



Ressources naturelles
Canada

Natural Resources
Canada



Efficacité de l'hypochlorite de sodium pour l'inactivation des spores de *Penicillium brevicompactum* dans une installation d'élevage d'insectes

Peter M. Ebling 2007

Rapport d'information GLC-X-8F

Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts
Centre de foresterie des Grands Lacs
Sault Ste. Marie (Ontario)



Ebling, Peter M

Efficacité de l'hypochlorite de sodium pour l'inactivation des spores
de *Penicillium brevicompactum* dans une installation d'élevage d'insectes /
Peter M. Ebling.

(Rapport d'information, 0832-7122 ; GLC-X-8F)

Comprend un résumé en anglais.

Publ. aussi en anglais sous le titre: Effectiveness of sodium hypochlorite against
spores of *penicillium brevicompactum* in an insect rearing facility.

Comprend des réf. bibliogr.: p.

ISBN 978-0-662-08585-0

No de cat.: Fo123-2/8-2008F

1. Insectes--Élevage--Appareils et matériel. 2. Hypochlorite de sodium
--Essais. 3. *Penicillium brevicompactum*. 4. Invertébrés (Animaux de
laboratoire). 5. Insectes--Maladies--Prévention. I. Centre de foresterie des
Grands Lacs II. Titre. III. Coll.: Rapport d'information (Centre de foresterie
des Grands Lacs) ; GLC-X-8F.

SB764.C3E2414 2008

638

C2008-980112-1

Photo : Colonies du champignon *Penicillium brevicompactum* sur gélose Sabouraud au dextrose (P. Ebling).

© Sa Majesté la Reine du Chef du Canada 2008

TABLE of CONTENTS

| | |
|--|---|
| RÉSUMÉ | i |
| ABSTRACT | i |
| INTRODUCTION | 1 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES | 2 |
| Isolement des spores de <i>P. brevicompactum</i> | 2 |
| Concentrations d'hypochlorite de sodium évaluées | 2 |
| Durées d'exposition | 2 |
| Traitement des spores au javellisant | 3 |
| Ensemencement de géloses et quantification | 3 |
| RÉSULTATS | 3 |
| ANALYSE | 4 |
| RÉFÉRENCES | 5 |

RÉSUMÉ

La capacité d'un javellisant à usage ménager de réduire la viabilité des spores du champignon *Penicillium brevicompactum* a été évaluée dans une installation d'élevage d'insectes plurispécifique. La durée d'exposition minimale à diverses concentrations de javellisant requise pour inactiver les spores de ce champignon est indiquée. La viabilité des spores a été déterminée après exposition des spores à des concentrations de 1,0, 5,7 et 10 % de javellisant (ou 0,053, 0,299 et 0,525 % d'hypochlorite de sodium, respectivement) pendant une période pouvant atteindre 30 minutes. Notre évaluation a confirmé l'allégation du fabricant selon laquelle une exposition de 10 min à une solution à 5,7 % de javellisant (0,299 % d'hypochlorite de sodium) inactive les spores de ce champignon, mais elle a aussi démontré l'efficacité d'autres concentrations et durées d'exposition. L'inactivation complète des spores a été observée après une exposition de 30, 4 et 2 minutes à des concentrations de 1,0, 5,7 et 10,0 % de javellisant, respectivement. Les producteurs d'insectes pourront utiliser ces valeurs de référence pour déterminer le niveau de désinfection optimal après avoir établi la durée d'exposition et la concentration de javellisant maximales tolérées par le stade de développement de l'insecte traité.

Mots-clés : javellisant, insectarium, *Penicillium brevicompactum*, désinfectant, hypochlorite de sodium, viabilité des spores.

ABSTRACT

The effectiveness of household bleach for reducing spore viability of the fungus *Penicillium brevicompactum* was evaluated for use in a multi-species insect rearing facility. Minimum exposure time to various bleach concentrations for the elimination of spore viability of this fungus is reported here. Viability was determined after exposure to 1.0, 5.7 and 10% bleach (i.e., 0.053, 0.299 and 0.525% sodium hypochlorite, respectively) over a range of contact times up to 30 min. Although we confirmed that the manufacturer's recommendation of a 10 min exposure time to 5.7% bleach (0.299% sodium hypochlorite) deactivated these fungal spores, successful results were also achieved with other concentrations and exposure times. Total elimination of spore viability required contact times of 30, 4 and 2 min at concentrations of 1.0, 5.7 and 10.0% bleach, respectively. Insect producers can use these baseline data to determine the level of disinfection that is achievable when the maximum contact time and bleach concentration, which is tolerated by the life stage of the insect species being treated, has been selected.

Keywords: bleach, insectary, *Penicillium brevicompactum*, sanitizer, sodium hypochlorite, spore viability.

INTRODUCTION

On sait aujourd'hui que certaines espèces de champignons autrefois tenues pour inoffensives produisent des mycotoxines pathogènes. Le *Penicillium brevicompactum*, colonisateur primaire couramment rencontré dans les immeubles endommagés par l'eau ou l'humidité, produit des mycotoxines cancérigènes, tératogènes et immunotoxiques (Murphy et al. 2006). Durant des périodes de forte humidité dans nos installations d'élevage plurispécifiques, ce champignon peut devenir une réelle menace à divers stades du développement de certains des insectes que nous élevons.

L'équipement dont nous disposons ne nous permet pas de filtrer suffisamment l'air qui entre dans nos installations d'élevage pour en éliminer les contaminants, ni de contrôler l'humidité à l'échelle de nos installations de manière à maintenir des conditions environnementales suboptimales pour ce champignon. La situation devient particulièrement critique lorsque les insectes sont élevés dans des contenants clos renfermant leur milieu nutritif artificiel ou d'autres matières propices à la croissance du champignon. Ces conditions favorisent la condensation à l'intérieur des contenants et l'apparition de maladies (Steinhaus 1953).

Nous manipulons toujours les insectes, quel que soit leur stade de développement, de manière aseptique et dans des enceintes de confinement biologique afin d'éviter la contamination microbienne, mais les installations où nous préparons nos milieux nutritifs artificiels peuvent être exposées à des spores aéroportées susceptibles de se propager dans nos installations d'élevage. Les éléments qui entrent dans la fabrication de nos milieux nutritifs sont essentiels à la croissance des insectes que nous élevons, mais ils favorisent également celle du *P. brevicompactum*. Même si nous y ajoutons de façon systématique des agents de conservation et des inhibiteurs chimiques afin de réduire le risque de contamination par ce champignon, il est difficile d'éradiquer ce dernier tout en maintenant la qualité nutritionnelle requise pour nos insectes.

Afin de réduire ou d'éliminer les contaminants microbiens, nous appliquons des mesures d'hygiène strictes, incluant la désinfection régulière de nos installations et équipements et des divers stades de développement des insectes à l'aide de solutions diluées d'un javellisant à usage ménager (marque Javex®, Colgate-Palmolive Canada Inc.; 5,25 % d'hypochlorite de sodium). L'hypochlorite de sodium est l'un des produits chimiques les plus couramment utilisés comme agents antimicrobiens en raison de son large spectre d'action, de sa bonne solubilité dans l'eau, de sa stabilité en solution aqueuse, de sa disponibilité et de son faible prix (Ignoffo et Dutky 1963). C'est le désinfectant idéal qui offre une activité antimicrobienne maximale sans nuire aux insectes lorsqu'il est utilisé aux concentrations indiquées pendant des durées d'exposition appropriées. Dans nos installations, nous l'utilisons en dilutions de 1,0, 5,7 et 10 % v/v (concentrations finales d'hypochlorite de sodium de 0,053, 0,299 et de 0,525 %, respectivement) pendant 10 min pour de nombreuses procédures de décontamination, mais son efficacité contre le *P. brevicompactum* demeure mal connue. L'augmentation de l'incidence du *P. brevicompactum* dans nos bacs d'éclosion d'œufs de tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) nous a incité à évaluer l'efficacité de l'hypochlorite de sodium contre ce champignon. Comme nous produisons et maintenons toute une gamme de cultures d'insectes qui sont toutes susceptibles d'être infectées par le *P. brevicompactum*, nous avons dû déterminer la période d'exposition minimale requise pour obtenir une stérilisation superficielle totale aux concentrations d'hypochlorite de sodium tolérées par les divers stades de développement. De nombreuses publications font état des combinaisons de concentrations de javellisant et de durées d'exposition qui produisent des effets néfastes pour le *P. brevicompactum* sous diverses applications, mais aucune n'établit un lien entre la viabilité des spores et la durée d'exposition.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement des spores de *P. brevicompactum*

Nous avons préparé une culture de *P. brevicompactum* en prélevant à l'aide d'une anse une petite quantité de mycélium et de spores sur des œufs de tordeuse des bourgeons de l'épinette contaminés. Le mycélium et les spores ont été ensemencés en stries sur des géloses d'isolement [Sabouraud au dextrose DifcoMD (GSD)] favorisant la croissance du champignon. Ce dernier forme initialement des colonies isolées qui ne confluent pas, ce qui facilite leur isolement et leur dénombrement. Pour confirmer la pureté de notre culture, nous avons fait cinq repiquages à partir d'une des colonies de la culture initiale selon la technique décrite précédemment et nous avons fait identifier les colonies ainsi obtenues dans un laboratoire contractuel indépendant (EMC Scientific Incorporated, Mississauga, Ontario). Les milieux de culture ont été incubés à 28 °C et à un taux d'humidité relative de 30 %.

Les spores utilisées dans les trois répétitions ont été prélevées des septième, huitième et neuvième repiquages de la culture pure, neuf jours après l'inoculation des géloses d'isolement. Les champignons ont été prélevés par grattage de la gélose et mis en suspension dans de l'eau distillée, et les spores ont été isolées du mycélium par centrifugation durant 1 minute puis colorées selon la méthode de Wigley (1980) pour le dénombrement. La concentration des suspensions-mères a été ajustée à 4×10^7 spores ml⁻¹ par dilution à l'eau, des analyses préliminaires ayant indiqué que 500 µl de cette concentration suffisaient pour obtenir un culot visible à l'œil nu après la centrifugation. Vingt-quatre aliquotes de 500 µl (chacune renfermant 2×10^7 spores) ont été prélevées de chacune des trois suspensions-mères, soit sept pour les traitements avec chacune des trois concentrations d'hypochlorite de sodium et trois pour les témoins positifs. Pour séparer les spores, nous avons soumis les mélanges à une brève centrifugation (16 000 x g pendant 5 s), puis nous avons siphonné et jeté le surnageant. Le taux de récupération moyen pour chaque répétition a été déterminé par dénombrement post-centrifugation (Wigley 1980) des spores dans les trois témoins positifs. Nous avons examiné ces derniers au microscope afin de nous assurer que tout le mycélium et tous les fragments avaient été enlevés. La viabilité des spores récupérées a été déterminée par culture avec ensemencement en gélose molle (voir ci-dessous) dans les 4 h suivant la récupération des spores à partir des cultures mères et mise en suspension dans l'eau.

Concentrations d'hypochlorite de sodium évaluées

La survie des spores de *P. brevicompactum* a été déterminée suite à leur exposition à des concentrations de 1,0, 5,7 et 10 % v/v de javellisant (ou 0,053, 0,299 et 0,525 % d'hypochlorite de sodium, respectivement) pendant 30 min. Le pH de chaque solution de javellisant s'établissait à 10,41, 11,21 et 11,41, respectivement. Ces dilutions reflètent les concentrations que nous employons actuellement à diverses fins dans nos installations d'élevage plurispécifiques. Nous utilisons des dilutions à 1 ou 10 % pour la stérilisation superficielle de plusieurs stades de diverses espèces d'insectes, selon la tolérance à l'hypochlorite de sodium du stade ou de l'insecte visé. Les installations et les appareils qui ne peuvent être stérilisés à l'autoclave sont désinfectés à l'aide d'une solution de javellisant à 5,7 %, conformément aux instructions de désinfection générale du fabricant. Des analyses préliminaires ont révélé que l'exposition à de plus fortes concentrations d'hypochlorite de sodium compromet la survie des insectes. C'est pourquoi la présente évaluation ne porte que sur les dilutions actuellement utilisées dans nos installations.

Durées d'exposition

Afin de déterminer la durée d'exposition requise pour inactiver complètement les spores de *P. brevicompactum*, nous avons choisi plusieurs durées d'exposition pour chacune des concentrations de javellisant à l'essai. Des analyses préliminaires ayant démontré que les spores sont presque complètement inactivées dans les minutes qui suivent leur exposition, nous avons prélevé de nombreux échantillons dans les 10 premières minutes suivant l'exposition. Nous avons exposé seulement deux des culots pendant des périodes plus longues afin de nous assurer que la durée requise pour obtenir l'inactivation complète pouvait être déterminée, en particulier aux faibles concentrations. Les durées d'exposition évaluées s'établissaient à 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 et 30 minutes.

Exposition des spores au javellisant

Les culots renfermant 2×10^7 spores ont été remis en suspension dans 1 ml de chacune des solutions expérimentales de javellisant (dilutions à 1,0, 5,7 ou 10 %), mélangés par inversion pour obtenir un contact complet, puis incubés à la température de la pièce (22 ± 1 °C) pendant la durée d'exposition requise (1 à 30 min). Les échantillons ont été mélangés par inversion au moins deux fois durant leur incubation, puis, après une brève centrifugation ($16,000 \times g$ pendant 5 secondes), le surnageant a été siphonné et éliminé. Nous avons ensuite immédiatement lavé les culots à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace de javellisant. Les culots ont ensuite été soumis à une brève centrifugation, puis remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée. Les témoins positifs ont subi le même traitement, sauf qu'ils n'ont pas été incubés et le javellisant a été remplacé par de l'eau distillée. La quantité de spores viables dans chacun des échantillons exposés au javellisant a été tenue pour équivalente à la quantité moyenne observée dans les trois témoins positifs des répétitions.

Ensemencement de géloses et quantification

En vue du dénombrement des spores viables ayant survécu au traitement, nous avons préparé quatre dilutions décimales à partir de chaque échantillon, puis mis en culture en milieu SAB par ensemencement en gélose molle une portion de chacune d'elles. Nous avons versé 10 microlitres de chaque dilution décimale et 10 microlitres d'échantillon non dilué (contenant au maximum 2×10^5 spores viables et non viables) dans une boîte de Petri jetable stérile, puis ajouté 10 ml de SAB (46 ± 2 °C). Nous avons ensuite fait tourner le mélange délicatement afin d'obtenir une distribution uniforme des spores. Des essais préliminaires (non décrits ici) ont montré qu'à cette température, la viabilité des spores dans la gélose n'est pas compromise. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre les dénombrements obtenus avec l'étalement direct, l'ensemencement en gélose molle et l'ensemencement par dépôt de gouttes. Les boîtes ont été fermées et maintenues à 28 ± 1 °C et à un taux d'humidité relative de 35 ± 5 %. Nous avons préparé deux témoins négatifs pour chaque répétition afin d'évaluer l'asepticité des méthodes et du matériel utilisés, soit un milieu SAB et un milieu SAB inoculé avec 10 µl d'eau provenant du même lot que celui utilisé pour la préparation des suspensions de spores et des dilutions de javellisant.

Le total des colonies dénombrées dans les cultures d'échantillons dilués correspondant à chaque combinaison de concentration et de durée d'exposition a été déterminé au jours 3, 4, 5 et 6 post-inoculation (p.i.). Seules les géloses exemptes de colonies au jour 6 p.i. ont fait l'objet au jour 10 p.i. d'un nouvel examen visant à déceler la présence de spores à développement lent susceptibles d'avoir échappé à la première détection. Nous avons examiné les géloses sous grossissement 10x, et nous avons retenu à des fins de quantification seulement celles qui comptaient moins de 100 colonies au jour 3 p.i., de manière à optimiser l'exactitude des dénombrements. Le nombre moyen de colonies a été déterminé pour au moins deux des dilutions décimales correspondant à chaque combinaison de concentration et de durée d'exposition. Pour éviter l'inclusion de colonies issues d'une infection secondaire, nous avons cessé les dénombrements dès l'apparition des premiers hyphes aériens.

RÉSULTATS

Même si les taux de récupération moyens des spores à partir des géloses d'isolement s'élevaient à $82,5 \pm 13,5$, $53,1 \pm 10,1$ et $38,5 \pm 8,2$ % pour les trois répétitions, nous estimons que la brève centrifugation à laquelle les échantillons ont été soumis a permis de bien séparer les spores du mycélium et des fragments. L'examen microscopique des préparations colorées a révélé que les suspensions de spores utilisées aux fins des évaluations ne contenaient que des traces de fragments de mycélium par surcroît trop peu nombreuses pour être comptées.

Le nombre de colonies sur chaque gélose a atteint un sommet aux jours 4 ou 5 p.i., et des hyphes aériens ont commencé à se former sur certaines géloses au jour 6 p.i. Aucune colonie n'a été observée au jour 10 p.i. sur les géloses déclarées exemptes de colonies au jour 6 p.i., ce qui confirme qu'aucune spore à développement lent n'avait échappé à la détection lors des dénombrements précédents. Aucune colonie n'a été observée sur les témoins négatifs de chaque répétition. Ce résultat confirme l'asepticité des méthodes et du matériel utilisés.

La viabilité des spores avant l'exposition au javellisant, établie d'après le nombre moyen de colonies observées sur les témoins positifs de chaque répétition, s'élevait à $50,4 \pm 4,5$, $50,2 \pm 5,1$ et $72,7 \pm 8,2$ % pour les trois répétitions. La réduction moyenne de viabilité causée par le javellisant est présentée au tableau 1. L'inactivation totale des spores est survenue dans les 30, 4 et 2 minutes suivant l'exposition des spores aux concentrations v/v de 1,0, 5,7 et 10,0 % de javellisant, respectivement.

Tableau 1. Réduction moyenne (en pourcentage) de la viabilité des spores de *P. brevicompactum* causée par l'exposition au javellisant.

| Concentration de javellisant ^a | Durée de l'exposition (min) | | | | | | | |
|---|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 20 | 30 |
| 1.0% | 19.95 (±16.29) | 30.33 (±17.49) | 54.80 (±17.95) | 79.16 (±15.00) | 86.03 (±11.56) | 95.80 (±4.79) | 99.99 (±0.00) | 100.0 (±0.00) |
| 5.7% | 98.21 (±1.85) | 99.99 (±0.01) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) |
| 10.0% | 99.98 (±0.03) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) | 100.0 (±0.00) |

^aLes dilutions (v/v) à 1,0, 5,7 et 10,0 % du javellisant Javex[®] contiennent 0,053, 0,299 et 0,525 % d'hypochlorite de sodium, respectivement.

ANALYSE

Tous les stades de développement d'un insecte peuvent faire l'objet d'un traitement visant à réduire ou à prévenir complètement les risques d'infection par des microorganismes (Shapiro 1984). Dans nos installations d'élevage plurispécifiques, nous employons un javellisant à usage ménager pour traiter les différents stades de développement des insectes que nous élevons, et parfois même plusieurs stades d'une même espèce, notamment pour inactiver les spores du champignon *P. brevicompactum*. Nous faisons ici état de la durée d'exposition minimale requise, aux diverses concentrations de javellisant, pour inactiver les spores de ce champignon. Notre évaluation a confirmé l'allégation du fabricant selon laquelle une exposition de 10 min à une solution à 5,7 % du javellisant (0,299 % d'hypochlorite de sodium) inactive les spores du *P. brevicompactum*, mais elle a aussi démontré l'efficacité d'autres concentrations et durées d'exposition.

Les résultats indiquent que des concentrations inférieures à celles recommandées par le fabricant peuvent donner des résultats satisfaisants, à condition de prolonger la durée d'exposition. En pareil cas, les stades qui tolèrent uniquement de faibles concentrations peuvent se noyer, la durée de submersion requise étant plus longue. Dans certaines installations d'élevage, les stades qui tolèrent uniquement de courtes périodes de submersion pourraient être traités avec des concentrations de javellisant plus élevées, mais cette pratique pourrait se révéler néfaste dans certains cas. Par exemple, le traitement des œufs à l'hypochlorite de sodium entraîne une déchoriation partielle qui rend les œufs plus sensibles à la dessiccation et aux blessures mécaniques (van Frankenhuyzen et al. 2004). Il est donc important d'évaluer l'effet du javellisant sur la survie de l'insecte à ses divers stades de développement avant d'implanter le traitement dans une installation. En outre, il faut s'attendre à ce qu'une faible proportion des spores survive lorsqu'on traite des stades particulièrement sensibles avec une concentration de javellisant ou pendant une durée suboptimale mais tolérable.

Il est possible que les stades qui ne tolèrent ni une submersion prolongée, ni une exposition à de fortes concentrations de javellisant puissent résister à une brève exposition à une solution diluée de javellisant si le pH de celle-ci a été abaissé. L'ajout de vinaigre pour abaisser le pH à une valeur d'environ 6,8 ou moins permet d'accroître l'efficacité antimicrobienne de la solution (Feirtag 2007) et pourrait contribuer à inactiver les spores sans compromettre la survie des insectes traités. Des essais s'imposent pour évaluer le niveau de tolérance des stades sensibles.

Maintenant que nous avons établi des valeurs de référence pour déterminer les durées minimales d'exposition qui sont requises à diverses concentrations de javellisant pour inactiver les spores de *P. brevicompactum*, nous pouvons poursuivre les essais en vue d'évaluer les effets du javellisant sur les divers stades de toutes les espèces que nous élevons.

REFERENCES

- Feirtag, J. 2007. Beyond Eradication: Can we accept effective forms of sanitation beyond the killer chemical paradigm? Contamination Control 14(1): 64-65.
- Ignoffo, C.M.; Dutky, S.R. 1963. The effect of sodium hypochlorite on the viability and infectivity of Bacillus and Beauveria spores and cabbage looper nuclearpolyhedrosis virus. Journal of Invertebrate Pathology 5: 422-426.
- Murphy, P.A.; Hendrich, S.; Landgren, C.; Bryant, C.M. 2006. Food Mycotoxins: An Update. Journal of Food Science, 71(5): R51-R65.
- Shapiro, M. 1984. Micro-organisms as contaminants and pathogens in insect rearing. Pages 130-142 In E.G. King and N.C. Leppla, eds. Advances and challenges in insect rearing. Edited by E.G. King and N.C. Leppla. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Steinhaus, E.A. 1953. Diseases of Insects Reared in the Laboratory or Insectary. University of California, California Agricultural Services Experiment Station Extension Service. Leaflet Number 9.
- van Frankenhuyzen, K.; Ebling, P.; McCron, B.; Ladd, T.; Gauthier, D.; Vossbrink, C. 2004. Occurrence of Cystosporogenes sp. (Protozoa, Microsporidia) in a multi-species insect production facility and its elimination from a colony of eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Invertebrate Pathology 87: 16-28.
- Wigley, P.J. 1980. Counting micro-organisms. Pages 29-35 In J. Kalmakoff and J.F. Longworth, eds. Microbial control of insect pests. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research Bulletin 228.