

O. C. C. G. E.

Institut Pierre RICHET

O. R. S. T. O. M.

Institut Français de Recherche
Scientifique pour le
Développement en Coopération

RECYCLAGE DE BACILLUS SPHAERICUS 2362 DANS LES LARVES DE
CULEX QUINQUEFASCIATUS, EN GITES URBAINS.
TOXICITE ET PERSISTANCE DES SPORES RECYCLEES*

par

L. NICOLAS**

J. DOSSOU-YOVO***

N° 41/IPR/Rap/85

* Ce travail a bénéficié d'une subvention du PNUD/Banque Mondiale/OMS
Programme Spécial pour la Recherche et la Formation concernant les Maladies
Tropicales.

** Allocataire de Recherche MRT/ORSTOM.

*** Entomologiste Médical de l'OCCGE.

OCCGE/IPR, BP. 1500 Bouaké - Côte d'Ivoire.

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 24094

Cote : B

7.10.88

INTRODUCTION.

De récentes études de laboratoire et de terrain ont montré que les spores de Bacillus sphaericus se recyclent dans les larves de Culex quinquefasciatus et de Culex tarsalis, et sont relâchées dans l'environnement lors de la décomposition des cadavres (HERTLEIN et al., 1979; Des ROCHERS et GARCIA, 1984; DAVIDSON et al., 1984). A Bouaké (Côte d'Ivoire) le recyclage des spores de B.sphaericus 2362 a été démontré, au laboratoire, dans des larves de C.quinquefasciatus, dans différentes eaux de puisards et dans des solutions de détergents (NICOLAS et al., 1985).

La présente étude a pour objectifs :

1°/ d'étudier le recyclage de B.sphaericus 2362 dans les larves de C.quinquefasciatus en puisards, principaux gîtes urbains permanents en Afrique de l'Ouest.

2°/ d'évaluer la toxicité des spores recyclées.

3°/ de produire au laboratoire une quantité suffisante de spores recyclées et d'en suivre le devenir dans un gîte artificiel.

MATERIEL ET METHODES.

1. ETUDE DU RECYCLAGE DANS LES LARVES DE GITES URBAINS.

Quatre puisards, de 0,4 à 1,8 m² et de 1 m à 1,20 m de profondeur d'eau ont été traités à 10 g/m² d'une suspension concentrée de B.sphaericus 2362 (BSP 1) fournie par la Firme Solvay. Cette préparation avait montré, à la même dose, une rémanence de 5 - 6 semaines sur C.quinquefasciatus, en puisards à Bouaké (NICOLAS et al., 1985). La population préimaginale de C.quinquefasciatus, évaluée par dipping juste avant le traitement variait de 60 à 120 larves stades 3-4 et de 2 à 25 nymphes par litre d'eau de surface. 1 heure à 2 heures après le traitement, des larves ont été prélevées dans chaque gîte traité et mises dans des cages à demi immergées dans le même gîte. 4 heures (J0), 24 heures (J1), 48 heures (J2) et 72 heures (J3) après le traitement, 30 larves ont été prélevées dans chaque cage, désinfectées superficiellement dans l'alcool à 70%, rincées 3 fois à l'eau distillée stérile, puis broyées dans 0,1 ml d'eau par larve et congelées.

Le nombre total de B.sphaericus et de spores résistantes à la chaleur, présents dans les larves, ont été comptés par étalement des broyats sur milieu MBS (KALFON et al., 1983), à 100 mg/l de sulfate de streptomycine, en boîtes de Pétri, avant (B.sphaericus totaux) et après (spores) 12 minutes de chauffage au bain-marie à 80° C.

Après incubation à 30 - 32° C pendant 48 heures, les colonies ont été identifiées morphologiquement et microscopiquement. Le sérotype a été vérifié sur un échantillon de colonies par le test d'agglutination avec un sérum H 5-1 préparé sur lapin à l'Institut Pasteur de Paris (de BARJAC et al., 1980).

2. TOXICITE DES SPORES RECYCLEES.

La toxicité des spores contenues dans les larves broyées après 48 heures et 72 heures de contact a été évaluée par bioessai au laboratoire. Etant donné les faibles quantités de broyats, les tests ont été réalisés en boîtes de Pétri contenant 30 ml de dilution de broyat, à 10 mg/l de levure de boulanger sur des lots de 20 larves stade 3 jeune de C.quinquefasciatus (20 larves par concentration, 7 concentrations). 20 larves non traitées ont servi de témoin.

La mortalité a été chiffrée à 24, 48 et 72 heures et les CL 50 et CL 95 calculées en fonction du nombre de spores par millilitre d'eau dans les boîtes de Pétri, par ordinateur après ajustement de la droite log-probit selon la méthode de FINNEY (1971).

3. PRODUCTION EN LABORATOIRE DE SPORES RECYCLEES ET SUIVI DE LEUR DEVENIR EN GITE ARTIFICIEL.

Lorsqu'un gîte peuplé de larves de C.quinquefasciatus est traité avec B.sphaericus, les spores retrouvées dans le substrat quelques jours après le traitement peuvent provenir :

1°/ soit de la fraction du produit non ingéré par les larves et ayant sédimenté;

2°/ soit du recyclage à l'intérieur des larves produisant un nouveau stock de spores, libérées lors de la décomposition des cadavres.

Il n'est cependant pas possible en gîtes naturels de déterminer l'origine des spores présents dans le substrat et donc de les étudier séparément en fonction de leur origine.

Une expérience a donc été mise en place pour suivre dans l'eau le devenir de spores recyclées dans les larves.

3.1. Production de spores recyclées.

Dans 4 aquarium contenant 6 litres d'eau de puisard traitée à $5-6 \cdot 10^5$ spores de B.sphaericus 2362 (BSP 1) par ml, 1500 larves de C.quinquefasciatus stade 4 jeune, par aquarium, ont été mises en contact pendant 1/2 heure avec l'eau traitée, soit 6000 larves au total. Le pH de l'eau était de 8,5 et l'eau ne contenait pas d'oxygène dissous.

Après 1/2 heure de contact, toutes les larves ont été rincées à l'eau distillée. 10 lots de 25 larves ont été mises dans des gobelets contenant 150 ml d'eau du même puisard non traitée, pour suivre le recyclage dans les larves. Pour cela 25 larves ont été prélevées et broyées, selon la méthode décrite au paragraphe 1, 1/2 heure, 6 heures, 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures après le début du contact. La toxicité des broyats a été évaluée par bioessai selon le même protocole au paragraphe 2.

3.2. Suivi, en gîte artificiel, des spores recyclées.

Toutes les autres larves, environ 5500, ont été mises dans une buse en ciment de 0,50 m de diamètre, remplie sur 0,80 m de hauteur de 160 litres d'eau du même puisard non traitée. Ce gîte artificiel était recouvert d'une moustiquaire pour éviter la colonisation par d'autres moustiques.

La mortalité des larves a été évaluée à 24 et 48 heures. Le devenir des spores a été suivi en prélevant 20 à 30 ml d'eau de surface et de substrat 1, 2, 3, 4, 5 jours après le traitement puis deux fois par semaine pendant 6 semaines.

RESULTATS.

1. ETUDE DU RECYCLAGE DANS LES GITES URBAINS.

24 heures après le traitement, la mortalité des larves stades 3 - 4 dans les 4 puisards était de 100% et les cadavres encore intacts flottaient en surface. A 48 heures, plus de 95% des cadavres avaient sédimenté et, selon les puisards, l'état de décomposition des cadavres prélevés dans les cages était plus ou moins avancé. Dans le puisard C, les têtes étaient très souvent entièrement détachées des thorax.

La figure 1 montre une augmentation très nette du nombre de spores dans les cadavres, atteignant dans 3 cas sur 4, plus de 10^5 spores par larve, soit 100 à 1000 fois le nombre de spores ingérées. La forte différence entre le nombre de spores et de B.sphaericus totaux 4 heures après le traitement, alors que le pourcentage de sporulation du larvicide est de 75%, montre que la germination des spores a déjà commencé.

Sauf dans le cas du puisard C, le nombre de B.sphaericus par larve dépasse déjà à 24 heures, $4 \cdot 10^4$ bactéries, sporulées à 70 - 95%.

Le tableau 1 indique les caractéristiques physico-chimiques moyennes de l'eau des puisards pendant la période d'étude. Dans tous les puisards, la température de l'eau était de 26,5 - 28,2° C avec une amplitude journalière de 2° C, le pH proche de 8, la quantité d'oxygène dissous de 0 à 0,1 mg/l. Les puisards A et B étaient peu chargés en matières en suspension (20 à 22 mg/l), alors que les puisards C et D étaient 3 à 5 fois plus chargés (68 à 108 mg/l).

2. TOXICITE DES SPORES RECYCLEES DANS LES LARVES EN PUISARD.

Le tableau 2 indique les CL 50 48 heures et CL 95 48 heures des broyats de cadavres prélevés dans les puisards traités. Connaissant la quantité de spores présentes dans les cadavres, les CL sont exprimées en fonction de la concentration en spores à laquelle les larves de C.quinquefasciatus ont été soumises dans les boîtes de Pétri.

Les CL 50 48 heures sont comprises entre $5,5 \cdot 10^1$ et $1,2 \cdot 10^2$ spores/ml et les CL 95 entre 2,7 et $9,25 \cdot 10^2$ spores/ml. D'une manière générale, pour un puisard donné, les CL des spores contenues dans les cadavres de 48 heures et de 72 heures sont très proches. La toxine est donc formée dans les spores des cadavres 48 heures après le début du contact.

3. PRODUCTION EN LABORATOIRE DE SPORES RECYCLEES ET SUIVI DE LEUR DEVENIR EN GITE ARTIFICIEL.

3.1. Production de spores recyclées.

6000 larves stade 4 jeune de C.quinquefasciatus ont été mises en contact au laboratoire avec une eau de puisard contenant 5 à $6 \cdot 10^5$ spores de B.sphaericus 2362/ml. Après rinçage superficiel des larves, environ 5500 larves ont été relâchées dans un gîte artificiel de $0,2 \text{ m}^2$, alors que les autres larves étaient conservées au laboratoire pour évaluer la quantité de spores recyclées dans ces larves.

Au laboratoire et dans le gîte artificiel, la mortalité à 24 heures atteignait 95 - 98%.

La figure 2, illustre le recyclage dans les larves conservées au laboratoire et montre qu'à 72 heures un seuil de 5 à 6 10^4 spores par larve est atteint. Ce seuil est inférieur à ceux trouvés dans les cadavres collectés dans les puisards A à C (figure 1) (de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ spores/larve) et est atteint 24 heures plus tard.

Le tableau 3 indique la toxicité des spores recyclées présentes dans les cadavres de 72 heures et de 96 heures. Les CL 50 24 heures et CL 95 24 heures sont respectivement de 3,3 à $9 \cdot 10^2$ spores/ml et de 2,2 - $2,3 \cdot 10^3$ spores/ml. Les CL 50 48 heures et CL 95 48 heures sont respectivement de $2,2 \cdot 10^2$ spores/ml et de $9,6 \cdot 10^2$ spores/ml. Il semble donc que ces spores soient moins toxiques que les spores recyclées dans les cadavres en puisards.

3.2. Suivi en gîte artificiel des spores recyclées.

La sédimentation des cadavres dans le gîte artificiel a suivi le même schéma que dans les puisards. En effet, à 48 heures, plus de 95% des cadavres avaient sédimenté. En surface, la concentration en spores n'a jamais dépassé 60 spores/ml, probablement apportées par les larves lors de leur transfert du laboratoire au gîte, ou par rejet après transit intestinal dans les larves.

La figure 3 représente la concentration en spores dans le substrat. Celle-ci s'accroît pendant la première semaine jusqu'à $2,1 \cdot 10^3$ spores/ml, ce qui correspond à la libération progressive des spores pendant la décomposition des cadavres. Puis elle oscille entre $3 \cdot 10^2$ et $1,5 \cdot 10^3$ spores jusqu'au 37ème jour où brusquement le nombre de spores et de B.sphaericus totaux devient inférieur à 50 CFU/ml.

Un bioessai réalisé avec le substrat au 40ème jour ne montre aucune toxicité sur des larves stade 3 jeune de C.quinquefasciatus après 24 et 48 heures de contact.

DISCUSSION.

Cette étude a permis de confirmer que le recyclage des spores de B.sphaericus 2362 a lieu dans les larves en puisards et que ces spores sont toxiques. Le nombre de spores produites semble atteindre un seuil de 10^5 à 10^6 spores/larve. Ce nombre, également observé par RAMOSKA et HOPKINKS (1981) et par DAVIDSON et al. (1975, 1984) semble être le nombre maximal de spores qu'une larve de Culex puisse contenir.

Le suivi en gîte artificiel de larves traitées au préalable pendant 1/2 heure au laboratoire avant d'être relâchées dans le gîte soulève deux questions :

1. PRODUCTION REELLE DE SPORES DANS LES LARVES.

Si le recyclage se déroule de la même façon dans les larves gardées au laboratoire et dans les larves relâchées dans le gîte, environ $2,5 \cdot 10^8$ spores ont été produites dans le gîte (5500 larves $\times 5 \cdot 10^4$ spores/larve).

Dix jours après avoir relâché les larves dans le gîte, l'eau située à 5 cm du fond contenait moins de 10^2 spores par ml. Aussi la quasi-totalité des spores était elle localisée dans le substrat. L'épaisseur du substrat est inférieure à 1 cm et donc son volume à 2 litres. Aussi le nombre total de spores ayant sédimenté dans le substrat est au maximum de $2,1 \cdot 10^3$ spores/ml $\times 2000$ ml, soit environ $4 \cdot 10^6$ spores, ce qui est négligeable comparativement au nombre théorique de spores produites par les larves.

La forte différence entre ces deux nombres nous incite à proposer l'hypothèse que, au moins dans certains puisards, le recyclage des spores dans les larves ayant sédimenté serait beaucoup moins productif que dans les larves maintenues en surface. La sédimentation a eu lieu entre 24 et 48 heures, ce qui correspond à la phase de multiplication végétative des bactéries dans les larves conservées au laboratoire (figure 2). Cette hypothèse reste à vérifier. Cependant les larves ayant sédimenté sont soumises à une plus forte pression d'eau et à un milieu plus riche en bactéries saprophytes que l'eau de surface. Ces conditions pourraient entraîner une désintégration prématurée des larves.

2. PERSISTANCE DES SPORES RECYCLEES.

La persistance des spores libérées dans le substrat par les cadavres n'a duré que 37 jours. Parallèlement, le nombre de B.sphaericus totaux a chuté également. Ceci pourrait être dû à une germination des spores et à l'impossibilité des cellules germinatives de sporuler et de survivre dans le substrat. Le pH de l'eau du gîte étant de 8,5 alors que le pH optimal de sporulation de B.sphaericus est voisin de 7 (YOUSTEN et al., 1984), il serait nécessaire d'évaluer l'influence du pH sur la persistance des spores et des cellules germinatives.

En conclusion, bien que B.sphaericus se recycle dans les larves, le recyclage n'a pas lieu près de la surface car les cadavres sédimentent peu de temps après la mort. Les spores recyclées ne sont donc pas dans la zone de nutrition des autres larves qui colonisent les puisards. Dans des gîtes profonds, le recyclage n'est donc pas opérationnel.

BIBLIOGRAPHIE.

- de BARJAC (H.), VERON (M.) et COSMAO-DUMANOIR (V.), 1980 - Caractérisation biochimique et sérologique de souches de Bacillus sphaericus pathogènes ou non pour les moustiques. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 131 B : 191-201.
- DAVIDSON (E.W.), SINGER (S.) and BRIGGS (J.D.), 1975 - Pathogenesis of Bacillus sphaericus SS II-1 infections in Culex pipiens quinquefasciatus larvae. J. Invertebr. Pathol. 25 : 179-184.
- DAVIDSON (E.W.), URBINA (M.), PAYNE (J.), MULLA (M.S.), DARWAZEH (H.), DULMAGE (H.T.) and CORREA (J.A.), 1984 - Fate of Bacillus sphaericus 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol., 47 : 125-129.
- DES ROCHERS (B.) and GARCIA (R.), 1984 - Evidence for persistence and recycling of Bacillus sphaericus. Mosq. News, 44 : 160-165.
- FINNEY (D.J.), 1971 - Probit analysis. Cambridge Univ. Press. 333 pp..
- HERTLEIN (B.C.), LEVY (R.) and MILLER (T.W. Jr.), 1979 - Recycling potential and sélective retrieval of Bacillus sphaericus from soil in a mosquito habitat. J. Invertebr. Pathol., 33 : 217-221.
- KALFON (A.), LARGET-THIERY (I.), CHARLES (J.F.) et de BARJAC (H.), 1983 - Growth, sporulation and larvicidal activity of Bacillus sphaericus. Ent. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18 : 168-173.
- NICOLAS (L.), HOUGARD (J.M.), DOSSOU-YOVO (J.), DOANNIO (J.M.C.), DUVAL (J.) et ESCAFFRE (H.), 1985 - Persistence et recyclage de Bacillus sphaericus 2362 dans les gîtes urbains à Culex quinquefasciatus en Afrique de l'Ouest. Doc. OCCGE/IPR, N° 24/IPR/Rap/85, 12 pp..

RAMOSKA (W.A.) and HOPKINKS (T.L.), 1981 - Effects of mosquito larval feeding behavior on Bacillus sphaericus efficacy. J. Invertebr. Pathol., 37 : 269-272.

YOUSTEN (A.A.), MADEKHAR (N.) and WALLIS (D.A.), 1984 - Fermentation conditions affecting growth, sporulation and mosquito larval toxin formation by Bacillus sphaericus. Dev. Industr. Microbiol. : 757-762.

Puisard N°	A	B	C	D
Température (° C)	27	27	28,2	26,5
pH	8,1	7,8	8,0	7,8
O ₂ dissous (mg/l)	0,1	0	0,1	0,1
Matières en suspension (200 um) (mg/l)	22	20,4	108	68,5

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau des puisards pendant l'étude du recyclage dans les larves. Moyennes sur 4 jours.

Origine des broyats		CL 50 48 heures		CL 95 48 heures	
Puisard N°	Age des cadavres	(spores/ml)		(spores/ml)	
A	48 heures	(1.14 10 ² - 1.5 10 ²)	(1.72 10 ²)	NS	3.7 10 ² NS
A	72 heures	(7.93 10 ¹ - 1.19 10 ²)	(1.81 10 ²)	NS	4.1 10 ² NS
B	48 heures	(9.15 10 ¹ - 1.09 10 ²)	(1.31 10 ²)	NS	3.13 10 ² NS
B	72 heures	(9.8 - 1.03 10 ²)	(10.9 10 ²)	S	8.43 10 ² S
C	48 heures	(1.15 10 ¹ - 5.5 10 ¹)	(2.82 10 ²)	S	9.25 10 ² S
C	72 heures	(4.72 10 ¹ - 6.1 10 ¹)	(8.46 10 ¹)	NS	8.5 10 ² NS
D	48 heures	(3.6 10 ¹ - 5.88 10 ¹)	(9.6 10 ¹)	NS	2.71 10 ² NS
D	72 heures	(1.64 10 ¹ - 2.7 10 ¹)	(4.46 10 ¹)	NS	1.83 10 ² NS

Tableau 2 : Toxicité des spores recyclées, en puisards, dans des cadavres de C. quinquefasciatus. Résultats après 48 heures de contact, en boîtes de Pétri, de larves de C. quinquefasciatus stade 3 jeune avec des dilutions de broyats.

Tableau 3 : Toxicité des spores recyclées au laboratoire dans des cadavres de C.quinquefasciatus. Bioessais réalisés en boîtes de Pétri avec des broyats.

A. Broyats de cadavres de 72 heures contenant 5 à 5 10⁵ spores/cadavre.

Temps de contact	CL 50 (spores/ml)	CL 95 (spores/ml)
24 heures	3.3 10 ² (1.9 10 ² - 5.7 10 ²)* S	2.34 10 ³ S
48 heures	2.2 10 ² (1.6 10 ² - 3. 10 ²) NS	9.6 10 ² NS

B. Broyats de cadavres de 96 heures contenant 5 à 6 10⁵ spores/cadavre.

Temps de contact	CL 50 (spores/ml)	CL 95 (spores/ml)
6 heures	3.35 10 ⁴ (1.92 10 ⁴ - 5.84 10 ⁴) NS	1.84 10 ⁵ NS
12 heures	1.7 10 ³ (1.2 10 ³ - 2.4 10 ³) NS	4.7 10 ³ NS
24 heures	9 10 ² (3 10 ² - 2.6 10 ³) NS	2.2 10 ³ NS

* : Intervalle de confiance.

S : X² significatif au seuil de 5%.

NS : X² non significatif au seuil de 5%.

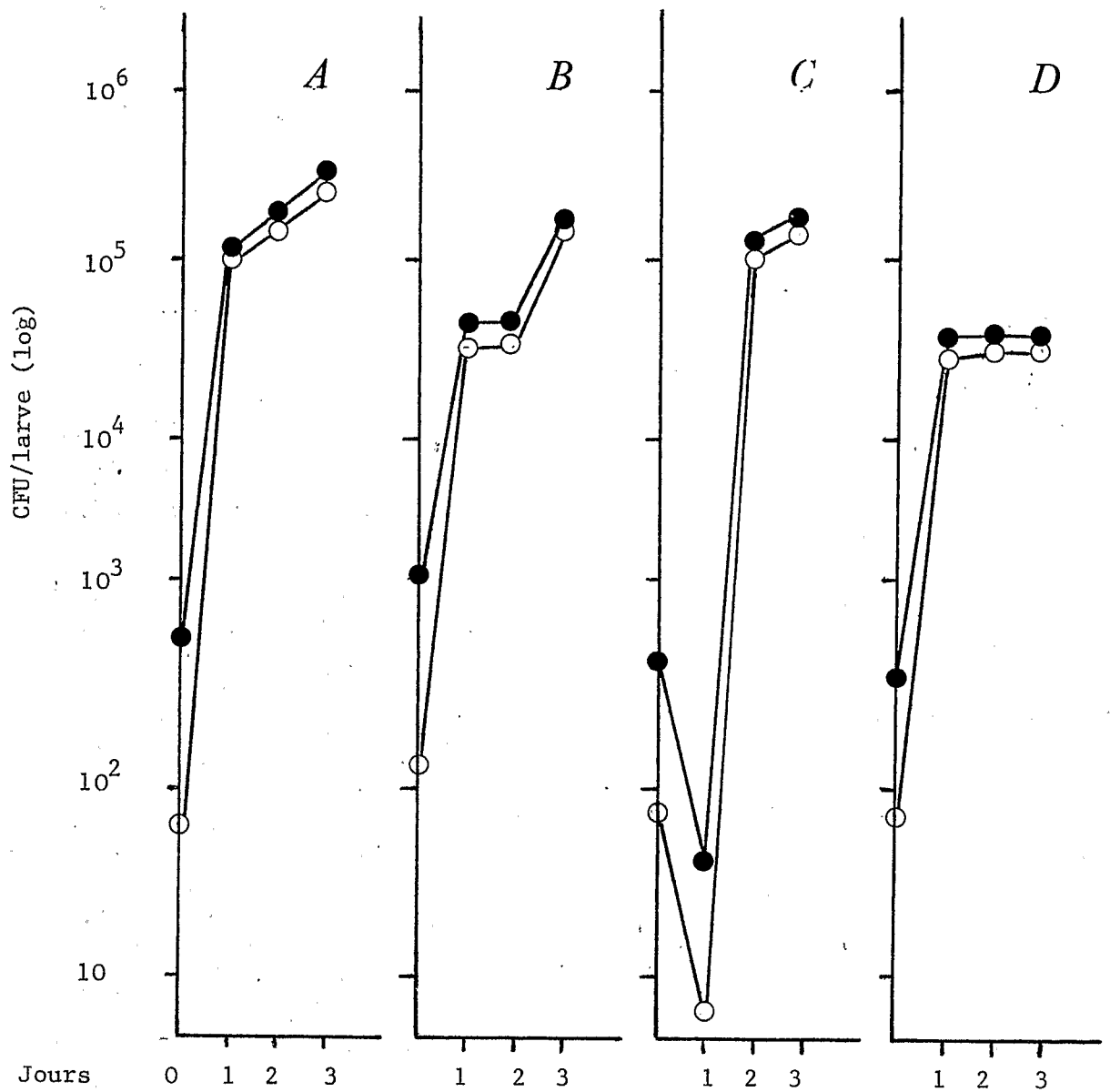


Fig. 1 : *B. sphaericus* 2362 totaux (●) et spores résistantes à la chaleur (○) présentes dans les larves stade 3-4 de *C. quinquefasciatus* de 4 puits traités à 10 g/m² de BSP 1.

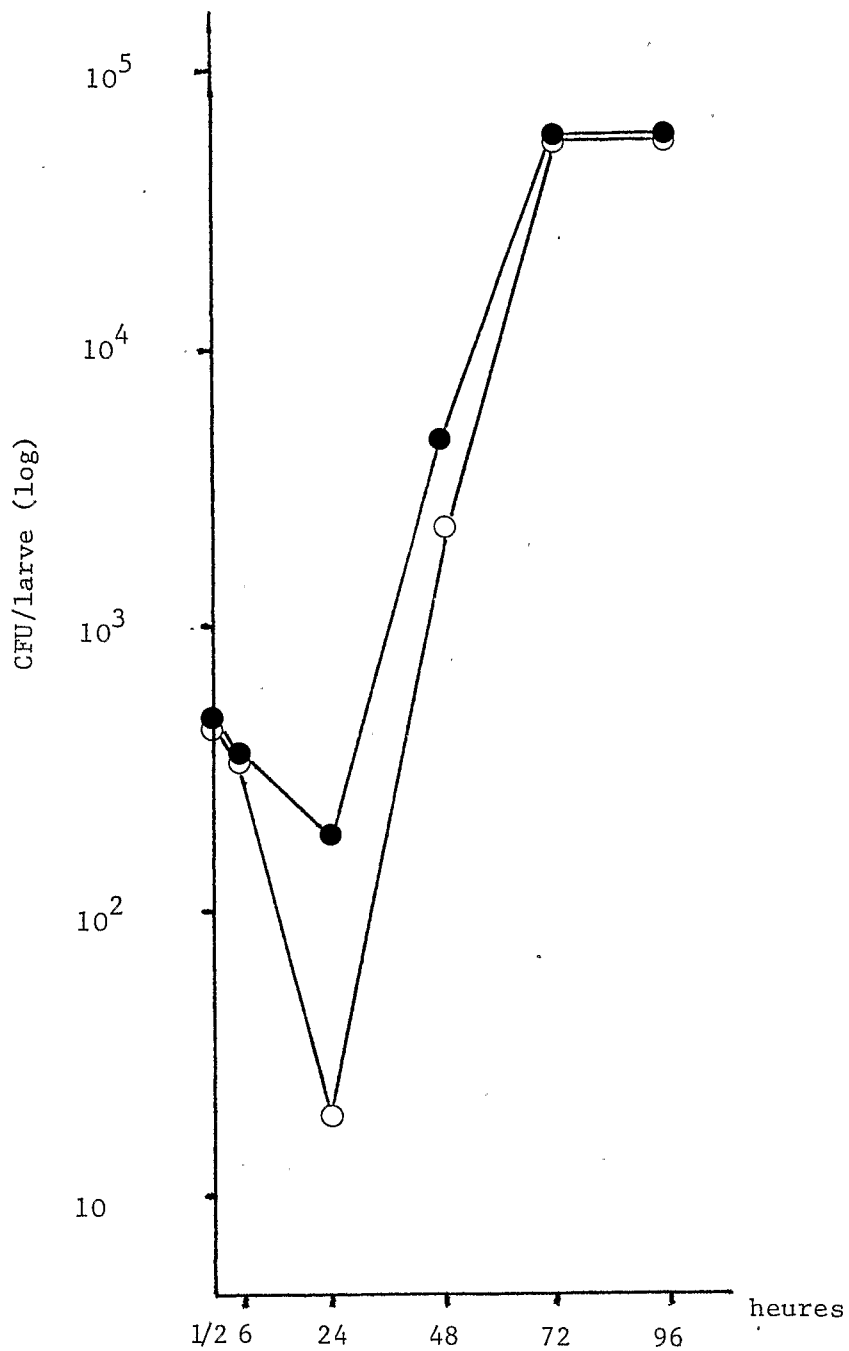


Fig. 2 : *Bacillus sphaericus* totaux (●) et spores résistantes à la chaleur (○) présentes dans les larves stade 3 - 4 de *C. quinquefasciatus* mises en contact au laboratoire avec une solution à $5-6 \cdot 10^5$ spores/ml, pendant 1/2h.

CFU/ml (log)

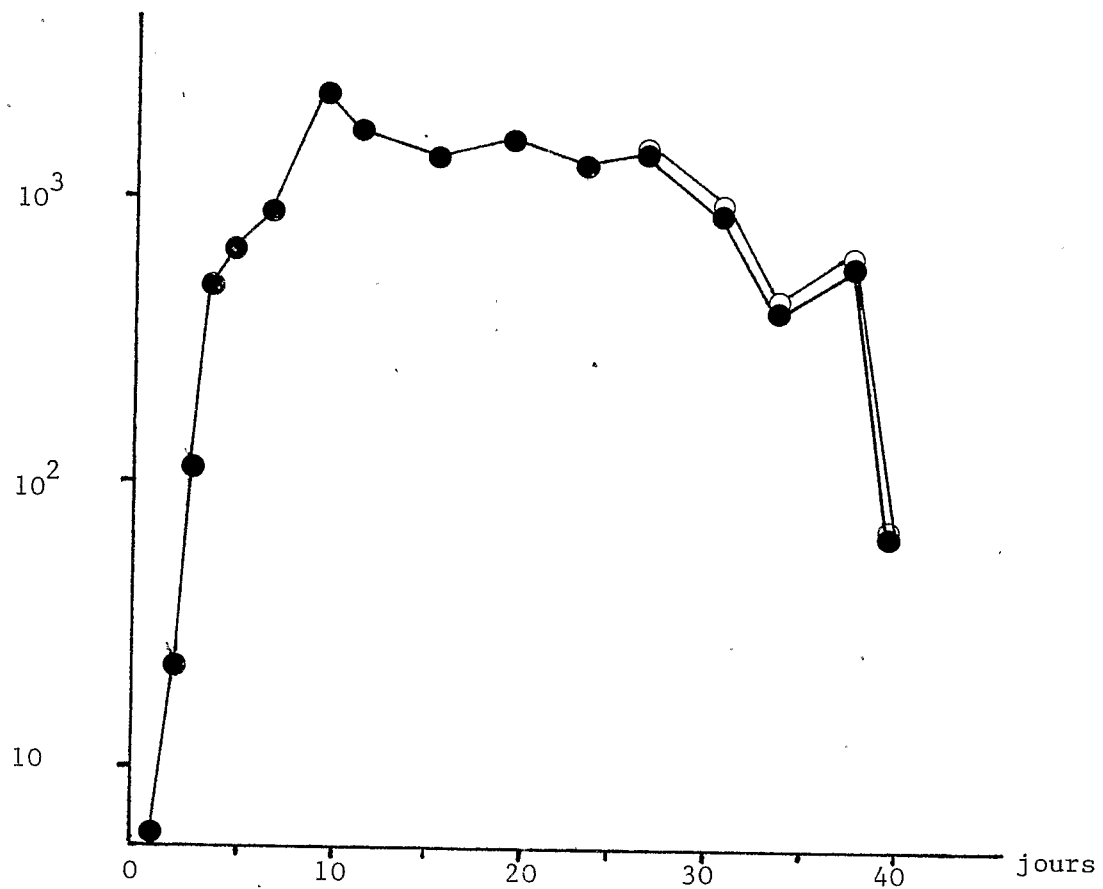


Fig. 3 : *B. sphaericus* tofaux (○) et spores résistantes à la chaleur (●) présentes dans le substrat d'un gîte artificielensemencé en larves de *C. quinquefasciatus* préalablement mises en contact au laboratoire avec 5 à 6 10⁵ spores de *B. sphaericus* 2362 par ml.