectuées, soit le 30 mai ainsi que les 6, 13 et 20 juin 1985. Etant donné qu'à cette période de l'année la température est susceptible de subir de fortes variations, nous voulions savoir si ces écarts marqués de température influencerait la stabilité de l'activité toxique. Si jamais ces écarts de température influençaient la stabilité de l'activité toxique au cours du premier mois, nous aurions

alors un échantillonnage serré dans le temps qui nous permettrait de bien identifier cette période.

Durant la saison estivale, les prélèvements d'échantillons furent espacés de deux semaines étant donné la stabilité relative de la température, qui à ce moment se maintient autour du maximum. Au cours de cette période, cinq sessions d'échantillonnage furent réalisées, soit le 4 juillet, les 1<sup>er</sup>, 15 et 29 août ainsi que 12 septembre 1985.

Finalement, la dernière récolte faite le 23 octobre 1985, nous permettait d'avoir un échantillon qui de nouveau avait subit de gros écarts de température, écarts similaires à ceux qui se produisent au début de juin.

Lors des échantillonnages, nous avons relevé à chaque fois la température minimum-maximum à l'aide d'un thermomètre Taylor et des échantillons d'eau étaient amenés au laboratoire afin d'en déterminer le pH. Lors du transport au laboratoire, les échantillons d'eau ainsi que les chambres environnementales étaient maintenus à 4°C dans une glacière.

### III.7 PREPARATION DES FRACTIONS

Rendu au laboratoire, les échantillons ne contenant qu'une fraction liquide ne subissaient aucune modification, tandis que nous devions séparer la fraction liquide de la fraction solide pour les autres chambres environnementales

contenant ces deux types de fraction. Ces manipulations étaient nécessaires avant de pouvoir procéder aux différentes analyses (essais biologiques, comptes de spores et de cellules végétatives ainsi que des tests de protéases) faites séparément sur les fractions liquides et solides.

Avant de séparer les fractions, on brasse énergiquement les chambres environnementales pendant une minute. Ce brassage permet de ne garder adsorbé aux substrats que les cristaux ayant une affinité réelle pour le substrat présent.

Pour tous les substrats, sauf les sédiments, nous laissons reposer la chambre environnementale pendant cinq minutes suite au brassage. Ensuite nous décantons pour séparer la fraction liquide de la fraction solide, puis nous notons les volumes et les poids récupérés. Finalement, nous plaçons les différentes fractions dans des sacs de plastique (Whirlipacks). Pour les sédiments, nous devons laisser reposer 2,5 heures avant de décanter, sinon nous récupérons une trop grosse partie des sédiments dans la fraction liquide.

Comme il est impossible d'analyser immédiatement toutes les fractions obtenues lors d'un échantillonnage, les diverses fractions sont préservées à -30° C. Des expériences effectuées en laboratoire ont démontré que la congélation n'affecte pas la toxicité des cristaux, les décomptes de spores (Dupont, C.; données non-publiées) et les protéases

(Culling, 1974). Les auteurs Dagnogo et Coz (1982) ont aussi démontré que des températures de -20° C et -80° C n'avaient aucune influence sur l'activité toxique de Bacillus sphaericus.

### II.8 ESSAIS BIOLOGIQUES ET ANALYSES STATISTIQUES DES TESTS BIOLOGIQUES

Pour mesurer l'activité résiduelle de notre larvicide, des essais biologiques (bioessais) sont effectués sur toutes les fractions liquides et solides récupérées lors des échantillonnages.

Les essais biologiques sont faits à partir de larves de quatrième stade d'Aedes triseriatus (Say) élevées en laboratoire (Université du Québec à Trois-Rivières) et selon la méthode proposée par de Barjac et Larget (1979) et adoptée par l'Organisation Mondiale de la Santé (Rishikesh et Quélenne, 1983).

Pour chacune des fractions liquides de nos échantillons, huit dilutions sérielles (0,65 en 0,65) sont réalisées. L'objectif de cette procédure est d'obtenir au moins deux pourcentages de mortalité de part et d'autre de 50% et différents de 0 et 100 %.

Pour les différentes fractions solides, la procédure est quelque peu modifiée. Etant donné que nous ne pouvons pas

faire de dilutions sérielles à partir d'un même volume de départ, nous gardons le même principe de dilution (0,65 en 0,65) mais en plaçant individuellement le poids correspondant à notre dilution dans chaque contenant.

Exemple : dilution 1 = 6,5 g de végétation + 93,5 ml eau  
x 0,65      dilution 2 = 4,2 g de végétation + 95,8 ml eau  
x 0,65      dilution 3 = 2,7 g de végétation + 97,3 ml eau

Dans les deux cas (fractions liquides et solides), un volume de 100 ml de la suspension diluée reçoit 30 larves et chaque dilution est testée en triplicat.

Bien que la méthode proposée par de Barjac et Larget (1979) recommande que les tests biologiques soient répétés sur trois jours consécutifs afin de s'assurer de la constance du taux de mortalité pour une même dilution, il nous fut malheureusement impossible de réaliser cette étape. En effet, pour certains échantillons la quantité disponible (volume total) n'était pas assez élevée pour réaliser les tests sur trois jours consécutifs. De plus, avec le nombre total d'échantillons à tester, ceci aurait nécessité un total d'environ 370,000 larves, ce qui était techniquement impossible à obtenir considérant la productivité de notre élevage (2500 larves / semaine). Malgré le fait qu'il nous fut impossible de produire les tests sur trois jours consécutifs, nos résultats sont tout de même très valables

étant donné que la souche de moustiques utilisée, Aedes triseriatus, démontre des réponses très constantes dans le temps (très peu de variations au niveau des standards et entre les triplicats d'une même dilution).

Suite à ces dilutions, les larves sont maintenues en contact avec l'échantillon à tester pendant 24 heures dans des chambres de croissance maintenues constantes à 25° C. En effet, une variation de température lors des différentes expériences peut affecter la mortalité des larves.

Après 24 heures, on dénombre la quantité de larves vivantes et mortes ainsi que les nymphes. Etant donné que ces larves peuvent être nécrophages, le nombre de larves mortes est calculé en faisant la différence entre le nombre initial de larves (30) et les larves vivantes plus les nymphes après 24 heures. De plus, considérant que les nymphes ne sont pas affectées par le larvicide, leur nombre est aussi déduit du nombre initial de larves lors du calcul du pourcentage de mortalité. Si le nombre de nymphes dépasse 5%, le test n'est pas valable.

Afin de déterminer l'activité résiduelle de chaque échantillon, nous comparons les résultats obtenus à un standard de concentration connue. Une nouvelle suspension larvicide de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , préparée à partir de TEKNAR<sup>R</sup> HPD

gardée à 4° C au laboratoire, nous sert de standard lors de chaque série d'essais biologiques.

Récemment mis au point, le progiciel SPSSX (Norus, 1983) peut établir une relation linéaire pondérée entre la mortalité exprimée en "probit" et le logarithme de la concentration, en employant le "Maximum Likelihood Procedure" (Finney, 1971).

A partir de ce programme, nous pouvons déterminer la dilution de notre préparation originale qui causera 50% de mortalité ( $CL_{50}$ ). Afin de valider la droite "probit" et la  $CL_{50}$  obtenue, nous utilisons la distribution Khi-carrée avec  $k-2$  degrés de liberté ( $k$  = nombre de dilutions) et un intervalle de confiance au seuil de 95%.

Exemple : Calcul pour trouver l'activité résiduelle d'un échantillon.

$$\text{[1]} \quad \text{[}] \text{ en mg/l} = \frac{\text{dil. pour } CL_{50} \text{ du std}}{\text{dil. pour } CL_{50} \text{ de l'éch.}} \times \text{[}] \text{ mg/l du std}$$

$$\qquad\qquad\qquad \text{(2)} \qquad\qquad\qquad \text{(3)} \qquad\qquad\qquad \text{(4)}$$

Valeurs trouvées expérimentalement à l'aide d'essais biologiques (exemple)

$$(2) = 0,01$$

$$(3) = 0,10$$

$$(4) = 100 \text{ mg/l}$$

$$(1) = \frac{(2) \times (4)}{(3)} = \frac{0,01 \times 100 \text{ mg/l}}{0,10} = 10 \text{ mg/l}$$

Donc, notre échantillon contient l'équivalent de 10 mg/l de TEKNAR<sup>R</sup> HPD.

Au départ, lors de la mise à l'eau de nos échantillons, nous avions une concentration de TEKNAR<sup>R</sup> HPD de 100 mg/l pour chaque échantillon. Dans notre échantillon, il nous reste alors 10 % de notre activité originale, ou encore nous pouvons interpréter cette lecture de 10 mg/l comme étant une baisse de 90% de notre activité initiale.

$$\text{Exemple : } \frac{10 \text{ mg/l} \times 100}{100 \text{ mg/l}} = 10\% \text{ de l'activité initiale}$$

$$\therefore \frac{(100 \text{ mg/l} - 10 \text{ mg/l}) \times 100}{100 \text{ mg/l}} = 90\% \text{ de perte de notre activité initiale}$$

En effectuant ce calcul pour tous nos échantillons d'un même substrat, nous pouvons interpréter les différentes fluctuations (baisse, hausse ou stabilité) de notre activité larvicide en produisant un graphique de l'activité résiduelle en fonction du temps.

#### II.9 DECOMPTE DE SPORES ET DE CELLULES VEGETATIVES

Les comptes de spores et de cellules végétatives sont effectués afin de vérifier si, durant notre saison d'échantillonnage, un recyclage de spores et de cellules végétatives se serait produit. Dans l'affirmative (diminution des cellules végétatives et augmentation des spores), de nouvelles toxines pourraient être relâchées dans le milieu,

pouvant ainsi amener une augmentation substantielle de toxicité dans nos échantillons.

Les comptes de spores et de cellules végétatives ont été faits par la méthode d'étalage sur gélose décrite dans le "Standard method for the examination of water and wastewater" (15<sup>ème</sup> édition, 1981). Des dilutions (10 en 10 dans de l'eau phosphatée; Annexe A) provenant des fractions liquides de chaque échantillon sont ensemencées en triplicat sur un milieu NYPC (voir Annexe B), sélectif pour le B.t.i. (Yousten et al., 1982).

Pour les cellules végétatives, on place directement le liquide (1 ml ou 0.1 ml) sur la gélose et, suite aux ensemencements, on place à l'étuve à 37° C. Après 48 heures, on fait le décompte bactérien des géloses contenant entre 30 et 300 colonies. Toutefois, si à partir de notre solution pure le décompte est inférieur à 30, nous notons quand même le résultat obtenu. Ces résultats peuvent être plus ou moins valables statistiquement, mais ils peuvent être très indicatifs lors de l'analyse des données. Les colonies de B.t.i. sont ici facilement identifiables étant donné que sur ce milieu sélectif il n'y a que ces dernières qui poussent (si d'autres bactéries parvenaient à pousser, celles-ci seraient facilement distinguables par rapport au B.t.i.). Les colonies présentes correspondent alors à des cellules végétatives et/ou des spores ayant germées spontanément.

Pour les comptes de spores, la démarche est identique sauf que notre échantillon de départ (solution pure) est placée dans un bain-marie à 65° C pendant 15 minutes . Cette étape détruit les cellules végétatives sensibles à la chaleur laissant les spores intactes. Après traitement, les spores soumises à des conditions normales de croissance devraient germer et former des colonies sur boîte de Pétri.

Les décomptes de spores et de cellules végétatives ont été faits sur les fractions liquides seulement, et les résultats sont exprimés en nombre de spores ou de cellules végétatives par ml de l'échantillon liquide original.

#### II.10 TESTS DE PROTEASES

Comme on l'a vu précédemment, beaucoup d'éléments environnementaux peuvent causer la dégradation ou la dénaturation du cristal protéinique. Les enzymes protéolytiques (protéases) sont un de ces éléments qui, dépendant de leur concentration, peuvent avoir un effet sur la vitesse de dégradation de la toxine. Ces protéases sont des enzymes extracellulaires produites par différents organismes et présentes de façon naturelle dans les eaux du lac et les substrats solides.

Le test de protéases peut nous permettre d'amener des éléments supplémentaires d'information, pour expliquer une hausse ou une baisse de toxicité.

L'activité protéolytique des fractions liquides est déterminée à partir du test proposé par Martin et al (1981) en utilisant le substrat Azocoll. L'Azocoll est constitué d'un colorant (azo) fixé à une protéine insoluble, le collagène. Suite à l'activité protéolytique, une partie de la protéine (dépendant de la concentration de protéases) sera hydrolysée en petits peptides solubles colorés et libérés dans la fraction liquide. Une lecture de cette fraction liquide au spectrophotomètre nous donne l'activité enzymatique contenue dans chaque échantillon.

Le choix de substrat s'avère donc très intéressant, car il nous permet de quantifier de façon précise l'activité enzymatique contenue dans chaque chambre environnementale.

#### Procédure expérimentale

Dans des tubes jetables pour culture (13 x 100 mm) faits de verre borosilicate (Fisher, U.S.A.), on place 15 mg d'Azocoll (Calbiochem) auxquels on ajoute 0,5 ml de notre fraction liquide à tester et 0,5 ml de tampon phosphate (voir Annexe C). Ce mélange est incubé à 37° C pendant 3 heures et brassé à toutes les 30 minutes. Après le temps d'incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 3,5 ml de

HCl  $10^{-3}$  N. Par la suite, on filtre à travers de la laine de verre placée dans une pipette Pasteur et on récupère le filtrat. Une lecture d'absorbance du filtrat est faite au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 520 nm et comparée à un témoin (0,5 ml d'eau distillée remplace le 0,5 ml de notre solution à tester). Les unités sont exprimées en "unités d'activité enzymatique" (u.a.e.) / ml d'échantillon. Pour chaque échantillon testé, l'expérience est faite en triplicat.

Pour le calcul des unités nous considérerons les points suivants :

- 1) 1 unité d'activité enzymatique (u.a.e.) correspond à une augmentation de 0,001 de la densité optique par minute prise à une longueur d'onde de 520 nm ( $\Delta O_{520}$ ).
- 2) le temps d'incubation est de 3 heures (180 minutes)
- 3) notre solution se trouve à être diluée 9 fois lorsque la lecture est au spectrophotomètre, soit 0,5 ml de notre solution à tester dans 0,5 ml de tampon plus 3,5 ml de HCl  $10^{-3}$  N ( 0,5 ml dans 4,5 ml de solution totale).
- 4) on prend 0,5 ml de notre solution à tester et les unités finales se donnent en fonction de 1 ml de solution à tester. On doit donc multiplier notre valeur finale par deux pour obtenir une valeur pour 1 ml de solution à tester.

Donc par exemple, si notre lecture au spectrophotomètre nous donne 0,1 DO<sub>520</sub>, les unités finales seront :

$$\frac{0,1 \text{ DO}_{520}}{180 \text{ min}} \times \frac{1 \text{ u.a.e.}}{\frac{0,001 \text{ DO}_{520}}{1 \text{ min}}} = 0,555 \text{ u.a.e.}$$

On multiplie par 9 à cause des dilutions, soit :  
0,555 × 9 = 5 u.a.e.

On a 5 u.a.e. pour 0,5 ml de notre solution de départ, on doit alors multiplier par 2 pour ramener le tout à un ml, d'où 5 u.a.e. × 2 = 10 u.a.e. / ml.

Donc, en gardant les mêmes conditions pour chaque échantillon, nous nous apercevons d'après le calcul fait précédemment que nous n'avons qu'à multiplier nos lectures obtenues au spectrophotomètre par 100, et nous obtiendrons directement la valeur de nos unités par ml de l'échantillon liquide original.

## CHAPITRE III

### RESULTATS

Nous verrons dans un premier temps si les témoins placés en présence de divers substrats ont pu développer une certaine toxicité dans le temps. Par la suite, nous décrirons les différents résultats obtenus concernant les divers substrats (activité毒ique, décomptes de spores, de cellules végétatives et de protéases) ainsi que la température et le pH.

Les figures et les tableaux auxquels nous ferons référence dans le texte se retrouvent tous à la fin du présent chapitre (pages 73 à 84).

#### III.1 LES TEMOINS

Comme on peut le voir au tableau 4, les fractions solides des témoins "eau du lac" et "TEKNAR<sup>R</sup> HPD sans spores ni cristaux" (HPD<sup>R</sup> sp- cr-) ne démontrent aucune mortalité durant toute la saison d'échantillonnage. La fraction solide ne démontrant aucune toxicité, on peut s'attendre à ce que les fractions liquides soient aussi négatives. Toutefois, les fractions liquides montrent de légères mortalités (tableau 4).

Dans le tableau 4, nous quantifions la mortalité obtenue lors des essais biologiques en pourcentages moyens de mortalité, et non pas en équivalent de B.t.i. en mg.L<sup>-1</sup>, car il n'y a pas de B.t.i. dans ces témoins et les mortalités sont trop faibles.

Cependant, il est toujours possible (pour fins de comparaison) de faire correspondre ces pourcentages de mortalité à des valeurs exprimées en mg.L<sup>-1</sup> (comme dans le cas des valeurs obtenues lors du calcul de l'activité toxique résiduelle avec du B.t.i.).

Dans le cas de la fraction liquide avec "eau du lac", la moyenne des cinq pourcentages moyens de mortalité est d'environ 1.21 %, tandis que celle de la fraction liquide avec "TEKNAR<sup>R</sup> HPD sp- cr-" est d'environ 1.66 %. Considérant que la CL<sub>50</sub> (50 % de mortalité) pour un standard de B.t.i. correspond à environ 1.6 mg.L<sup>-1</sup>, nos pourcentages de mortalité pour nos deux fractions liquides équivalent respectivement à 0.036 mg.L<sup>-1</sup> et 0.049 mg.L<sup>-1</sup>, soit des valeurs 44 et 33 fois plus petites que le standard de B.t.i..

Il est aussi important de mentionner que dans le cas des fractions liquides de ces deux témoins, des larves d'Aedes atropalpus furent utilisées lors des essais biologiques. En effet, étant donné que théoriquement on s'attendait à ce que

tous ces tests soient négatifs, nous avons utilisé un lot de larves d'Aedes atropalpus, une souche sauvage provenant de dépressions rocheuses (rock pool), que nous possédions déjà au laboratoire. Tout ceci afin d'épargner notre élevage d'Aedes triseriatus, qui à ce moment-là était peu productif.

Les larves d'Aedes atropalpus étant gardées depuis déjà un certain temps à 4° C, il se peut qu'au moment de faire les essais biologiques, ces larves furent moins résistantes et que les mortalités obtenues soient de cause purement naturelle. Cette hypothèse devient très plausible si on considère que l'on a retrouvé des pourcentages de mortalité équivalents dans des témoins contenant seulement de l'eau distillée non-déminéralisée et des larves d'Aedes atropalpus.

Etant donné que nous avons obtenu de très faibles pourcentages de mortalité dans nos témoins (tableau 4) et que ces faibles pourcentages sont peu significatifs (pourcentages légèrement supérieurs ou égaux aux témoins faits avec de l'eau distillée non-déminéralisée), nous n'avons pas jugé bon de les soustraire de chaque pourcentage de mortalité obtenu avec les échantillons contenant du B.t.i..

Pour les témoins "TEKNAR<sup>R</sup> HPD scellé", on remarque en consultant la figure 4, que l'activité toxique demeure relativement stable lors des 42 premiers jours, celle-ci ne subissant qu'une baisse de 13 % entre les jours 0 et 42. La

toxicité subit cependant une très forte baisse entre les jours 42 et 98, l'activité n'étant plus qu'à 5 % de l'activité initiale. Finalement, la toxicité diminue jusqu'à 2 % de l'activité de départ (jour 152).

Pour les comptes de spores (tableau 5), on remarque une augmentation graduelle à partir du premier échantillon jusqu'au dernier; le décompte final atteignant environ trois fois la valeur du premier échantillon (jour 14).

Pour les cellules végétatives (tableau 5), celles-ci montrent une augmentation entre le premier et le deuxième échantillon. Par la suite, les valeurs vont toujours en décroissant pour finalement atteindre une valeur très près de zéro au jour 152.

Finalement, en ce qui a trait aux protéases, on voit d'après le tableau 5, que la quantité baisse de façon constante tout au long de l'échantillonnage (perte totale d'environ 50 %).

Il est intéressant de noter que dans les témoins "TEKNAR<sup>R</sup> HPD scellé", l'activité toxique, les cellules végétatives et les protéases suivent des cheminements similaires (à la baisse) après le deuxième échantillonnage, tandis que les spores suivent un cheminement tout à fait inverse.

### III.2 LES SUBSTRATS

Comme mentionné précédemment dans la section II.3, la concentration initiale de TEKNAR<sup>R</sup> HPD placée dans chaque chambre environnementale était de 100 mg.L<sup>-1</sup>. Les différentes concentrations de B.t.i. contenues dans nos échantillons et calculées à partir des essais biologiques sont alors comparées à notre concentration de départ, pour ainsi nous donner l'activité résiduelle contenue dans chaque chambre environnementale.

#### III.2.1 Substrat EAU DU LAC (figure 5 et tableau 6)

Après avoir subit une perte de 50 % au cours des deux premières semaines (jours 0 à 14), la toxicité demeure stable à ce niveau pendant les 14 jours suivants, soit jusqu'au jour 28 (points significativement semblables). Par la suite, entre les jours 28 et 42, nous assistons à une baisse considérable de l'activité toxique jusqu'à 5 % de la toxicité initiale, ce qui correspond à une perte de 90 % par rapport au jour 28. La toxicité demeure stable à ce niveau jusqu'au jour 70 (augmentation non-significative à ce point) pour ensuite décroître jusqu'à 1 % de l'activité de départ au jour 84. Jusqu'au jour 152, nous réussissons à détecter en moyenne environ 1 % de la toxicité de départ, ce qui correspond aussi aux mortalités retrouvées dans les témoins. Donc, on peut

dire qu'à partir du jour 84, il ne reste plus d'activité toxique.

Pour les comptes de spores et de cellules végétatives, le tableau 6 nous indique que dans les deux cas, les valeurs suivent des cheminement identiques. Tout d'abord, les décomptes subissent une forte baisse entre les jours 14 et 28. Par la suite, les valeurs montrent une très forte hausse entre les jours 28 et 42 pour rediminuer de nouveau (d'un facteur équivalent à la hausse précédente) au jour 70. Les valeurs réaugmentent entre les jours 70 et 84 et montrent par la suite une légère baisse jusqu'au jour 112. Finalement, les décomptes subissent une augmentation entre les jours 112 et 152.

Chez les protéases (tableau 6), les résultats montrent qu'à partir du jour 14, les valeurs sont toutes cyclées (valeur basse, valeur haute, valeur basse, etc...) mais en allant toujours vers des valeurs croissantes, et atteignant un sommet au jour 112. Chez les spores et les cellules végétatives, un sommet dans les décomptes est atteint dans les deux cas au jour 42.

### III.2.2 Substrat PERIPHYTON (Figure 6 et tableau 7)

Pour la fraction liquide des échantillons de périphyton, nous notons à la figure 6 qu'au jour 42, il ne reste que 40 % de l'activité initiale, soit une perte de 60 % par rapport au

jour 28 (dans ce cas-ci le jour 28 correspond au jour 0 étant donné le délai pour la mise à l'eau des échantillons de périphyton). A partir du jour 42, nous assistons à une baisse graduelle de la toxicité jusqu'au moment d'atteindre 1 % de la toxicité originale, ce qui constitue une perte de 98 % par rapport au jour 42. Par la suite, l'activité demeure stable à environ 2 % jusqu'à la fin.

Cependant, dans la fraction solide (figure 6), le premier échantillon (jour 42) démontre une activité résiduelle de  $12 \text{ mg.L}^{-1}$ . Ceci correspond à une augmentation significative, montrant ainsi que des cristaux ont été adsorbés au périphyton étant donné qu'à l'origine, lors de la mise à l'eau des échantillons, le périphyton était exempt de tous cristaux. De plus, les témoins des fractions solides du périphyton étant négatifs, la présence de toxicité confirmerait l'adsorption de cristaux. Par contre, on s'aperçoit que dès le deuxième échantillon (jour 70), et ce jusqu'au dernier (jour 152), on dénote aucune activité résiduelle sur le périphyton.

Maintenant au niveau des spores, on voit d'après le tableau 7 que, du jour 42 à 112, il est possible de considérer le nombre de spores comme étant constant (en considérant les intervalles de confiance). Ce n'est qu'entre les jours 112 et 152 que nous assistons à une augmentation des décomptes (environ deux fois plus).

Pour le décompte des cellules végétatives, celui-ci demeure constant du jour 42 à 84 (valeurs significativement semblables) pour ensuite subir deux baisses successives, soit aux jours 98 et 112. Finalement, comme dans le cas des spores, nous assistons à une hausse des cellules végétatives (augmentation d'environ 2.7 fois) entre les jours 112 et 152.

En ce qui a trait aux protéases, celles-ci réagissent de façon similaire à ce qui se passe dans le cas de "l'eau du lac". Nous constatons que les valeurs sont cyclées une à une mais tout en allant vers des valeurs croissantes; ces valeurs atteignant, encore ici, un sommet au jour 112.

### III.2.3 Substrat VEGETATION A (figures 7 et 8 et tableau 8)

Après avoir subit une forte perte d'environ 85 % après 7 jours (figure 7), une faible toxicité résiduelle, soit en moyenne 12 % de l'activité initiale, caractérise la fraction liquide des jours 7 à 28. Entre les jours 28 et 42, nous assistons à une augmentation significative de l'activité toxique. Celle-ci augmente à un taux correspondant à 58 % de l'activité initiale, soit une hausse d'environ 5 fois par rapport au jour 28. Suite à cette forte hausse, l'activité demeure stable jusqu'au jour 70 pour ensuite subir une baisse

jusqu'à un taux moyen d'environ  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  pour les jours 84, 98, 112 et 152.

Pour la fraction solide (figure 8), nous remarquons que les plus fortes concentrations de TEKNAR<sup>R</sup> se retrouvent principalement dans les deux premières semaines (jours 7 et 14). Il faut se rappeler ici que, comme dans le cas du périphyton, lors de la mise à l'eau des échantillons contenant de la végétation, cette dernière était exempte de B.t.i.. Le fait de détecter la présence de toxicité sur la végétation est alors très significatif. Par la suite, nous détectons de l'activité toxique sur la végétation jusqu'au jour 152 mais à des concentrations toutefois inférieures à  $1 \text{ mg.g}^{-1}$ , soit en moyenne  $0.655 \text{ mg.g}^{-1}$  (figure 8).

Pour les comptes de spores (tableau 8), on remarque qu'au cours des deux premières semaines (jours 7 à 14), les décomptes sont stables. Entre les jours 14 et 21, il y a augmentation des comptes d'environ du double, et suite à cette hausse, les décomptes demeurent stables jusqu'au jour 28. Cette stabilité est suivie d'une très forte baisse (diminution d'environ 17 fois entre les jours 28 et 42), qui est immédiatement suivie d'une hausse (jour 70) qui ramène les décomptes à une valeur similaire à celle du jour 28. Au jour 84, les spores subissent de nouveau une baisse (environ cinq fois) pour remonter, mais à un taux moindre au jour 98. Finalement, les décomptes baissent à une valeur très basse au

jour 112 et restent ainsi stables jusqu'au dernier échantillon (jour 152).

Pour les cellules végétatives (tableau 8), les décomptes sont stables jusqu'au jour 21 pour ensuite subir une hausse d'environ 3 fois entre les jours 21 et 28. Les cellules végétatives subissent par la suite une forte chute entre les jours 28 et 42, suivie d'une très forte hausse entre les jours 42 et 70. Suite au jour 70, le décompte des cellules végétatives demeure à un niveau assez stable mais avec des valeurs plus faibles qu'au début de la saison d'échantillonnage.

De leur côté, les protéases démontrent des valeurs qui peuvent être regroupées en trois groupes distincts et qui forment un cycle, soit les jours 7 à 21 (moyenne de 8.1), les jours 28 à 98 (moyenne de 28.8) et les jours 112 à 152 (moyenne de 15.4). On remarque que la période où l'on retrouve de fortes quantités de protéases (jours 28 à 98) correspond à la période où il y a de nombreuses variations dans les décomptes de spores et de cellules végétatives.

#### III.2.4 Substrat VEGETATION B (figures 7 et 8 et tableau 8)

A l'inverse de la végétation A, la végétation B démontre au cours des trois premières semaines une très bonne persistance de l'activité résiduelle dans la fraction

liquide. Après une perte d'activité de 40 % après 14 jours, l'activité reste stable à environ 60 % de l'activité de départ puis subit une baisse jusqu'à 28 % de la toxicité originale entre les jours 21 et 28 (diminution d'environ 53 % par rapport au jour 21). Par la suite, l'activité résiduelle demeure relativement stable entre les jours 28 et 84. A partir du jour 84, la toxicité subit une baisse graduelle pour finalement atteindre 2 % de la toxicité initiale au jour 152.

Pour la fraction solide, on voit à la figure 8, qu'après 21 jours, peu de toxicité se retrouve sur la végétation (concentration inférieure à  $1 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Cependant, aux jours 28 et 42, nous atteignons les plus hauts taux décelés dans des échantillons, soit 16 et  $1500 \text{ mg.g}^{-1}$ . Par la suite, nous assistons à une baisse graduelle d'activité dans les fractions solides et ce jusqu'au jour 152, où nous avons une concentration d'environ  $0.6 \text{ mg.g}^{-1}$ . Par contre, entre les jours 42 et 84, le jour 70 fait exception en démontrant une très forte perte d'activité.

Maintenant, en ce qui concerne les décomptes de spores (tableau 8), ceux-ci demeurent stables et élevés entre les jours 14 et 28 pour ensuite subir une baisse (diminution d'environ la moitié) entre les jours 42 et 70. Au jour 84, les décomptes remontent à des valeurs semblables à celle du premier mois, mais entre le jour 84 et 98, il y a de nouveau

une baisse des valeurs (environ quatre fois). Finalement, les décomptes demeurent stables et peu élevés entre les jours 98 et 152.

Les décomptes de cellules végétatives (tableau 8) de leur côté montrent dès le début (jour 14) un très haut décompte qui diminue cependant de moitié dès la semaine suivante (jour 21). Au jour 28, les cellules végétatives remontent à une valeur plus élevée, mais intermédiaire aux deux précédentes. Les cellules végétatives subissent une autre baisse au jour 42 (diminution de moitié par rapport au jour 28) et demeurent stables jusqu'au jour 98 (valeurs statistiquement semblables). Entre le jour 98 et 112, il y a une augmentation d'environ trois fois du décompte pour finalement subir une nouvelle baisse d'environ quatre fois au jour 152.

Pour les protéases, on s'aperçoit que les valeurs varient soit à la hausse ou à la baisse tout au long de la saison d'échantillonnage. Dans ce cycle on remarque deux des plus fortes quantités de protéases obtenues (incluant tous les substrats) soit, 41.4 (jour 70) et 46.0 u.a.e./ ml (jour 112).

### III.2.5 Substrat SEDIMENTS (tableau 9)

Après 7 jours seulement, il ne reste que 4 % de l'activité initiale dans la fraction liquide (tableau 9). A

partir du jour 14, déjà nous ne détectons qu'à de très faibles concentrations (inférieures à  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) la présence de toxicité (tableau 9).

Au niveau des fractions solides (tableau 9), le même phénomène se produit; une faible activité de l'ordre de  $2.35 \text{ mg.L}^{-1}$  peut être détectée dans le premier échantillon. Toutefois, à partir du jour 14, nous ne détectons qu'à de très faibles concentrations la présence de toxicité.

Pour les comptes de spores (tableau 9), les résultats montrent que le décompte du jour 7 présente une très haute valeur mais que par la suite, entre les jours 14 et 28, les décomptes sont nettement plus bas (entre 6 et 9 fois plus bas) mais stables. Au jour 42, les spores remontent à une très haute valeur (augmentation de sept fois par rapport au jour 28). Suite à cette forte hausse, les valeurs diminuent de nouveau mais de façon graduelle pour atteindre au jour 98 une valeur similaire à celle du jour 28. Au jour 112, on augmente d'un peu plus du double le nombre de spores du jour 98 pour finalement resubir une forte perte (diminution d'environ 6.5 fois) au jour 152. Notons ici que c'est la première fois que nous retrouvons certains décomptes de spores aussi élevés (jour 7 = 600, jour 42 = 780, jour 70 = 420).

Pour les comptes de cellules végétatives (tableau 9), ceux-ci montrent le même cheminement que les spores au cours du premier mois. Au jour 7, le compte de cellules végétatives est très élevé, mais entre les jours 14 et 28, les décomptes diminuent quelque peu, mais demeurent stables. Au jour 42, les cellules végétatives subissent une baisse, mais remontent dès le jour 70 pour de nouveau baisser au jour 84 à une valeur équivalente à celle du jour 42. Une augmentation d'environ trois fois survient au jour 98, pour encore revenir au taux précédent au jour 112 et finalement demeurer stable jusqu'au jour 152.

Pour les protéases, les valeurs cyclent, d'une valeur haute à basse, à partir du jour 7 jusqu'au jour 70. A partir du jour 84, les valeurs demeurent stables et basses jusqu'à la fin, exception faite du jour 98 où nous retrouvons la plus forte valeur jamais enregistrée, soit 47.6 u.a.e./ml.

### III.3 TEMPERATURE ET pH (figure 9)

Le pH demeure très stable durant toute la saison, les valeurs allant de 5.8 (au début et à la fin de la saison) à 6.0 (au milieu de la saison).

Pour la température, elle a fluctué selon la saison. La valeur moyenne pour les températures minima au cours de la saison d'échantillonnage fut de 13.7° C tandis que la valeur moyenne pour les températures maxima fut de 17.5° C.

Les plus gros écarts de température entre la température minimum et maximum lors d'un échantillonnage furent aux jours 42, 70, et 152 avec des écarts respectifs de 6.0°, 5.0° et 10.0° C. La plus basse température fut enregistrée entre le 12 septembre et le 23 octobre 1985 (jours 112 et 152) et était de 6° C, tandis que la plus haute fut enregistrée entre le 1<sup>er</sup> et le 29 août 1985 (jour 70 et 98) et était de 22° C.

TABLEAU 4

Pourcentages moyens de mortalité des témoins "eau du lac" et  
 "TEKNAR<sup>R</sup> HPD sp- cr-".

Témoin	Fraction	Substrat	# Témoins	% moyen mort.*
Eau du lac	Liquide	Eau	5	1.85 %
		Veg A	5	1.93 %
		Veg B	5	0.44 %
		Sédiments	5	0.70 %
	Solide	Périmyton	4	1.13 %
		Veg A	5	0 %
		Veg B	5	0 %
		Sédiments	5	0 %
HPD <sup>R</sup> sp- cr-	Liquide	Périmyton	4	0 %
		Eau	3	4.56 %
		Veg A	3	0.77 %
		Veg B	3	2.22 %
	Solide	Sédiments	3	0 %
		Périmyton	3	0.75 %
		Veg A	3	0 %
		Veg B	3	0 %
		Sédiments	3	0 %
		Périmyton	3	0 %

\* Chez les témoins faits avec de l'eau distillée non-déminalisée, on ne dénombrait aucune mortalité (0 % de mortalité).

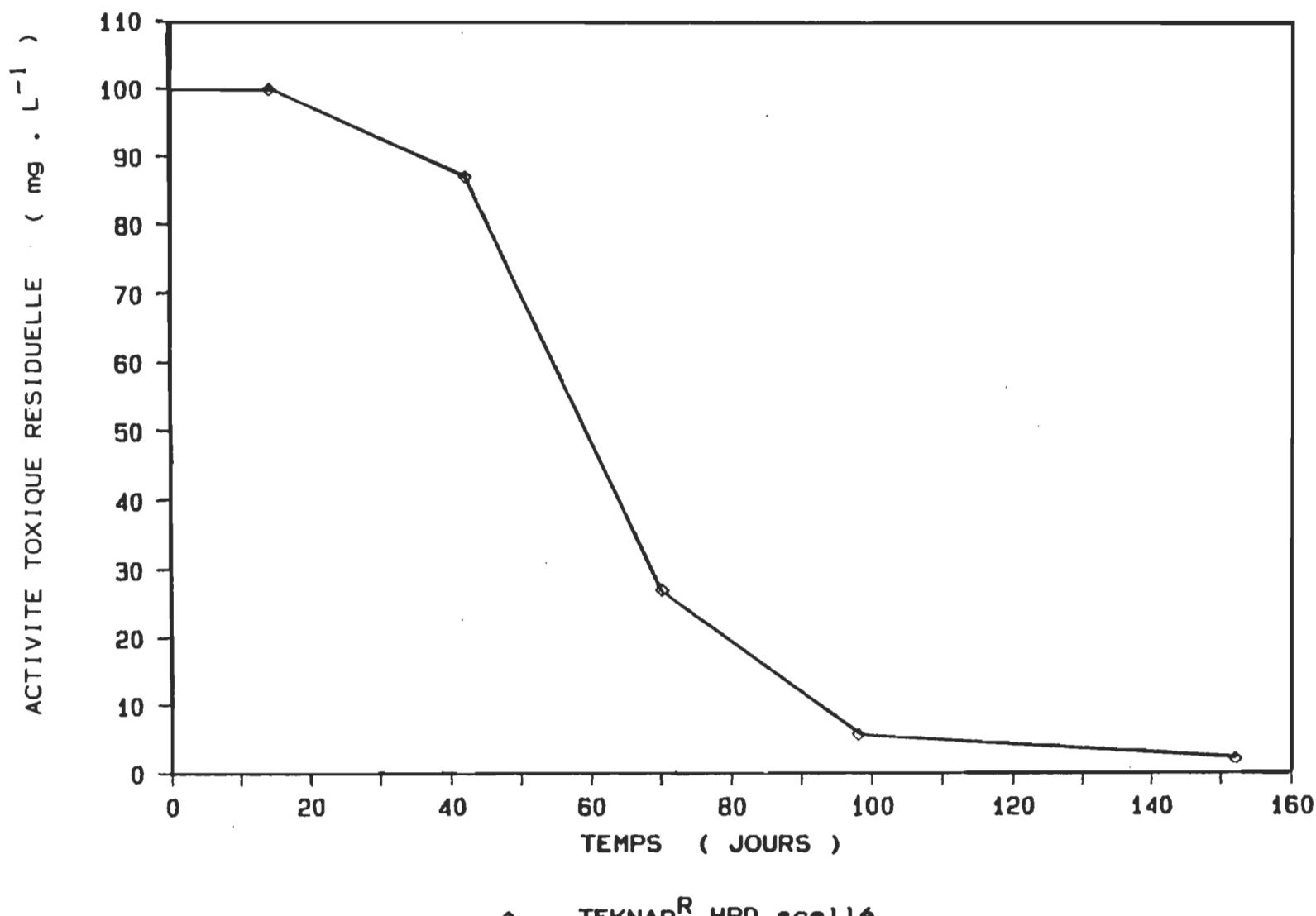


Figure 4. Graphique de l'activité résiduelle du témoin TEKNAR<sup>R</sup> HPD scellé en fonction du temps.

TABLEAU 5

Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans le témoin TEKNAR<sup>R</sup> HPD scellé.

<u>JOURS</u>	<u>HPD SCELLE</u>		
	SPORES (UFC/ml)	C. VEG. (UFC/ml)	PROTEASES (u.a.e./ml)
7	----	----	----
14	22*	37	14.8
21	----	----	----
28	----	----	----
42	30	60	12.8
70	57	23*	9.4
84	----	----	----
98	65	2.3*	6.7
112	----	----	----
152	62	0.3*	7.2

\* Voir le texte dans MATERIEL ET METHODES (p. 53) sur les comptes inférieurs à 30 colonies.

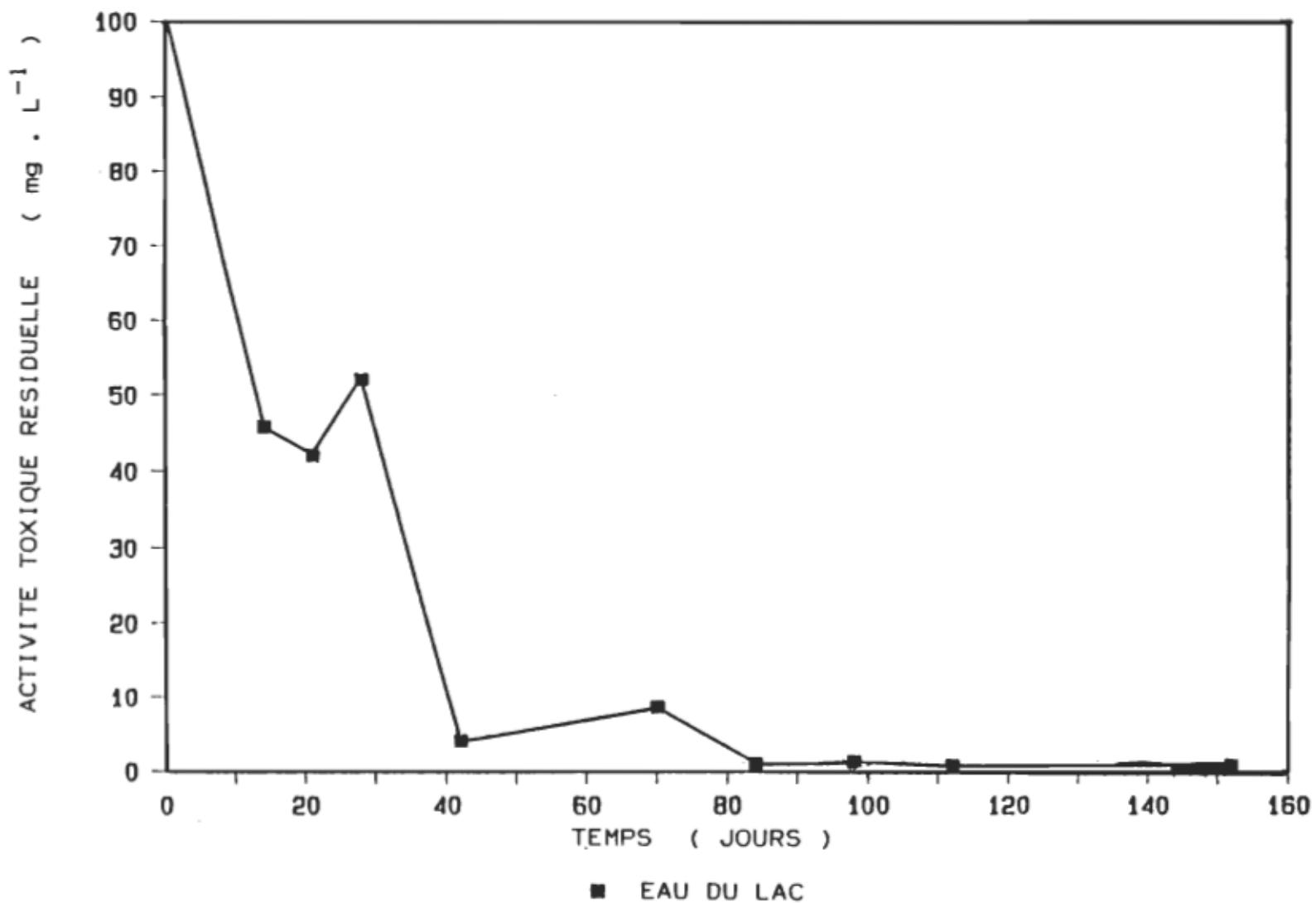


Figure 5. Graphique de l'activité résiduelle de l'eau du lac en fonction du temps.

TABLEAU 6

Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans l'eau du lac.

<u>JOURS</u>	<u>EAU DU LAC</u>		
	SPORES (UFC/ml)	C. VEG. (UFC/ml)	PROTEASES (u.a.e./ml)
7	*	----	----
14	118	176	4.0
21	58	70	4.5
28	26	30	2.2
42	176	250	6.1
70	19	17	2.5
84	76	70	12.0
98	46	13	10.6
112	42	30	33.2
152	93	126	21.4

\* Données non-disponibles

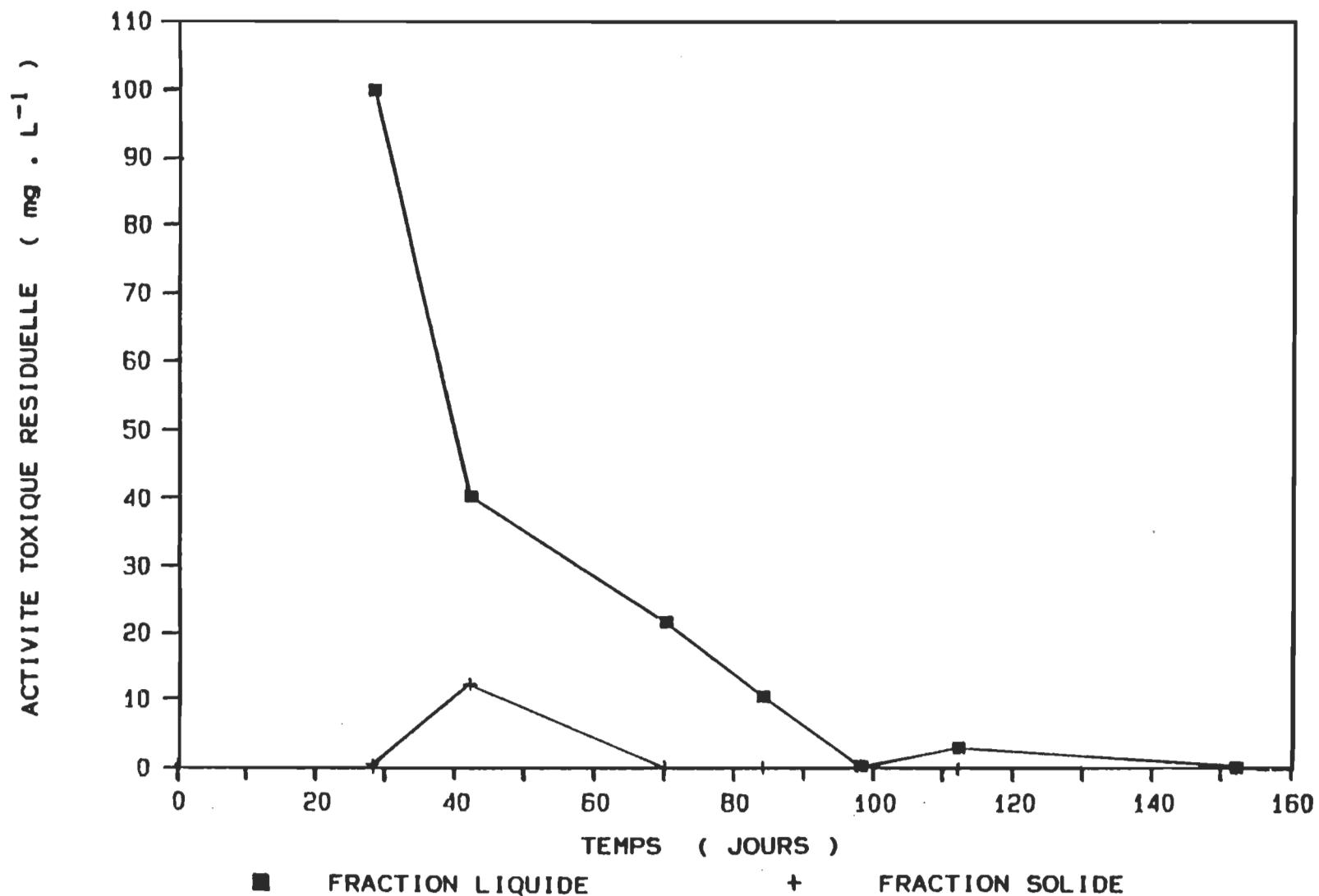


Figure 6. Graphique de l'activité résiduelle des fractions liquides et solides du périphyton en fonction du temps.

TABLEAU 7

Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans les fractions liquides du périphyton.

<u>JOURS</u>	<u>PERIPHYTON</u>		
	SPORES (UFC/ml)	C. VEG. (UFC/ml)	PROTEASES (u.a.e./ml)
7	----	----	----
14	----	----	----
21	----	----	----
28 *	----	----	----
42	117	93	14.6
70	127	100	21.5
84	135	120	20.0
98	87	70	10.4
112	127	30	32.6
152	233	80	15.9

\* Ceci correspond au jour 0 pour les échantillons de périphyton.

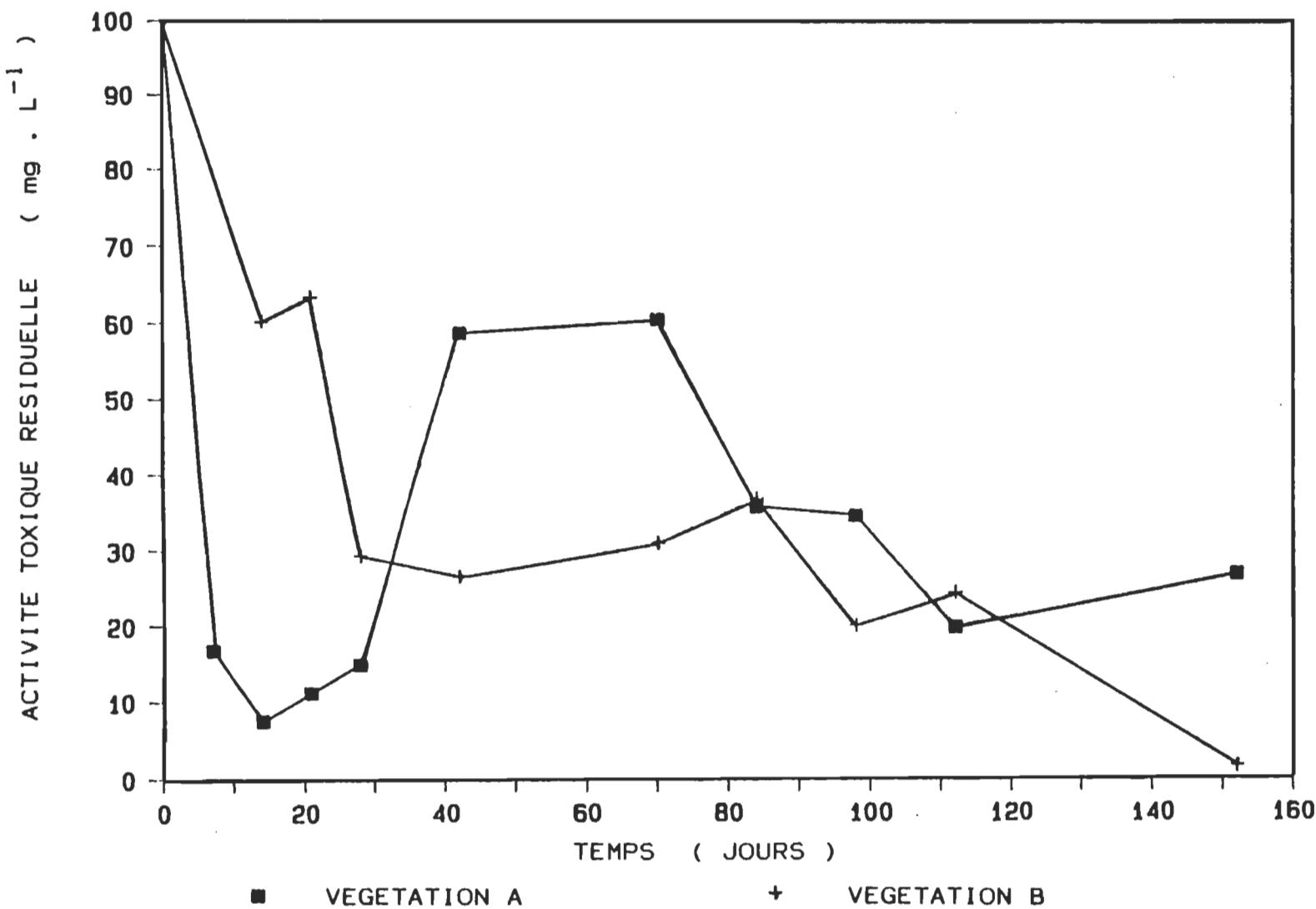


Figure 7. Graphique de l'activité résiduelle des FRACTIONS LIQUIDES de la végétation A et de la végétation B en fonction du temps.

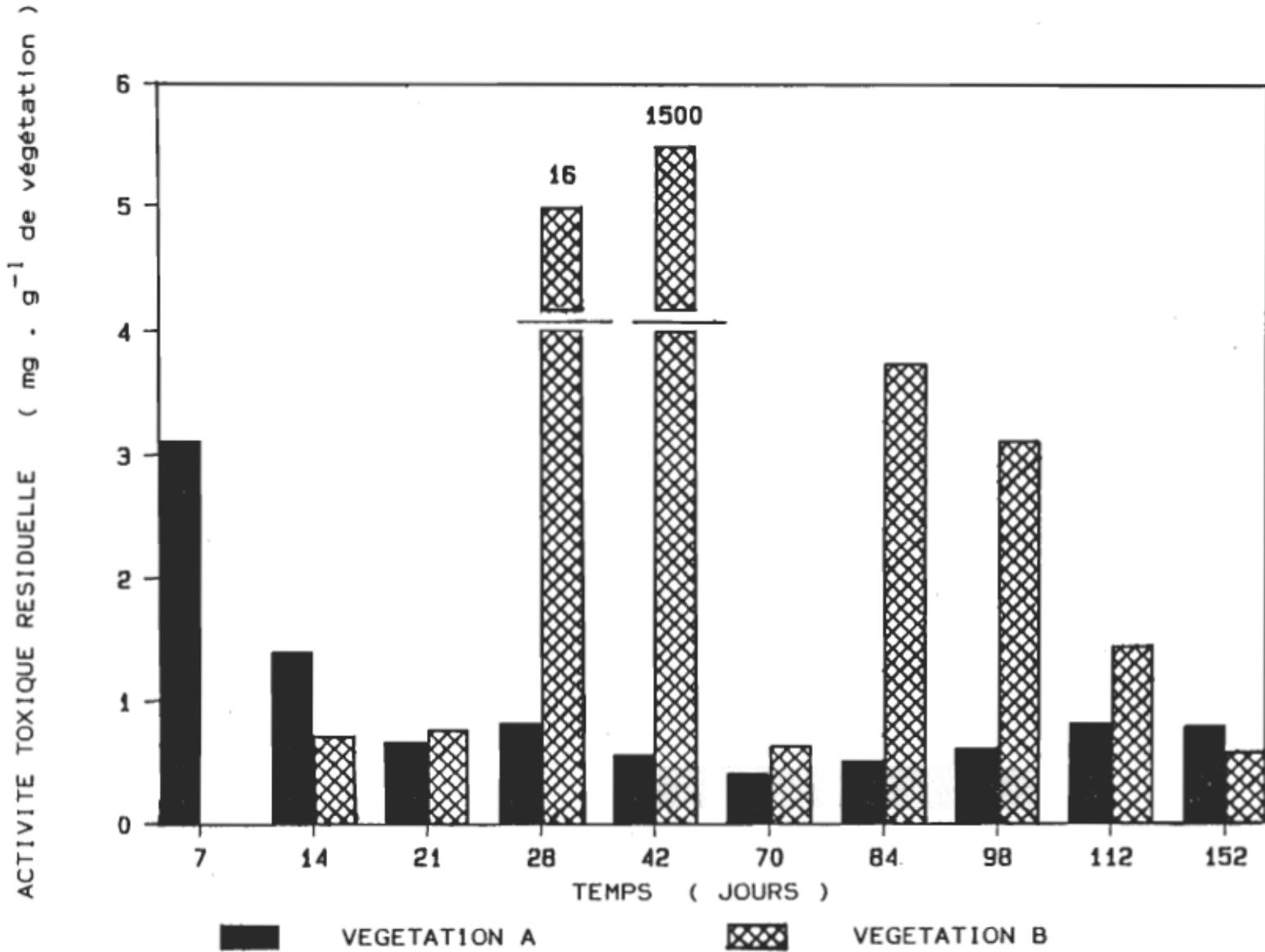


Figure 8. Graphique de l'activité résiduelle des FRACTIONS SOLIDES de la végétation A et de la végétation B en fonction du temps.

TABLEAU 8

Nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de protéases contenues dans les fractions liquides de la végétation A et de la végétation B.

<u>JOURS</u>	<u>VEGETATION A</u>			<u>VEGETATION B</u>		
	SPORES C. VEG. PROTEASES		( u.a.e./ml )	SPORES C. VEG. PROTEASES		( u.a.e./ml )
	( UFC/ml )	( u.a.e./ml )		( UFC/ml )	( u.a.e./ml )	
7	123	117	6.6	*	---	---
14	107	93	8.6	255	422	26.6
21	233	100	9.2	230	200	21.6
28	223	280	34.5	230	336	9.2
42	13	33	28.7	110	150	15.8
70	206	121	29.4	118	166	41.4
84	40	60	21.6	260	103	23.4
98	103	97	30.0	60	120	23.8
112	13	33	13.6	57	390	46.0
152	16	53	17.2	13	100	16.2

\* Données non-disponibles

TABLEAU 9

Activité toxique résiduelle (fraction liquide et solide),  
 nombre de spores, de cellules végétatives et d'unités de  
 protéases contenues dans les sédiments.

<u>JOURS</u>	<u>SEDIMENTS</u>			
	ACTIVITE TOXIQUE*	SPORES	C. VEG.	PROTEASES
	(liquide)*	(solide)*	(UFC/m1)	(UFC/m1)(u.a.e./m1)
7	4.13	2.35	600	400
14	** 0.00	0.00	67	290
21	0.00	0.00	83	323
28	0.00	0.00	107	323
42	0.00	0.00	780	136
70	0.00	0.00	420	290
84	0.00	0.00	173	137
98	0.00	0.00	106	443
112	0.00	0.00	256	150
152	0.00	0.00	40	190

\* Les unités de l'activité toxique sont en mg.L<sup>-1</sup>.

\*\* La valeur 0 signifie ici des valeurs inférieures à 0.1 mg.L<sup>-1</sup>.

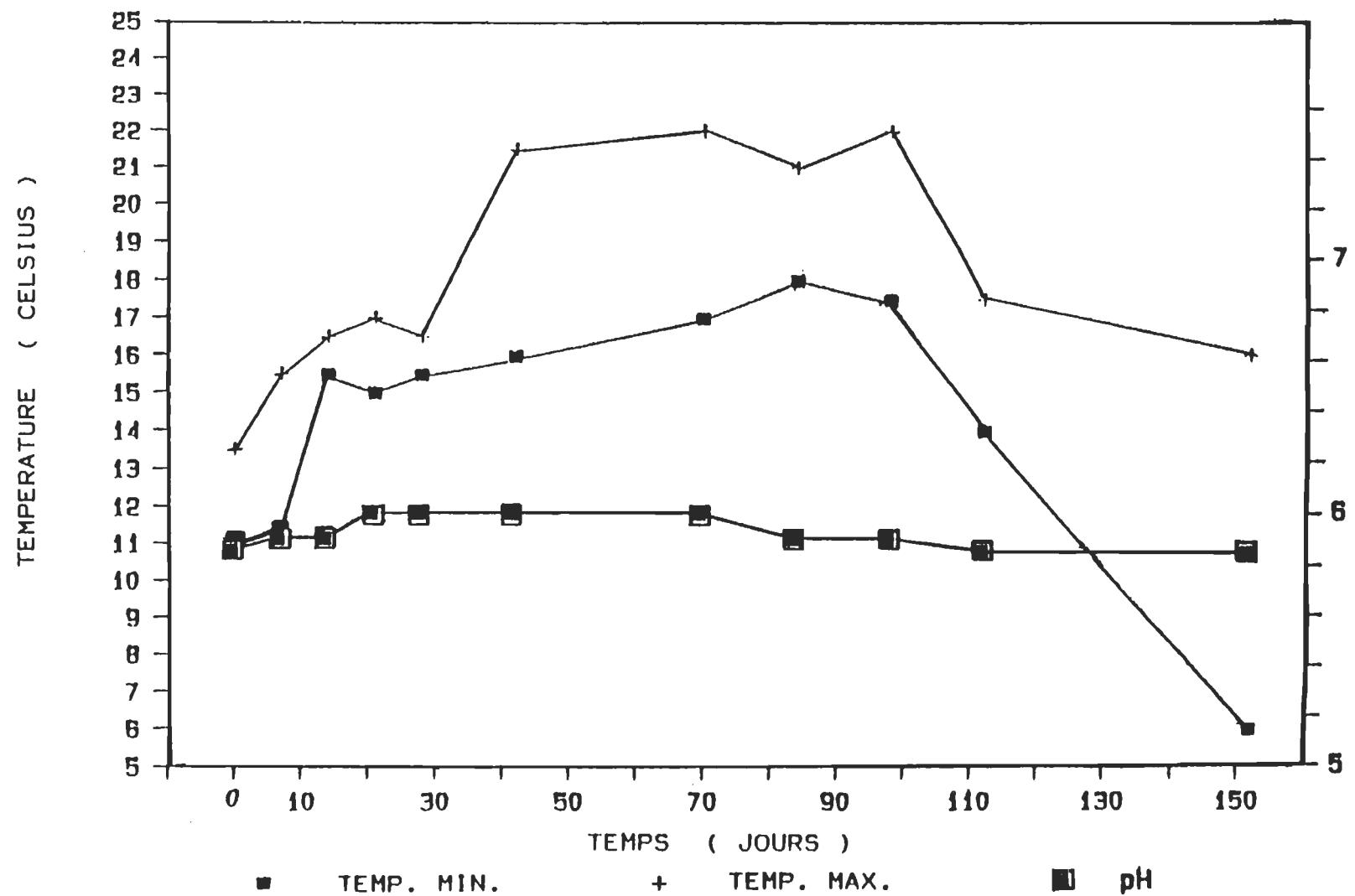


Figure 9. Graphique des températures minima-maxima et du pH en fonction du temps.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

L'objectif de ce projet était d'étudier la persistance de la toxicité d'une formulation à base de B.t.i. en milieu aquatique et de déterminer l'effet de quelques paramètres pouvant influencer cette toxicité.

Après avoir décrit les différents résultats obtenus (Chapitre III), analysons maintenant ces données de façon individuelle ou comparée, de façon à voir les effets produits sur la persistance de notre insecticide. Nous verrons tout d'abord les résultats des différents témoins et par la suite ceux obtenus avec les cinq substrats.

#### IV.1 LES TEMOINS

##### IV.1.1 Les témoins sans B.t.i. (avec membrane)

En ce qui concerne ces témoins, nous avions convenu dans le Chapitre III.1 que les témoins contenant les divers substrats plus de l'eau du lac et ceux contenant les substrats plus du "TEKNAR<sup>R</sup> HPD sp- cr-" seraient tous considérés comme négligeables étant donné leurs très faibles valeurs.

L'absence de toxicité dans ces témoins durant la durée des expériences est intéressante car cela nous démontre qu'une augmentation potentielle de toxicité, dans les échantillons contenant du B.t.i. et les divers substrats, serait causée par les cristaux, et non pas provoquée par une toxicité intrinsèque développée par les substrats.

Ces témoins négatifs nous ont aussi permis de constater que les chambres environnementales ont bien remplis leur rôle. Les éléments nutritifs ont bel et bien diffusés à travers la membrane, permettant aux algues microscopiques contenues dans l'eau du lac de coloniser légèrement tout au long de la saison les parois internes des chambres environnementales. Les échantillons contenant le B.t.i. ont donc pu bénéficier de ces mêmes avantages. De plus, si certains éléments toxiques ont pu être produits par les substrats, l'absence de toxicité nous indique qu'ils ont diffusés rapidement à travers la membrane pour se diluer dans l'environnement externe.

#### IV.1.2 Les témoins avec B.t.i. (avec couvercle)

Chez les témoins "TEKNAR<sup>R</sup> HPD scellé" (faits avec de l'eau distillée stérile et non de l'eau du lac), on remarque que l'activité毒ique se maintient à un niveau très élevé au début de la saison d'échantillonnage, soit pendant les

quarante premiers jours (figure 4). Les températures froides régnant à ce moment (figure 9) pourrait expliquer cette stabilité. Par la suite, la toxicité subit une très forte baisse entre les jours 42 et 98, jusqu'à 5% de l'activité initiale. Finalement, au jour 152, la toxicité atteint le seuil de 2% de l'activité de départ.

Etant donné les faibles quantités de protéases présentes dans ces témoins (tableau 5), il est alors peu probable que cette forte baisse ne soit associée seulement qu'à l'effet protéolytique. L'adsorption des cristaux aux parois de verre de la chambre environnementale, doit aussi être une hypothèse à envisager. Nous avons aussi remarqué que plus la saison avançait, plus la suspension larvicide à l'intérieur des chambres environnementales avaient tendance à flouler. Bien que les échantillons furent bien brassés lors des essais biologiques, il se peut que l'aggrégation des cristaux ait contribué à cette forte perte d'activité.

Dupont et Boisvert (1986), qui ont aussi étudié la persistance du B.t.i. en milieu aquatique à l'aide de chambres environnementales, ont remarqué que dans les témoins TEKNAR<sup>R</sup> scellés (faits de la même façon que nous), la suspension larvicide avait aussi tendance à flouler.

Dans leurs expériences avec les témoins scellés, l'échantillon récolté après 160 jours avait conservé une

toxicité correspondant à environ 33% de l'activité originale, ce qui est relativement élevé par rapport au 2% que nous avons obtenu. Il faut cependant mentionner que leurs conditions expérimentales étaient très différentes des nôtres.

Ils ont employé une formulation de TEKNAR<sup>R</sup> WDC visiblement très différente de la nôtre (TEKNAR<sup>R</sup> HPD); à une concentration vingt fois plus forte ( $2000 \text{ mg.L}^{-1}$  par rapport à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et de plus, la surface de contact avec les parois était plus petite, car leurs chambres avaient un volume de 125 ml par rapport aux nôtres qui étaient de 525 ml. Si l'adsorption joue un rôle dans la perte de toxicité, elle sera plus évidente dans nos échantillons.

Il se peut aussi que les protéases contenues dans le WDC soient en trop faibles quantités pour jouer un rôle significatif sur la perte de toxicité. Dupont et Boisvert (1986) n'ayant pas faits de tests de protéases sur leurs échantillons, il nous est donc impossible de prendre ce paramètre (protéases) pour comparer nos résultats.

Chez nos témoins scellés, on remarque que c'est à partir du jour 42 que les cellules végétatives commencent à baisser. Ceci peut s'expliquer par le fait que les nutriments commencent à être moins abondants, aucun nouvel apport ne pouvant provenir de l'extérieur. Cette baisse des cellules

végétatives se fait au profit des spores qui augmentent de façon graduelle jusqu'à la fin. Cette faible hausse des spores ne semble toutefois pas assez significative pour se traduire en une augmentation de toxicité (relâchement de nouveaux cristaux).

La baisse des cellules végétatives au profit d'une augmentation de spores correspond bien ici au principe voulant que dans des conditions inadéquates, les cellules végétatives s'autolysent ou sporulent (voir Chapitre I.3, page 28). Nous verrons cependant plus loin que ce principe n'est pas toujours respecté avec rigueur.

Pour les protéases, leur baisse graduelle peut s'expliquer par le fait qu'elles ont le pouvoir de s'autodigérer. Etant donné le système scellé (pas d'apports extérieurs), la quantité de protéases baisse donc de façon graduelle jusqu'à la fin.

#### IV.2 LES SUBSTRATS

Suite aux résultats décrits au Chapitre III, si on examine l'ensemble des variations de toxicité du B.t.i. en présence des différents substrats utilisés, on constate que l'on peut regrouper ces derniers en trois groupes :

1. Les substrats "Eau du lac" et "Périmyton"
2. Les substrats "Végétation A" et "Végétation B"
3. Le substrat "Sédiments"

#### IV.2.1 Substrats "Eau du lac" et "Périmyton"

Si nous reprenons le substrat "Eau du lac", on remarque que l'activité toxique, après être demeurée stable jusqu'au jour 28, subit une très forte baisse au jour 42 (figure 5). Il semble donc que les températures froides rencontrées jusqu'au jour 28 (figure 9) aient pu avoir une influence sur la persistance de la toxicité.

Dupont et Boisvert (1986) avaient constaté le même phénomène après 43 jours, sauf que dans leur cas, l'activité avait subit par la suite une hausse, tandis que nous, la toxicité demeure à un bas niveau jusqu'à la fin de la saison. Cependant, ces auteurs avaient observé un recyclage de spores beaucoup plus importants que le nôtre (0 à  $10^6$  spores/ml).

La température semble être un facteur influençant la persistance de l'insecticide en milieu aquatique. En effet, la forte baisse d'activité entre les jours 28 et 42, coïncide avec une augmentation de la température maximale dans le lac (figure 9). Il est peu probable que la température même soit responsable à elle seule de cette baisse. Cependant, elle a pu influencer la flocculation des cristaux à l'intérieur des chambres ou augmenter l'activité protéolytique dans ces dernières. De plus, cette hausse de température a certainement accéléré le processus de colonisation des parois

internes des chambres, pouvant occasionner ainsi une augmentation de l'adsorption des cristaux sur ces parois.

Lors de nos sessions d'échantillonnage, nous avons aussi relevé le pH de l'eau, pensant que celui-ci pouvait jouer un rôle sur la persistance. Etant donné les valeurs de pH enregistrées (pH 5.8 à 6.0; figure 9), nous ne pensons pas que celui-ci ait pu jouer un rôle important sur la persistance. Ces valeurs légèrement acides n'affectent cependant en rien les cristaux; ces derniers étant plus sensibles (dénaturation) à des pH basiques (pH 10 - 11).

Le tableau 6 nous montre qu'il y a eu recyclage de spores au cours de la saison (augmentation au moins du double des décomptes, soit aux jours 28-42, 70-84 et 112-152), mais nous ne détectons aucune augmentation de la toxicité dans nos échantillons. On sait qu'en théorie, un recyclage de spores coïncide avec la production et le relâchement de nouveaux cristaux, amenant ainsi l'éventualité d'une augmentation de la toxicité.

Cependant, comme nous l'avons vu au Chapitre II.3 (Situation de l'étude), un nouvel apport de cristaux ne signifie pas nécessairement qu'il y aura une augmentation de toxicité dans nos échantillons. Divers facteurs peuvent dégrader, dénaturer ou même rendre inaccessibles ces nouveaux cristaux.

Chez les autres substrats, les périodes où il y a recyclage de spores (Périmyton : Jour 112-152; Végétation A : Jours 14-21, 42-70 et 84-98; Sédiments : Jours 28-42 et 98-112) ne coïncident nullement avec une augmentation de toxicité, sauf dans le cas de la Végétation B au niveau de la fraction solide entre les Jours 70 et 84.

Il est toutefois intéressant de noter qu'au moment, où il y avait des recyclages de spores, le taux de protéases était généralement élevé. Ces fortes quantités de protéases peuvent provenir d'un apport extérieur et/ou des protéases libérées lors de la lyse des cellules végétatives qui se produit lors de la phase finale du processus de sporulation. Ceci pourrait expliquer le fait que nous n'avons pas observé d'augmentation de toxicité dans les échantillons; les protéases détruisant au fur et à mesure les cristaux produits.

De plus, nous avons noté que plus la saison d'échantillonnage avançait, plus l'intérieur des chambres environnementales se couvrait de périmyton (comme dans le cas des témoins). En plus des protéases qui peuvent dégrader nos cristaux, il se peut aussi qu'une certaine quantité de cristaux s'adsorbent au périmyton couvrant les parois internes des chambres environnementales. Back et al (1985) ont en effet démontré que des organismes brouteurs, tels les blépharicéridés, pouvaient subir l'effet larvicide du B.t.i.

lorsqu'ils broutaient du périphyton ayant été préalablement mis en présence de B.t.i.. Etant donné que les cristaux pouvaient s'adsorber aux parois au fur et à mesure de leur production, nous ne pouvons donc pas envisager une augmentation de toxicité dans la fraction liquide.

Chez le substrat "Eau du lac", ainsi que chez les autres substrats (sauf le périphyton), la période entre les jours 28 et 70 montre aussi de fortes variations dans les comptes de cellules végétatives. Ces variations ne sont toutefois pas corrélées avec les comptes de spores. En théorie (comme pour les témoins "TEKNAR<sup>R</sup> HPD scellé"), une augmentation de cellules végétatives devrait coïncider avec une baisse dans les décomptes de spores. Celles-ci devraient germer pour donner des cellules végétatives. Il faut cependant se rappeler, que des conditions jugées favorables pour permettre la reproduction des cellules végétatives ne sont pas nécessairement des conditions qui permettent de déclencher la germination des spores. Il faut donc être prudent, une augmentation des cellules végétatives ne sera pas obligatoirement associée à une baisse des spores.

Toutefois, une baisse dans les décomptes de cellules végétatives devrait généralement correspondre à une augmentation des spores dans le cas où nous rencontrons des conditions défavorables à la croissance des cellules végétatives. Il n'y a cependant qu'à un seul endroit où ces

énoncés théoriques semblent s'appliquer, soit entre les jours 98 et 112 chez le substrat "Sédiments" (tableau 9).

L'effet combiné de divers facteurs tels la température, la quantité de protéases et le type de substrat peuvent être une cause de ces résultats non-conformes. La présence d'un substrat solide peut aussi causer l'adsorption des spores et des cellules végétatives (comme dans le cas des cristaux) et ainsi jouer un rôle non-négligeable dans l'interprétation de ces décomptes.

Il se peut aussi que les conditions que nous jugeons favorables pour la croissance des bactéries (température, nutriments, pH, etc...) ne soient pas nécessairement les conditions idéales pour Bacillus thuringiensis var. israelensis, qui n'est pas dans son élément naturel dans un milieu aquatique. Lovell et Konopka (1985), qui ont étudié l'effet de la température sur la production bactérienne dans les lacs, mentionnent que pour les bactéries retrouvées habituellement en milieu aquatique, une production maximale n'est pas atteinte tant que la température est sous le seuil de 25° C. Etant donné que ce seuil ne représente qu'un optimum saisonnier (qui dans notre cas n'a jamais été atteint), ces bactéries doivent alors s'adapter à des conditions suboptimales pendant la majeure partie de l'année. Pour ces bactéries, une réduction de température agit fortement sur leur productivité. Il est alors permis de

croire que des variations de température peuvent aussi affecter la croissance de B.t.i. et ainsi expliquer en partie les décomptes de cellules végétatives obtenus.

En milieu naturel, les conditions influençant la croissance bactérienne varient surtout en fonction de la température. On peut donc penser que dans la même journée, on ait des conditions favorisant la croissance des cellules végétatives, des conditions favorisant la germination, en plus des conditions favorisant la lyse des cellules végétatives. Ce que nous observons dans nos échantillons représente la résultante de ces conditions.

On pourrait aussi expliquer les variations dans les décomptes de cellules végétatives par le fait qu'il y a pu avoir broutage de la part du zooplancton présent dans les chambres environnementales. Cependant, sur ce point, les auteurs ne sont pas tous d'accord. King et al (1980) mentionnent que le zooplancton a une très faible influence sur la population bactérienne, tandis que Fenchel (1980) a montré que le broutage des microorganismes pouvait affecter la densité bactérienne retrouvée dans l'environnement aquatique. Des calculs ont démontré que dans un environnement côtier (océan), ces organismes pouvaient exploiter jusqu'à 60% de la biomasse bactérienne produite (Fenchel, 1982; Linley et al, 1983). De plus, mise à part le broutage, la biomasse bactérienne peut être affectée par une lyse

occasionnée par des prédateurs víraux ou bactériens (Casida, 1980).

Maintenant, considérons le substrat "Périmyton", qui fait exception par rapport aux autres substrats, étant donné le délai pour la mise à l'eau des chambres environnementales.

Pour la fraction liquide des échantillons contenant le périmyton, la courbe de l'activité larvicide résiduelle en fonction du temps (figure 6) suit un cheminement très similaire à celle du substrat "Eau du lac". Tout comme ce dernier, nous notons une perte d'un peu plus de 50% de l'activité initiale et ce après un premier temps de contact de 14 jours avec le milieu aquatique.

Contrairement au substrat "Eau du lac" qui montre une stabilité relative de l'activité pendant environ deux semaines dans le premier mois de l'expérimentation, le substrat "Périmyton" subit dès le début une baisse graduelle de son activité résiduelle. Il faut se rappeler que ces échantillons contenaient plusieurs lames de verre colonisées par le périmyton ( $350 \text{ cm}^2$ ). Le fait que dans ces échantillons, les cristaux ont une forte possibilité d'être adsorbés sur le périmyton, peut expliquer cette perte rapide de la toxicité dans la fraction liquide. Il faut aussi prendre en considération que les échantillons du substrat "Eau du lac" ont été placés dans le lac un mois avant ceux du

substrat "Périmyton" et que les conditions de températures régnant à ce moment (températures froides; Minimum : 11° C , Maximum : 17° C; figure 9) aient pu contribuer à cette plus longue stabilité.

De plus, deux autres points communs caractérisent ces substrats. Premièrement, on s'aperçoit que les protéases (tableaux 6 et 7) montrent des valeurs équivalentes à partir du jour 98 jusqu'au jour 152. Cependant, chez la substrat "Périmyton", les décomptes de spores et de cellules végétatives sont assez stables mais à des valeurs plus élevées que chez le substrat "Eau du lac". La présence d'une plus grande quantité d'éléments organiques (périmyton) peut expliquer cette différence. Deuxièmement, un recyclage de spores peut être constaté entre les jours 112 et 152 (tableau 7) et tout comme chez le substrat "Eau du lac", aucune augmentation de la toxicité n'a pu être observée. Des raisons similaires à celles évoquées précédemment pour l'"Eau du lac" peuvent aussi être considérées dans ce cas-ci (haut taux de protéases, adsorption aux lames et aux parois de la chambre environnementale, flocculation)

Pour la fraction solide des échantillons de périmyton, nous avons obtenu avec le premier échantillon, une activité résiduelle de  $12 \text{ mg.L}^{-1}$  (figure 6). Celle-ci est très significative si l'on considère que lors de la mise à l'eau des échantillons, le périmyton était exempt de tous

cristaux, et qu'en plus, les témoins "Périmyton" sont négatifs.

Cependant, les échantillons 2 à 10 ne démontrent aucune activité résiduelle (figure 6), ce qui théoriquement semblerait peu probable compte tenu du fait que le temps de contact est plus long entre les cristaux et le périmyton.

Il faut toutefois mentionner que la méthodologie employée n'a pas toujours été la même lors des essais biologiques sur la fraction solide des échantillons de périmyton.

Pour l'échantillon 1, nous avons remis en suspension dans l'eau, le périmyton récolté (environ 0.5 g en poids humide). Celui-ci demeurait sous forme d'aggrégats, et nos dilutions sérielles faites lors des essais biologiques ont pu être faussées à cause de la présence des aggrégats. Nous avons donc décidé, pour les échantillons 2 à 10, de broyer le périmyton pour éviter ces erreurs, mais sans toutefois avoir fait au préalable des tests sur l'effet du broyage sur les cristaux.

Nous ne pouvons pas dire si ce n'est que par pure coïncidence, mais c'est à partir de ce moment que nous ne retrouvons plus de toxicité dans nos fractions solides. Les cristaux ont peut-être alors été rendus inactifs par le broyage. En effet, Guillet (communication personnelle) a observé une très forte perte d'activité (de l'ordre de 95%)

après homogénéisation mécanique (blender) d'une suspension de B.t.i..

Bien que ces erreurs expérimentales ne puissent nous permettre d'affirmer qu'il y avait encore de la toxicité sur le périphyton des échantillons 2 à 10, nous avons tout de même prouvé que des cristaux pouvaient s'adsorber sur le périphyton et être toxiques. Nos résultats sont en accord avec Back et al (1985) qui avaient démontré que du périphyton, après avoir été mis en présence de B.t.i., devenait毒ique pour des organismes brouteurs tels les blépharicéridés. De plus, Dupont et Boisvert (1986) avaient constaté dans des expériences similaires, que la toxicité disparaissait très rapidement dans la fraction liquide, quand une suspension de B.t.i. était mise en présence de cailloux recouverts de périphyton. Ces auteurs, même s'ils n'ont pas démontré que le périphyton était toxique, avaient expliquer cette observation par l'adsorption des cristaux sur le périphyton.

#### IV.2.2 Substrats "Végétation A" et "Végétation B"

Si l'on prend la Végétation A, on remarque que l'hypothèse, où l'on mentionne qu'une perte d'activité dans la fraction liquide irait au profit de la fraction solide, est renforcée par les résultats obtenus dans les 14 premiers jours (figures 7 et 8). En effet, une faible toxicité dans la

fraction liquide coïncide avec de forts taux d'activité dans la fraction solide, indiquant qu'il y a eu adsorption de cristaux sur la végétation.

Par contre, un phénomène de désorption est aussi observé dès le jour 28. Une augmentation significative survient alors dans la fraction liquide entre les jours 28 et 42 (figure 7) et celle-ci pourrait possiblement être expliquée par une désorption de cristaux provenant de la fraction solide, cette dernière montrant une baisse de toxicité à cette même période.

Après une stabilité de l'activité jusqu'au jour 70 dans la fraction liquide, une nouvelle baisse est observée entre les jours 70 et 84. Celle-ci pourrait être occasionnée par 1) une dégradation par les fortes quantités de protéases présentes à ce moment (tableau 8), 2) une adsorption aux parois de la chambre environnementale ou 3) une réadsorption sur la végétation (on ne dénote cependant aucune hausse d'activité significative sur la fraction solide durant cette période).

Si on considère maintenant les spores et les cellules végétatives chez la Végétation A, la période entre les jours 28 et 70 montre de fortes variations dans les décomptes. Bien qu'il y ait eu recyclage de spores (jours 14-21, 42-70, 84-98; tableau 8), l'activité dans la fraction liquide ne subit

aucune augmentation de toxicité durant ces périodes. Il faut ici mentionner, que la période entre les jours 28 et 98 représente le moment où nous retrouvons les plus fortes quantités de protéases (moyenne : 28.8 u.a.e./ml; tableau 8). Ces fortes quantités peuvent inhiber un nouvel apport de cristaux lors du recyclage et aussi contribuer à garder de faibles taux d'activité dans la fraction solide (taux inférieurs à  $1 \text{ mg.g}^{-1}$ ) à partir du jour 21.

Chez les échantillons de la Végétation B, on constate que la toxicité demeure élevée dans la fraction liquide pendant les 21 premiers jours, pendant que pour la même période, la fraction solide montre de faibles taux (figures 7 et 8). Cependant, comme pour la Végétation A, des phénomènes évidents d'adsorption sur la végétation sont observés entre le jour 21 et 28 (figures 7 et 8).

La fraction liquide demeure par la suite stable à un taux moyen d'activité d'environ 25% de l'activité initiale jusqu'au jour 112. Pour la fraction solide, la toxicité demeure élevée jusqu'au jour 112, sauf entre les jours 42 et 70. A ce moment, une très forte perte d'activité (la plus forte jamais enregistrée) s'est produite.

Cette forte perte d'activité dans la fraction solide pourrait laisser présager une augmentation de la toxicité dans la fraction liquide dû à une désorption. Mais tel n'est

pas le cas, l'activité dans la fraction liquide demeure stable, mais un des taux les plus élevés jamais rencontrés chez les protéases (jour 70; tableau 8) coïncide avec cette période. Les protéases pouvant alors jouer un rôle de régulateur dans ces échanges de cristaux entre la fraction liquide et solide.

Entre les jours 70 et 84, on remarque que la toxicité remonte à de très fortes valeurs dans la fraction solide. Cette hausse pourrait être associée à un recyclage de spores où pour la première fois (en considérant tous les substrats), une augmentation de toxicité y serait corrélée.

Maintenant, comparons nos deux types de végétation pour voir l'influence sur le comportement de l'activité toxique.

Au début de la saison d'échantillonnage, la Végétation A montre beaucoup d'activité toxique au niveau de la fraction solide au détriment de la fraction liquide (figures 7 et 8). Plus tard dans la saison, la fraction solide se stabilise à un niveau plus bas qu'en début de saison, tandis que la fraction liquide atteint un plus fort taux d'activité en milieu de saison (figure 7 et 8). Pour la Végétation B, c'est l'inverse qui se produit. La fraction liquide est caractérisée par de forts taux d'activité en début de saison pour ensuite se stabiliser à des taux plus bas (figure 7). Du côté de la fraction solide, les plus hauts taux d'activité se

situent en milieu de saison (figure 8). De plus, en comparant nos résultats, on constate que la Végétation B (composée de racines et de feuilles de graminées décomposées) adsorbe beaucoup plus de cristaux que la Végétation A (feuilles plus larges) dû à sa plus grande surface de contact (figure 8).

Il est important de remarquer que pour les deux types de végétation, il reste environ 20% d'activité dans les fractions liquides au jour 112 (figure 7) par rapport aux taux obtenus à la même période pour les fractions liquides des substrats "Eau du lac" et "Périmyton", soit en moyenne 2% d'activité (figures 5 et 6). La présence du substrat "Végétation" semble favoriser une plus grande persistance de l'activité dans la fraction liquide par rapport à des échantillons ne contenant pas de substrats solides.

Toutefois, dans le cas du substrat "Périmyton", la très faible quantité de substrat (environ 0.5 g en poids humide par échantillon) ne nous permet pas d'être aussi catégorique sur l'énoncé précédent. S'il nous était possible d'avoir dans nos chambres environnementales une quantité équivalente à celle de la végétation (environ 30 g), nous aurions peut-être obtenus des résultats similaires à ceux de la végétation. Il ne faut pas oublier qu'aussi peu que 0.5 g de périmyton avait montré une toxicité de  $12 \text{ mg.L}^{-1}$  avec le premier échantillon de la fraction solide.

#### IV.2.3 Substrat "Sédiments"

Pour le substrat "Sédiments", mise à part la période entre les jours 28 et 70 où l'on retrouve encore ici de fortes variations dans les comptes de spores et de cellules végétatives (tableau 9), la principale caractéristique réside dans le fait qu'autant pour les fractions liquides et solides, nous ne retrouvons de la toxicité, que dans le premier échantillon.

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette faible activité. Dans la fraction liquide, la perte rapide serait possiblement causée en majeure partie par l'adsorption des cristaux sur les particules des sédiments; nous constatons en effet que le premier échantillon solide est devenu toxique. Certains auteurs (van Essen et Hembree, 1982; Ohana et al., 1987) ont constaté ce fait, qui peut même parfois sembler irréversible.

Pussemier et de Borger (1984) mentionnent que l'adsorption des cristaux se ferait sous l'effet d'interactions électrostatiques. Si ces liens sont le moindrement puissants, il n'y aurait pas de possibilités de désorption. Les cristaux adsorbés ont toutefois la chance de pouvoir être capturés, si l'aggrégat formé n'est pas trop gros. Etant donné les interactions électrostatiques, il se peut alors que les protéases de l'intestin ne puissent

s'attaquer aux cristaux et libérer la toxine. Comme on l'a vu aux Chapitre I.3 (Situation de l'étude), pour qu'il y ait une activité toxique, il faut que les cristaux soient capturés, ingérés et digérés.

Mise à part les hypothèses ci-haut mentionnées, il peut toujours y avoir adsorption des cristaux sur les parois de la chambre environnementale, en plus de l'effet des protéases présentes dans les échantillons.

Dans la fraction solide, les principales causes pouvant expliquer la perte rapide d'activité sont 1) la non-accessibilité des cristaux (mélangés aux sédiments), 2) la possibilité de broutage de la part de certains microorganismes présents dans les sédiments (West et al., 1982) et 3) une dégradation des cristaux par les protéases.

Dupont et Boisvert (1986) ont aussi démontré que la fraction solide était devenue toxique après 21 jours à un taux d'environ 8% de l'activité initiale et demeura ainsi pendant les 43 jours suivants. Seulement, après ce temps, les témoins "Sédiments" constitués d'eau de lac et de sédiments devinrent aussi toxiques que les échantillons contenant le B.t.i.. En ce qui nous concerne, seul le premier échantillon montre de la toxicité à un taux d'environ  $2.35 \text{ mg.L}^{-1}$  (tableau 9). Toutefois, nos témoins demeurent négatifs tout au long de la saison d'échantillonnage (tableau 4). Ceci

indique bien que la présence de toxicité observé dans l'échantillon 1 correspond bien à une toxicité causée par le B.t.i. et non pas à une toxicité intrinsèque qui se serait développée dans les sédiments.

En guise de conclusion, nous pouvons tirer de cette étude sur la persistance de B.t.i. dans l'environnement aquatique, les principaux éléments suivants :

. De façon générale, nous constatons qu'il y a persistance de la toxicité chez tous les substrats, mais à des taux différents et pendant différentes périodes de temps. Il est intéressant de souligner que pour tous les substrats (sauf le périphyton), la période entre les jours 28 et 70 constituent un laps de temps où beaucoup de changements se produisent au niveau de l'activité toxique, des spores et des cellules végétatives (figures 4,5,6,7,8 et tableaux 5,6,7,8,9).

Des expériences similaires, effectuées à l'aide de chambres environnementales par Dupont et Boisvert (1986), ont aussi démontré de nombreuses variations dans l'activité toxique, les spores et les cellules végétatives durant la même période.

. Les spores peuvent se recycler dans l'environnement aquatique, mais de façon très irrégulière. Dupont et Boisvert (1986) ainsi que Mikhnovskaya et al (1987) ont aussi démontré

que les spores de B.t.i. pouvaient se recycler. Dans notre cas, il semble que le recyclage ne soit pas assez important pour provoquer une augmentation de toxicité dans nos échantillons, considérant les phénomènes d'adsorption et de dégradation des cristaux.

. Il est intéressant de noter qu'en général, dans les échantillons où il y a présence d'un substrat solide (impliquant une plus grande quantité d'éléments organiques), nous avons des comptes de spores, de cellules végétatives et de protéases plus élevés que par rapport au substrat "Eau du lac".

. Les protéases peuvent jouer un rôle sur la persistance. Cependant, il nous est impossible de quantifier l'apport des protéases versus les autres facteurs pouvant aussi affecter l'activité toxique (adsorption, broutage par d'autres organismes, etc...).

. On remarque aussi que toutes les baisses d'activité semblent se produire en même temps, soit vers le jour 42. Cette période coïncide avec une augmentation de la température maximale et à une activité enzymatique plus forte.

. En présence de substrats naturels (sauf les sédiments), la température froide semble augmenter le temps de persistance de l'insecticide en milieu aquatique.

. Des cinq substrats testés, nous constatons que nous pouvons les regrouper en trois groupes distincts :

1. Les substrats "Eau du lac" et "Périmyton" où nous constatons une perte rapide de la toxicité dans la fraction liquide. Pour le substrat "Périmyton", nous avons démontré que les cristaux pouvaient y être adsorbés.

2. Les substrats "Végétation A" et "Végétation B" où nous observons dans les deux cas la plus longue persistance et ce autant dans la fraction liquide que solide. Le phénomène d'adsorption y est très bien représenté, des résultats démontrant lors des essais biologiques qu'un morceau de végétation pesant aussi peu que 50 mg pouvait occasionner 100% de mortalité.

3. Le substrat "Sédiments" où l'activité est disparue le plus rapidement (entre 7 et 14 jours) et ce aussi bien dans la fraction liquide que dans la fraction solide.

## BIBLIOGRAPHIE

- Akiba, Y., and K. Katoh. Microbial ecology of B.t. V: Selective medium for B.t. vegetative cells. Appl. Ent. Zool., 1986, 21: 210-215.
- Akiba, Y. Microbial ecology of Bacillus thuringiensis VI: Germination of Bacillus thuringiensis spores in the soil. Appl. Ent. Zool., 1986, 21: 76-80.
- All, A. Bacillus thuringiensis serovar. israelensis (ABG-6108) against chironomids and some nontarget aquatic invertebrates. J. Invert. Pathol., 1981, 38: 264-272.
- All, A., and J.K. Nayar. Efficacy of Bacillus sphaericus Neide against larval mosquitoes (Diptera: Culicidae) and midges (Diptera: Chironomidae) in the laboratory. The Florida Entomologist, 1986, 69: 685-690.
- Aly, C. Germination of Bacillus thuringiensis var. israelensis spores in the gut of Aedes aegypti larvae (Diptera: Culicidae). J. Invert. Pathol., 1985, 45: 1-8.
- Aly, C., M.S. Mulla, and B.A. Federici. Sporulation and toxin production by Bacillus thuringiensis var. israelensis in cadavers of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). J. Invert. Pathol., 1985, 46: 251-258.

American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, APHA-AWWA-WPCF. Washington, 15<sup>th</sup> edition, 1981, 1134 p..

Armstrong, J.L., G.F. Rohrmann, and G.S. Beaudreau. Delta endotoxin of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. J. Bacteriol., 1985, 161: 39-46.

Aronson, A.I., W. Beckman, and P. Dunn. Bacillus thuringiensis and related insects pathogens. Microbiol. Rev., 1986, 50: 1-24.

Aronson, J.N., and H.C. Arvidson. Toxic trypsin digest fragment from the Bacillus thuringiensis parasporal protein. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 416-421.

Back, C., J. Boisvert, J.O. Lacoursière, and G. Charpentier. High-dosage treatment of Quebec stream with Bacillus thuringiensis serovar. israelensis : efficacy against black-fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non-target insects. Can. Ent., 1985, 117: 1523-1534.

de Barjac, H., et A. Bonnefol. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de Bacillus du type Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 1962, 7: 5-31.

de Barjac, H., et A. Bonnefol. Classification des souches de Bacillus thuringiensis. C. R. Acad. Sc., Paris, 1967, 264D: 1811-1813.

de BarJac, H., and A. Bonnefol. Classification of Bacillus thuringiensis.

Entomophaga, 1973a, 18: 5-17.

de BarJac, H., et A. Bonnefol. Mise au point sur la classification des Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 1973b, 18: 424-431.

de BarJac, H., V. Cosmao-Dumanoir, R. Shaik, et G. Viviani. Bacillus thuringiensis var. pakistani: nouvelle sous-espèce correspondant au sérotype 13. C. R. Acad. Sc., Paris, 1977, 284D: 2051-2058.

de BarJac, H. Une nouvelle variété de Bacillus thuringiensis très toxique pour les moustiques : B. thuringiensis sérotype 14. C. R. Acad. Sc., Paris, 1978a, 286: 797-800.

de BarJac, H. Toxicité de Bacillus thuringiensis var. israelensis pour les larves d'Aedes aegypti et d'Anopheles stephensi. C. R. Acad. Sc., Paris, 1978b, 286: 1175-1178.

de BarJac, H. Un nouveau candidat à la lutte biologique contre les moustiques: Bacillus thuringiensis sérovar. israelensis. Entomophaga, 1978c, 23: 309-319.

de BarJac, H., et J. Coz. Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à Bacillus thuringiensis var. israelensis. Bull. O.M.S., 1979, 57: 139-141.

de Barjac, H., and I. Larget. Proposals for the adoption of a standardized bioassay method for the evolution of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of Bacillus thuringiensis. WHO / VBC / 79.744., 1979, 15 pp.

de Barjac, H., I. Larget-Thiéry, V. Cosmao-Dumanoir, and H. Ripouteau. Serological classification of Bacillus sphaericus strains in relation with toxicity to mosquito larvae. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 21: 85-90.

Beegle, C.C., H.T. Dulmage, D.A. Wolfenbarger, and E. Martinez. Persistence of Bacillus thuringiensis Berliner insecticidal activity on cotton foliage. Environ. Entomol., 1981, 10: 400-401.

Berliner, E. Veber die schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella*, Zell.) und ihren erreger Bacillus thuringiensis. Z. Angew. Entomol., 1915, 2: 29-56.

Bonnefond, A., et H. de Barjac. Classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis par la détermination de l'antigène flagellaire. Entomophaga, 1963, 8: 223-229.

Bourgouin, C., A. Klier, and G. Rapoport. Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and mosquitocidal delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Mol. Gen. Genet., 1986, 205: 390-397.

Broadwell, A.H., and P. Baumann. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the Bacillus sphaericus toxin. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 1333-1337.

Bulla, L.A., Jr., D.B. Betchel, K.J. Kramer, and P.C. Fitz-James. Ultrastructure, physiology and biochemistry of Bacillus thuringiensis. Crit. Rev. Microbiol., 1980, 8: 147-204.

Bulla, L.A., Jr., R.M. Faust, R. Andrews, and N. Goodman. Insecticidal bacilli. In "The molecular biology of the bacilli", vol. II, D.A. Dubnau (ED.), Academic Press, New-York, 1985, pp. 185-209.

Carleton, B.C., and J.M. Gonzalez, Jr. The genetics and molecular biology of Bacillus thuringiensis. In "The molecular biology of the bacilli", vol. II, D.A. Dubnau (ED.), Academic Press, New-York, 1985, pp. 211-249.

Casida, L.E., Jr. Bacterial predators of Micrococcus luteus in soil. Appl. Environ. Microbiol., 1980, 39: 1035-1041.

Charles, J-F., et H. de Barjac. Sporulation et cristallogénèse de Bacillus thuringiensis var. israelensis en microscopie électronique. Ann. Microbiol., 1982, 133A: 425-442.

Charles, J-F., and H. de Barjac. Action des cristaux de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur l'intestin moyen des larves de Aedes aegypti L., en microscopie électronique. Ann. Microbiol., 1983, 134A: 197.

Charles, J-F. Action de la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur cultures de cellules de Aedes aegypti L.. Ann. Microbiol., 1983, 134A: 365-381.

Charles, J-F. Bacillus thuringiensis : crystal biogenesis and cytopathology on mosquito larvae. In "Bacterial proteins toxins", Academic Press, London, 1984, pp. 383-384.

Charles, J-F., and L. Nicolas. Recycling of Bacillus sphaericus 2362 in mosquito larvae: a laboratory study. Ann. Inst. Pasteur / Microbiol., 1986, 137B: 101-111.

Cheung, P.Y.K., and B.D. Hammock. Separation of the three biologically distinct activities from parasporal crystal of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Curr. Microbiol., 1985, 12: 125-126.

Cheung, P.Y.K., D. Buster, B.D. Hammock, R.M. Roe, and A.R. Alford. Bacillus thuringiensis var. israelensis delta-endotoxin: Evidence of neurotoxic action. Pestic. Biochem. Physiol., 1987, 27: 42-49.

Chilcott, C.N., J. Kalmakoff, and J.S. Pillai. The biological significance of proteases in Bacillus thuringiensis var. israelensis crystals. Proceedings of the University of Otago Medical School, 1979, 59: 40-41.

Chilcott, C.N., J. Kalmakoff, and J.S. Pillai. Characterization of proteolytic activity associated with Bacillus thuringiensis var. israelensis crystals. FEMS Microbiol. Lett., 1983, 18: 37-41.

Colbo, M.H., and A.H. Undeen. Effect of Bacillus thuringiensis var. israelensis on non-target insects in stream trials for control of simuliidae. Mosq. News, 1980, 40: 368-371.

Conseil National de la Recherche du Canada. Biting flies in Canada: Health effects and economic consequences (NRCC-19248). Ottawa, Canada, 1982, 157 p..

Cooksey, K.E. The protein crystal of Bacillus thuringiensis : biochemistry and mode of action. In " Microbial control of insects and mites", Burges, H.D. and Hussey, N.W. (EDS), Academic Press, London, 1971, pp.247-274.

Culling, C.F. Handbook of histopathological and histochemical techniques: (including museum techniques). Third Ed., London, 1974, 713 p..

Dadd, R.H. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzyme. J. Insect Physiol., 1975, 21: 1847-1853.

Dagnogo, M., et J. Coz. Un insecticide biologique: Bacillus sphaericus 2. Influence de la température et du temps de contact sur l'activité larvicide de B. sphaericus. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 1982, 20: 139-144.

Davidson, E.W., S.S. Singer, and J.D. Briggs. Pathogenesis of Bacillus sphaericus strain SSII-1. Infections in Culex pipiens quinquefasciatus (= C. pipiens fatigans) larvae. J. Invert. Pathol., 1975, 25: 179-184.

Davidson, E.W. A review of the pathology of bacilli infecting mosquitoes, including an ultra-structural study of larvae fed with Bacillus sphaericus 1593 spores. Developments in Industrial microbiology, 1981, 22: 69-81.

Davidson, E.W., and T. Yamamoto. Isolation and assay of the toxic component from the crystals of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Curr. Microbiol., 1984, 11: 171-174.

Davidson, E.W., M. Urbina, J. Payne, M.S. Mulla, H. Darwazeh, H.T. Dulmage, and J.A. Correa. Fate of Bacillus sphaericus 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47: 125-129.

Delaporte, B., et S. Béguin. Etude d'une souche de Bacillus pathogène pour certains insectes identifiable à Bacillus thuringiensis Berliner. Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89: 632-642.

Dempah, J. Essais de Bacillus thuringiensis israelensis sur les moustiques. Rapp. D. E. A. Ento. Med., FAC. des sciences, Paris XI, et Lab. ORSTOM, Bondy, France, 1979.

Desrochers, B., and R. Garcia. Evidence for persistence of Bacillus sphaericus. Mosq. News, 1984, 44: 160-165.

Dupont, C. Etudes des modifications histopathologiques des structures intestinales de larves de mouches noires (Diptère: Simuliidae) suite à une ingestion de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, 1986, 117 p..

Dupont, C., and J. Boisvert. Persistence of Bacillus thuringiensis serovar. israelensis toxic activity in the environment and its interaction with natural substrates. Water, Air and Soil Pollution, 1986, 29: 425-438.

Federici, B. Site of action of Bacillus thuringiensis in mosquito and black fly larvae. In "Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases", UNDP / World Bank / WHO, Geneva, 1983, p. 37.

Fenchel, T. Suspension feeding in ciliated protozoa : feeding rates and their ecological significance. Microb. Ecol., 1980, 6: 13-25.

Fenchel, T. Ecology of heterotrophic microflagellates. 3. Quantitative occurrence and importance as consumers of bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1982, 9: 35-42.

Finney, D.J. Probit analysis, 3<sup>rd</sup> ed.. Cambridge University Press, London and New-York, 1971, 333 p..

Foda, M.S., H.S. Salama, and M. Selim. Factors affecting growth physiology of Bacillus thuringiensis. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 22: 50-52.

Frommer, R.L., J.H. Nelson, M.P. Remington, and P.H. Gibbs. The susceptibility of Simulium vittatum larvae (Diptera: Simuliidae) to Bacillus thuringiensis var. israelensis in the laboratory. Mosq. News, 1980, 40: 577-584.

Frommer, R.L., S.C. Hembree, J.H. Nelson, M.P. Remington, and P.H. Gibbs. The distribution of Bacillus thuringiensis var. israelensis in flowing water with no extensive aquatic vegetative growth. Mosq. News, 1981a, 41: 331-338.

Frommer, R.L., S.C. Hembree, J.H. Nelson, M.P. Remington, and P.H. Gibbs. The evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis in reducing Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) larvae in their natural habitat with no extensive aquatic vegetative growth. Mosq. News, 1981b, 41: 339-347.

Frommer, R.L., J.H. Nelson, M.P. Remington, and P.H. Gibbs. The influence of extensive aquatic vegetative growth on the larvicidal activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis in reducing Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) in their natural habitat. Mosq. News, 1981c, 41: 707-712.

Frommer, R.L., S.C. Hembree, J.H. Nelson, M.P. Remington, and P.H. Gibbs. The effects of extensive vegetative growth on the distribution of Bacillus thuringiensis var. israelensis in flowing water. Mosq. News, 1981d, 41: 713-724.

Garcia, R., and B. Desrochers. Toxicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis to some California mosquitoes under different conditions. Mosq. News, 1979, 39: 541-544.

Garcia, R., B. Desrochers, and W. Tozer. Studies on Bacillus thuringiensis var. israelensis against mosquito larvae and other organisms. UNDP / World Bank / WHO # 790197, 1981, 16 pp..

Gaugler, R., and J.R. Finney. A review of Bacillus thuringiensis var. israelensis (serotype 14) as a biological control agent of black flies (simuliidae). Misc. Publ. Entomol. Soc. Am., 1982, 12: 1-17.

Gill, S.S., J.M. Hornung, J.E. Ibarra, G.J.P. Singh, and B.A. Federici. Cytolytic activity and immunological similarity of the Bacillus thuringiensis subsp. israelensis and Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni isolate PG-14 toxins. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 1251-1256.

Goldberg, L.J., and J. Margalit. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles serentii, Uranotaenia unquiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti and Culex pipiens. Mosq. News, 1977, 37: 355-358.

Gillet, P., et H. Escaffre. Evaluation de Bacillus thuringiensis pour la lutte contre les larves de Simulium damnosum S.L. II: Efficacité comparée de trois formulations expérimentales. WHO/VBC/79.735, 1979, p. 7.

Guillet, P., J. Dempah, and J. Coz. Evaluation 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, 1980, pp. 756-759.

Hadley, W.M., S.W. Burchiel, T.D. McDowell, J.P. Thilsted, C.M. Hibbs, J.A. Whorton, P.W. Day, M.B. Friedman, and R.E. Stoll. Five-month oral (diet) toxicity / infectivity study of Bacillus thuringiensis insecticides in sheep. Fund. Appl. Toxicol., 1987, 8: 236-242.

Halemejko, G.Z., and R.J. Chrost. Enzymatic hydrolysis of proteinaceous particulate and dissolved material in an eutrophic lake. Arch. Hydrobiol., 1986, 107: 1-21.

Heimpel, A.M., and T.A. Angus. The taxonomy of insect pathogens related to Bacillus cereus Frankland et Frankland. Can. J. Microbiol., 1958, 4: 531-541.

Hertlein, B.C., R. Levy, and T.W. Miller, Jr. Recycling potential and selective retrieval of Bacillus sphaericus from soil in a mosquito habitat. J. Invert. Pathol., 1979, 33: 217-221.

Hougaard, J.M., F. Darriet, et S. Bakayoko. Evaluation 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., 1983, 21: 111-117.

Hougard, J.M., G. Kohoun, P. Guillet, J. Doannio, J. Duval, et H. Escaffre. Evaluation 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., 1985, 23: 35-44.

Huber, H.E., P. Lüthy, H.R. Ebersold, and J.L. Cordier. The subunits of the parasporal crystal of Bacillus thuringiensis : size, linkage and toxicity. Arch. Microbiol., 1981, 129: 14-18.

Hurley, J.M., S.G. Lee, R.E. Andrews,Jr., M.J. Knowden, and L.A. Bulla,Jr. Separation of the cytolytic and mosquitocidal proteins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, 126: 961-965.

Hurley, M.J., L.A. Bulla,Jr., and R.E. Andrews,Jr. Purification of the mosquitocidal and cytolytic proteins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 1316-1321.

Ibarra, J.E., and B.A. Federici. Parasporal bodies of Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni (PG-14) and Bacillus thuringiensis subsp. israelensis are similar in protein composition and toxicity. FEMS Microbiol. Lett., 1986a, 34: 79-84.

Ibarra, J.E., and B.A. Federici. Isolation of a non-toxic 65 kilodalton protein inclusion from parasporal body of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. J. Bacteriol., 1986b, 165: 527-533.

Ignoffo, C.M., and C. Garcia. UV-photoinactivation of cells and spores of Bacillus thuringiensis and effects of peroxidase on inactivation. Environ. Entomol., 1978, 7: 270-272.

Ignoffo, C.M., C. Garcia, M.J. Kroha, T. Fukuda, and T.L. Couch. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis for use against mosquitoes. Mosq. News, 1981, 41: 85-93.

Ignoffo, C.M., C. Garcia, M.J. Kroha, and T.L. Couch. High-temperature sensitivity of formulations of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Environ. Entomol., 1982, 11: 409-411.

Insell, J.P., and P.C. Fitz-James. Composition and toxicity of the inclusion of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50: 56-62.

Isakova, N.P. Une nouvelle variété de bactérie de type cereus pathogène pour les insectes. Dokl. Akad. Sci. Nauk. Selsk., 1958, 23: 26-27.

Ishiguro, T., and M. Miyazono. Fate of viable Bacillus thuringiensis spores on leaves. J. Pestic. Sci., 1982, 7: 111-116.

Ishiwata, S. Kyoto Sangyo Ko, Hijo, Sanji Hokoku 2., 1905, p. 346.

Jaquet, F., R. Hütter, and P. Lüthy. Specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 500-504.

Johnson, D.E. Toxicity of Bacillus thuringiensis entomocidal protein toward cultured insect tissue. J. Invert. Pathol., 1980, 38: 94-101.

Junko, N.U., and Y. Endo. Mode of action of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: relative role of spores and crystals in toxicity to Pieris, Lymantria and Ephestia larvae. Appl. Ent. Zool., 1980, 15: 416-424.

Karch, S., and J. Coz. Recycling of Bacillus sphaericus in dead larvae of Culex pipiens (Diptera: Culicidae). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 1986, 24: 41-43.

Karch, S., et J.M. Hougard. Etude 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. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 1986, 24: 175-179.

Khawaled, K., Z. Barak, and A. Zaritsky. Quantification of Bacillus thuringiensis var. israelensis toxicity in carcasses of Aedes aegypti larvae (Diptera: Culicidae). Proceedings of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, 1986, p. 551.

Kim, K.H., M. Ohba, and K. Alzawa. Purification of the toxic protein from B. thuringiensis serotype 10 isolate demonstrating a preferential larvicidal activity to mosquito. J. Invert. Pathol., 1984, 44: 214-219.

King, K.R., J.T. Hollibaugh, and F. Azam. Predator-prey interactions between the larvacean Oikopleura dioica and bacterioplankton in enclosed water columns. Mar. Biol., 1980, 56: 49-57.

Kouassi, K.M. Comportement et activité larvicide de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis (B.t.i.) dans un cours d'eau. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, 1987, 135 p..

Lacey, L.A., M.S. Mulla, and H.T. Dulmage. Some factors affecting the pathogenicity of Bacillus thuringiensis Berliner against blackflies. Environ. Entomol., 1978, 7: 583-588.

Lacey, L.A., and B.A. Federici. Pathogenesis and midgut histopathology of Bacillus thuringiensis in Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae). J. Invert. Pathol., 1979, 33: 171-182.

Lacoursière, J.O., and G. Charpentier. Laboratory study of the influence of water temperature and pH on Bacillus thuringiensis var. israelensis efficacy against black fly larvae (Diptera: Simuliidae). J. Am. Mosq. Control Assoc., sous presse.

Lahkim-tsor, L., C. Pascar-Gluzman, J. Margalit, and Z. Barak. Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, serovar. H-14 in Aedes aegypti : histopathological studies. J. Invert. Pathol., 1983, 41: 104-116.

Lakshmi, N., and K.P. Gopinathan. Purification of larvicidal protein from Bacillus sphaericus 1593. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1986, 141: 756-761.

Larget, I. Etude de la rémanence de Bacillus thuringiensis var. israelensis. Rev. Gen. Bot., 1981, 88: 33-42.

Lee, H.H., M.Y. Park, and C.W. Lee. Biochemical characterization of Bacillus thuringiensis, 23 serovars. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 1986, 14: 205-208.

Lee, S.G., W. Eckblad, L.A. Bulla, Jr. Diversity of protein inclusion bodies and identification of mosquitocidal protein in Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1985, 126: 953-960.

Lee, S.G., and L.A. Bulla, Jr. Biogenesis of the protein inclusion bodies of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Japan Sci. Soc. Press, 1986, pp. 152-160.

Leong, K.L.H., R.J. Cano, and A.M. Kubinski. Factors affecting Bacillus thuringiensis total field persistence. Environ. Entomol., 1980, 9: 593-599.

Linley, E.A.S., R.C. Newell, and M.I. Lucas. Quantitative relationships between phytoplankton, bacteria and heterotrophic microflagellates in shelf waters. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1983, 12: 77-89.

Lovell, C.R., and A. Konopka. The effects of temperature on bacterial production in a dimictic eutrophic lake. FEMS Microbiol. Ecol., 1985, 31: 135-140.

- Lüthy, P., G. Raboud, V. Delucchi, and M. Küenzi. Field efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Bull. Soc. Entomol. Suisse, 1980, 53: 3-9.
- Lüthy, P., and H.R. Ebersold. The entomocidal toxins of Bacillus thuringiensis. Pharmac. Ther., 1981, 13: 257-283.
- Margalit, J., A. Markus, and Z. Pelah. Effect of encapsulation on the persistence of Bacillus thuringiensis var. israelensis, serotype H-14. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1984, 19: 382-383.
- Margalit, J., and D. Dean. The story of Bacillus thuringiensis var. israelensis. J. Am. Mosq. Control Assoc., 1985, 1: 1-7.
- Martin, M.M., J.S. Martin, J.J. Kukor, and R.W. Merritt. The digestive enzymes of detritus-feeding stonefly nymphs (Plecoptera: Pteronarcyidae). Can. J. Zool., 1981, 59: 1947-1951.
- Matha, V., J. Weiser, J. Olejnicek, and M. Tonner. Possibilities of application of preparations of Bacillus thuringiensis in the biological control of black fly larvae. Dipterologica bohemoslovaca, 1986, 4: 135-138.
- Mc Laughlin, R.E., H.T. Dulmage, R. Alls, T.L. Couch, D.A. Dame, I.M. Hall, R.I. Rose, and P.L. Versoi. U.S. standard bioassay for potency assessment of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquito larvae. Bull. Ent. Soc. Am., 1984, 30: 26-29.
- Menon, A.S., and J. DeMestral. Survival of Bacillus thuringiensis var. kurstaki in waters. Water, Air and Soil Pollution, 1985, 25: 265-274.

Mikhnovskaya, N.D., I.P. Kostyuchenko, L.G. Didyk, and V.P. Sheremet.

Effect of the conditions of aquatic medium on the entomopathogenic activity and variability of Bacillus thuringiensis H-14. Mikrobiol. Zn., 1987, 4: 17-21.

Miura, T., R.M. Takahashi, and F.S. Mulligan III. Effects of the bacterial mosquito larvicide, Bacillus thuringiensis Serotype H-14 on selected aquatic organisms. Mosq. News, 1980, 40: 619-622.

Mohsen, Z.H., and M.S. Mulla. Field evaluation of Simulium larvicides : effects on target and non-target insects. Environ. Entomol., 1982, 11: 390-398.

Molloy, D., R. Gaugler, and H. Jamnback. Factors influencing efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis as a biological control agent of black fly larvae. J. Econ. Entomol., 1981, 74: 61-64.

Molloy, D., and H. Jamnback. Field evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis as a black fly biocontrol agent and its effects on nontarget stream insects. J. Econ. Entomol., 1981, 74: 314-318.

Mulla, M.S., B.A. Federici, and H.A. Darwazeh. Larvicidal efficacy of Bacillus thuringiensis Serotype H-14 against stagnant mosquitoes and its effects on non-target organisms. Environ. Entomol., 1982, 11: 788-795.

Mulligan, F.S., C.H. Schaefer, and W.H. Wilder. Efficacy and persistence of Bacillus sphaericus and B. thuringiensis H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. J. Econ. Entomol., 1980, 73: 684-688.

Nicolas, L. Potentialités de Bacillus sphaericus dans la lutte anti-vectorielle en Afrique tropicale. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 1986, 24: 265-273.

Nicolas, L., and J. Dossou-Yovo. Differential effects of Bacillus sphaericus strain 2362 on Culex quinquefasciatus and its competitor Culex cinereus in West Africa. Med. Vet. Entomol., 1987a, 1: 23-27.

Nicolas, L., F. Darriet, and J.M. Hougaard. Efficacy of Bacillus sphaericus 2362 against larvae of Anopheles gambiae under laboratory and field conditions in West Africa. Med. Vet. Entomol., 1987b, 1: 157-162.

Nicolas, L., J. Dossou-Yovo, and J.M. Hougaard. Persistence and recycling of Bacillus sphaericus 2362 spores in Culex quinquefasciatus breeding sites in West Africa. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1987c, 25: 341-345.

Norusi, M.J. Introductory Statistics Guide SPSSX. Mc Graw-Hill Book Company, 1983, 276 p..

Novak, R.J., D.J. Gubler, and D. Underwood. Evaluation of a slow-release formulations (Abate<sup>R</sup>) and Bacillus thuringiensis var. israelensis for the control of Aedes aegypti in Puerto Rico. J. Am. Mosq. Control Assoc., 1985, 1: 449-453.

Obeta, J.A.N. Field evaluation of Bacillus sphaericus strain 1593 as a mosquito biocide. J. Invert. Pathol., 1986, 48: 133-138.

Ohana, B., J. Margalit, and Z. Barak. A method for identifying colonies possessing mosquito larvicidal effects. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 21: 250-251.

Ohana, B., J. Margalit, and Z. Barak. Fate of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis under simulated field conditions. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 828-831.

Ohba, M., and K. Alzawa. A new subspecies of Bacillus thuringiensis possessing flagellar antigenic structure: B. thuringiensis subsp. kyushuensis. J. Invert. Pathol., 1979, 33: 387-388.

Olejnicek, J., V. Matha, and J. Weiser. The efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis against larvae of Odogmia ornata (Meig.) (Simuliidae) at low temperature. Folia Parasitol., 1985, 32: 271-277.

Olejnicek, J. The use of Bacillus thuringiensis var. israelensis in the biological control of blackflies in Czechoslovakia. Wiadomosci Parazytologiczne, 1986, 32: 4-6.

Padua, L.E., M. Ohba, and K. Aizawa. The isolates of Bacillus thuringiensis serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invert. Pathol., 1980, 36: 180-186.

Padua, L.E., M. Ohba, and K. Aizawa. Isolation of a Bacillus thuringiensis strain (serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. J. Invert. Pathol., 1984, 44: 12-17.

Petras, S.F., and L.E. Casida,Jr. Survival of Bacillus thuringiensis spores in soil. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50: 1496-1501.

Pfannenstiel, M.A., G.A. Couche, E.J. Ross, and K.W. Nickerson. Immunological relationships among proteins making up the Bacillus thuringiensis subsp. israelensis crystalline toxin. Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52: 644-649.

Purcell, B.H. Effects of Bacillus thuringiensis var. israelensis on Aedes taeniorhyncus and some non-target organisms in the salt marsh. Mosq. News, 1981, 41: 476-484.

Pussemier, L. and R. De Borger. Etude sur l'activité initiale et la persistance d'un larvicide expérimental à base de Bacillus thuringiensis var. israelensis et d'une préparation commerciale contenant l'insecticide organophosphoré Téméphos. J. Environ. Sci. Health, 1984, B19: 539-554.

Ramoska, W.A., C. Pacey, and S. Watts. Test on pathogenecity and persistence of Bacillus thuringiensis var. israelensis (serotype H-14) and Bacillus sphaericus Neide against larvae of Culex restuans Theobold. J. Kans. Entomol. Soc., 1981, 54: 56-60.

Ramoska, W.A., W.A. Mc Collum, K.L. Quickenden, and A. Seckinger. Field tests of two commercial formulations of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against Aedes mosquito larvae in Montana pastureland. Mosq. News, 1982a, 42: 251-254.

Ramoska, W.A., S. Watts and R.E. Rodriguez. Influence of suspended particulates on the activity of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquito larvae. J. Econ. Entomol., 1982b, 75: 1-4.

Rishikesh, N., and G. Quellenec. Introduction to a standardized method for the evaluation of the potency of Bacillus thuringiensis serotype H-14 based products. Bull. O.M.S., 1983, 61: 93-97.

Rosenberg, M. Concentration of larvical Bacillus spores at the water surface by adherence to oil droplets. Journal of Microbiological Methods, 1986, 5: 79-81.

Salama, H.S., M.S. Foda, F.N. Zaki, and A. Khalafallah. Persistence of B.t. Berliner spores in cotton cultivations. Z. ang. Ent., 1983, 95: 321-326.

Sandler, N., R. Zomper, A. Keynan, and J. Margalit. Bacillus thuringiensis var. israelensis crystal hemolysis as a possible basis for an assay of larval toxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 23: 47-53.

Sinègre, G. 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 détections des éventuels contaminants chimiques toxiques pour les larves de moustiques. Doc. Miméogr. OMS, WHO / VBC / 80.769, Genève, 1980a, 7 pp.

Sinègre, G., B. Gaven, et G. Vigo. 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. Ent. Interdép. Dém. Litt. Méd. Rapport annuel d'activité, 1980b, 8 pp.

Sinègre, G., G. Vigo, B. Gaven, et J.L. Jullien. Activité larvicide immédiate et action rémanente de l'endotoxine du sérotype H-14 de Bacillus thuringiensis dans deux biotopes à moustiques du littoral méditerranéen français. Parassitologia, 1980c, 23: 213-221.

Sinègre, G., B. Gaven, et J.L. Jullien. 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., 1981, 19: 157-163.

Singer, S.S. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. Nature, 1973, 244: 110-111.

Singh, G.J.P., and S.S. Gill. Myotoxic and neurotoxic activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis crystal toxin. Pestic. Biochem. Physiol., 1985, 24: 406-414.

Singh, G.J.P., L.P. Schouest, Jr., and S.S. Gill. Action of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis delta endotoxin on the ultrastructure of the housefly neuromuscular system in vitro. J. Invert. Pathol., 1986, 47: 155-166.

Singh, G.J.P., L.P. Schouest, Jr., and S.S. Gill. The toxic action of Bacillus thuringiensis var. israelensis in Aedes aegypti in vivo. I. The relevance of midgut lesions to its poisoning syndrome. Pest. Biochem. Physiol., 1986a, 26: 36-46.

Singh, G.J.P., L.P. Schouest, Jr., and S.S. Gill. The toxic action of Bacillus thuringiensis var. israelensis in Aedes aegypti in vivo. II. The relevance of skeletal muscle system lesions to its poisoning syndrome. Pest. Biochem. Physiol., 1986b, 26: 47-55.

Servais, P., G. Billen, and J.V. Rego. Rate of bacterial mortality in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49: 1448-1454.

Sneh, B., and S. Schuster. Recovery of Bacillus thuringiensis and other bacteria from larvae of Spodoptera littoralis previously fed with B. thuringiensis treated leaves. J. Invert. Pathol., 1981, 37: 295-303.

Standaert, J.Y. Persistance et l'efficacité de Bacillus thuringiensis H-14 sur les larves de Anopheles stephensi. Z. Ang. Ent., 1981, 91: 292-300.

Subramoniam, A., R. Jamuna, and K. Jayaraman. Temperature-dependent activity of mosquito larvicidal factor(s) present in Bacillus sphaericus 1593-4 and 1691. Experientia, 1981, 37: 288-289.

Talalaev, E.V. Septikamie der Raupen des sibirischen Awenspienners. Microbiol. Moskava, 1956, 25: 99-102.

Temeyer, K.B. Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis in the dipteran Haematobia irritans. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47: 952-955.

Thomas, W.E., and D.J. Ellar. Bacillus thuringiensis var. israelensis crystal delta-endotoxin : effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J. Cell. Sci., 1983, 60: 181-197.

Thomas, W.E., and D.J. Ellar. Mechanism of action of Bacillus thuringiensis var. israelensis insecticidal delta-endotoxin. FEBS Lett., 1984, 154: 362-368.

Thorne, L., F. Garduno, T. Thompson, D. Decker, M. Zounes, M. Wild, A.M. Walfield, and T.J. Pollock. Structural similarity between the Lepidoptera and Diptera specific insecticidal endotoxin genes of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki and israelensis. J. Bacteriol., 1986, 166: 801-811.

Travers, R.S., P.A.W. Martin, and C.F. Reichelderfer. Selective process for efficient isolation of soil Bacillus spp.. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 1263-1266.

Trevorow, N. Susceptibility of Chironomus tepperi (Diptera: Chironomidae) to Bacillus thuringiensis serovar. israelensis. J. Aust. Ent. Soc., 1985, 24: 303-304

Tyrell, D.J., L.A. Bulla, Jr., R.E. Andrews, K.J. Kramer, L.I. Davidson, and P. Nordin. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected Bacillus thuringiensis strains. J. Bacteriol., 1981, 145: 1052-1062.

Undeen, A.H., and W.L. Nagel. The effect of Bacillus thuringiensis ONR-60A strain (Goldberg) on Simulium larvae in the laboratory. Mosq. News, 1978, 38: 524-527.

Undeen, A.H., and D. Berl. Laboratory studies on the effectiveness of Bacillus thuringiensis var. israelensis de Barjac against Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) larvae. Mosq. News, 1979, 39: 742-745.

Undeen, A.H., and M. Colbo. The efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis against blackfly larvae (Diptera: Simuliidae) in their natural habitat. Mosq. News, 1980, 40: 181-184.

Vankova, J. Persistence and efficacy of Bacillus sphaericus strain 1593 and 2362 against Culex pipiens larvae under field conditions. Z. Ang. Ent., 1984, 98: 185-189.

Van Essen, F.W., and S.C. Hembree. Simulated field studies with four formulations of Bacillus thuringiensis var. israelensis against mosquitoes: residual activity and effect of soil constituents. Mosq. News, 1982, 42: 66-72.

Visser, B., M. van Workum, A. Dullemans, and C. Waalwijk. The mosquitocidal activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis is associated with 230 000 and 130 000 crystal proteins. FEMS Microbiol. Lett., 1986, 30: 211-214.

Walther, C.J., G.A. Couche, M.A. Pfannenstiel, S.E. Egan, L.A. Bivin, and K.W. Nickerson. Analysis of mosquito larvicidal potential exhibited by vegetative cells of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52: 650-653.

Ward, E.S., D.J. Ellar, and J.A. Todd. Cloning and expression in Escherichia coli of the insecticidal delta-endotoxin gene of Bacillus thuringiensis var. israelensis. FEBS Lett., 1984, 175: 377-382.

West, A.W., H.D. Burges, and C.H. Wyborn. Loss of Bacillus thuringiensis viability and insecticidal activity in moist (pF3) soil. Abstracts of the International Colloquium of Invertebrate Pathology (Brighton), 1982, 3: 129.

West, A.W. Fate of the insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of Bacillus thuringiensis in soil. Soil Biol. Biochem., 1984, 16: 357-360.

West, A.W., and H.D. Burges. Persistence of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus in soil supplemented with grass or manure. Plant and Soil, 1985, 83: 389-398.

Wilton, B.E., and M.J. Klowden. Solubilized crystal of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis: effect on adult house flies, stable flies (Diptera: Muscidae), and green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). J. Am. Mosq. Control Ass., 1985, 1: 97-98.

Wiwit, S., A. Tojo, and K. Aizawa. Insecticidal activity of bipyramidal and cuboidal inclusions of delta-endotoxin and distribution of their antigens among various strains of Bacillus thuringiensis. Agric. Biol. Chem., 1986, 50: 1731-1735.

Wright, S.P., D. Molloy, H. Jamnback, and P. Mc Coy. Effects of temperature and instar on the efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis and Bacillus sphaericus strain 1593 against Aedes stimulans larvae. J. Invert. Pathol., 1981, 38: 78-87.

Wu, D., and F.N. Chang. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kda proteins from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis crystal. FEBS Lett., 1985, 190: 232-236.

Yamamoto, T., T. Lizuka, and J.N. Aronson. Mosquitocidal protein of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis : identification and partial isolation of the protein. Curr. Microbiol., 1983, 9: 279-284.

Yousten, A.A., M.E. Jones, and R.E. Benoit. Development of selective differential bacteriological media for the enumeration of Bacillus thuringiensis serovar. israelensis (H14) and Bacillus sphaericus. Document miméogr. OMS, WHO/ VBC/ 82.844, Genève, 1982, 7p..

Yousten, A.A., D.A. Wallis, and S. Singer. Effect of oxygen on growth, sporulation, and mosquito larval toxin formation by Bacillus sphaericus 1593. Curr. Microbiol., 1984, 11: 175-178.

Yuzuru, N., A. Kanayama, H. Sato, K. Fujita, Y. Tabaru, and A. Shimada. Field trials of Bacillus thuringiensis var. israelensis against blackfly larvae in Japan. Jpn. J. Sanit. Zool., 1985, 36: 371-373.

Zamola, B., P. Valles, A. Saric, M. Kubovic, C. Sidor, and P. Miccoli. Bacillus thuringiensis - an insecticidal micro-organism with perspective. Proc. Biochem., 1983, pp. 5-7.

Zaritsky, A., K. Khawaled, Z. Barak, D.M. Chipman, and T Rabi. Biological control of mosquitoes by the larvicidal activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis delta-endotoxin. Acta Microbiologica Polonica, 1986a, 35: 207-214.

Zaritsky, A., and K. Khawaled. Toxicity in carcasses of Bacillus thuringiensis var. israelensis-killed Aedes aegypti larvae against scavenging larvae: implications to bioassay. J. Am. Mosq. Control Assoc., 1986b, 2: 555-559.

Zaritsky, A., K.Khawaled, and Z. Barak. Feeding behaviour of Aedes aegypti larvae (Diptera: Culicidae). Proceedings of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, 1986c, p. 550.

## ANNEXE A

Préparation d'eau phosphatée.

Pour chaque litre de solution d'eau phosphatée, on suit la démarche suivante:

- 5 ml de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 M
- 1.25 ml de  $KH_2PO_4$  0.25 M
- on complète à un litre avec de l'eau distillée.
- on stérilise à l'autoclave.

Pour faire le  $KH_2PO_4$  0.25 M :

- on dissout 34 g de  $KH_2PO_4$  dans 500 ml d'eau distillée.
- on ajuste à un pH de 7.2 avec du NaOH 1 N
- on dilue à un litre avec de l'eau distillée.

Pour faire le  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 M :

- on dissout 50 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dans un litre d'eau distillée.

## ANNEXE B

Gélose NYPC sélective au B.t.i.

Pour fabriquer le milieu NYPC (Nutrient agar, Difco; Yeast extract, Difco; Polymyxine B sulfate, Sigma; Chloramphénicol, Sigma), on procède de la façon suivante :

- Agar nutritif (Difco) : 23 g
- Extrait de levure (Difco) : 0.5 g
- On ajoute un litre d'eau distillée et on chauffe jusqu'à éclaircissement de la gélose (elle devient translucide).
- On autoclave la gélose et quand la solution est refroidie (60 à 65° C pour ne pas dénaturer les antibiotiques), on ajoute 100 mg de sulfate de polymyxine B et 1.0 mg de chloramphénicol par litre de milieu (les antibiotiques ont préalablement été préparés sous forme de solutions concentrées et filtrés sur un filtre de 0.22 µm).

## ANNEXE C

Préparation d'un tampon phosphate.

Pour la préparation d'un tampon phosphate, on suit la démarche suivante :

- 19.5 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2 M
- 30.5 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M
- on dilue à 100 ml avec de l'eau distillée.
- ceci nous donne un tampon phosphate 0.1 M à pH 7.

Pour préparer le  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2 M, on pèse 27.8 g du produit que l'on dilue dans un litre d'eau distillée.

Pour préparer le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M, on pèse 28.4 g du produit que l'on dilue dans un litre d'eau distillée.