

IVe CONGRES SUR LA PROTECTION DE LA SANTE HUMAINE ET DES CULTURES EN  
MILIEU TROPICAL  
MARSEILLE 2-3-4 juillet 1986

VIABILITE ET PERSISTANCE DES SPORES DE BACILLUS SPHAERICUS  
DANS DIVERS MILIEUX AQUATIQUES

S. KARCH(1), J. COZ(1), J.L. JULLIEN(2), G. VIGO(2) et G. SINEGRE(2)

(1) Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer, 70, 74 Route  
d'Aulnay 93140 BONDY

(2) Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen  
165, Av. Paul Rimbaud 34030 MONTPELLIER-CEDEX

Résumé

Dans l'eau claire, les spores de Bacillus sphaericus perdent leur viabilité dans les premières 24 heures sous l'action des rayons solaires. Un fond de terre favorise leur viabilité. Dans l'eau polluée, les spores sont mieux protégées de cette action. La sédimentation est telle que quatre heures après leur application dans les milieux, le nombre de spores sur le fond est comparable à celui en surface, quelle que soit la qualité de l'eau, claire ou polluée.

Au cours des 40 jours d'essais, le nombre de spores accumulées au fond des gîtes est resté relativement constant dans l'eau polluée aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire. Ces spores viables ne semblent pas disponibles pour les larves de Culex pipiens.

Summary

In clear water, Bacillus sphaericus spores lose their viability through sun ray action during the first 24 hours but with a soil substrat they live longer. In polluted water, the spores are protected against sun ray action. Sedimentation is such that 4 hours after treatment the spore number on the bottom is similar to that on the surface whether the water is clear or polluted.

During the 40 days test, the spore numbers on the bottom remained comparatively stable in polluted water, in the laboratory as well as in the field. These viable spores do not seem to be available for Culex pipiens larvae.

Bacillus sphaericus ne possède aucune toxicité pour la faune aquatique non cible et pour les mammifères (MULLIGAN et al., 1978 ; de BARJAC, 1979). Plusieurs souches ont été isolées dont certaines sont très actives vis à vis des larves de moustiques. Actuellement, 58 souches sont connues (de BARJAC et al., 1985).

Une possibilité de recyclage de B. sphaericus a été évoquée par HERTLEIN et al., 1979. La persistance de la bactérie a été étudiée notamment par HORNBY et al. 1984 et par HOTI et BALARAMAN, 1984. DES ROCHERS et GARCIA, 1984 ; KARCH et COZ, 1984 ont observé une toxicité élevée des spores présentes dans les cadavres de larves, réussissant ainsi à infecter des larves saines de Culex pipiens.

La présente étude qui s'insère dans celle de l'évolution et du devenir des spores a été réalisée, d'une part en laboratoire dans différents types d'eau, d'autre part sur le terrain dans des gîtes à Cx pipiens du Littoral Méditerranéen Français.

Matériel et méthode

- Analyses bactériologiques : Les échantillons destinés à l'analyse subissent, dans les premières heures qui suivent leur prélèvement, un choc thermique à 80°C pendant 12 minutes au bain-marie. De la nystatine à 250 U/ml leur est additionnée dans un rapport de 1 à 9. Chaque échantillon est ensuite ensemencé à raison de 100 µl sur milieu solide MBS (KALFON et al., 1983) ayant reçu auparavant 100 ppm de streptomycine. La lecture a lieu après 48 heures d'incubation à 35°C ; l'identification des spores est faite en contraste de phase.

- Epreuves de laboratoire : Huit aquariums identiques, soit deux séries A et T de quatre sont exposés au soleil, en été, à l'extérieur du laboratoire. De la terre est déposée sur 2 cm d'épaisseur au fond des aquariums T puis tous reçoivent huit litres de milieu composé soit d'eau du réseau (A<sub>1</sub> et T<sub>1</sub>) soit d'un

ORSTOM Fonds Documentaire  
N° : 24 576 / 73 VII  
Cote : B  
- 6 JUL. 1988

mélange, en proportion croissante, d'eau et d'effluent primaire de station d'épuration. Les Indices de pollution (KAUL et al., 1977) sont alors proches des valeurs suivantes :

A1 et T1 : 2,3 ; A2 et T2 : 40 ; A3 et T3 : 113 ; A4 et T4 : 156 .

La hauteur d'eau est voisine de 20 cm .

Une poudre de la souche 2362 Dulmage est appliquée dans les huit aquariums à raison de 0,02 mg/l . Au jour Jo puis tous les sept jours, des échantillons de 2 ml sont prélevés à la surface et au fond . Parallèlement, 50 larves stade L2/L3 de Cx pipiens sont introduites dans les milieux . La mortalité est observée après 72 heures de contact .

- Epreuves de terrain : Trois poudres de B. sphaericus : 2 formulations (Dulmage et Abbott 6184) de la souche 2362 et la souche 2297 ou MR4 sont chacune appliquées aux concentrations de 0,0006, 0,02, 0,5 et 1,5 mg/l dans des gîtes identiques . Ces gîtes sont constitués par des cuves maçonnées, à ciel ouvert, de 2,7 m de côté, remplies avec de l'eau du réseau urbain sur une hauteur de 50 cm. L'eau stagnante se pollue rapidement et héberge dès lors de nombreuses larves de Cx pipiens .

Les échantillons destinés à l'analyse bactériologique ont été prélevés au fond des gîtes à l'aide d'un appareil spécial, mis au point par l'un de nous pour effectuer stérilement des prélèvements d'eau dans les puits et forages en vue de leur contrôle de qualité .

## Résultats

- Epreuves de laboratoire :

- Influence des rayons solaires sur la viabilité des spores :

Le dénombrement des spores en surface et au fond 4 heures après leur introduction dans les différents milieux montre une très nette diminution de leur viabilité en eau claire sans substrat . On ne retrouve en effet que 60 et 120 spores/ml respectivement en surface et au fond de l'aquarium A1 alors que leur nombre est le plus souvent supérieur à  $10^3$  dans les autres aquariums . Après 24 heures, les spores ont complètement perdu leur viabilité dans A1 .

On peut conclure de cette première analyse que la turbidité de l'eau liée à sa pollution protège les spores très sensibles aux rayons solaires et que la présence d'un substrat de terre joue dans le même sens .

Une mortalité de 82 % des larves de Cx pipiens a été observée sur le pool introduit dans A1 à Jo . Du fait de l'absence de spores variables après 24 heures, on peut conclure qu'un temps de contact de 4 h. suffit pour induire une mortalité considérable . KARCH, 1984 a, du reste, noté que des contacts de 4 heures produisent le même effet que ceux de 72 heures .

- Influence de la pollution et du substrat de terre sur la sédimentation et sur la persistance des spores :

Les histogrammes des figures 1 et 2 montrent qu'après quatre heures, la sédimentation est comparable dans tous les aquariums . Le nombre de spores sur le fond est à peu de chose près égal à celui retrouvé en surface, que l'eau soit polluée ou non, avec ou sans substrat .

Par contre, les histogrammes de la figure 1 tendent à montrer que la viabilité des spores est d'autant meilleure que l'eau est polluée . En surface, les spores gardent leur viabilité 7 jours en A2 et 14 jours en A3 et A4 . Sur la terre, la viabilité des spores a diminué en A2 à partir du 21<sup>e</sup> jour, aucune spore n'étant plus présente le 40<sup>e</sup> jour . En A3 et en A4, leur nombre est resté pratiquement constant pendant au moins 40 jours .

Les histogrammes de la figure 2 montrent que la terre contribue à augmenter

FIGURE 1 : Séquence de la sédimentation des spores de *B. sphaericus* souche 2362 et activité sur larves L2-L3 de *Cx. pipiens* dans les aquariums sans substrat de terre, à eau peu polluée (A2) moyennement polluée (A3) et très polluée (A4).

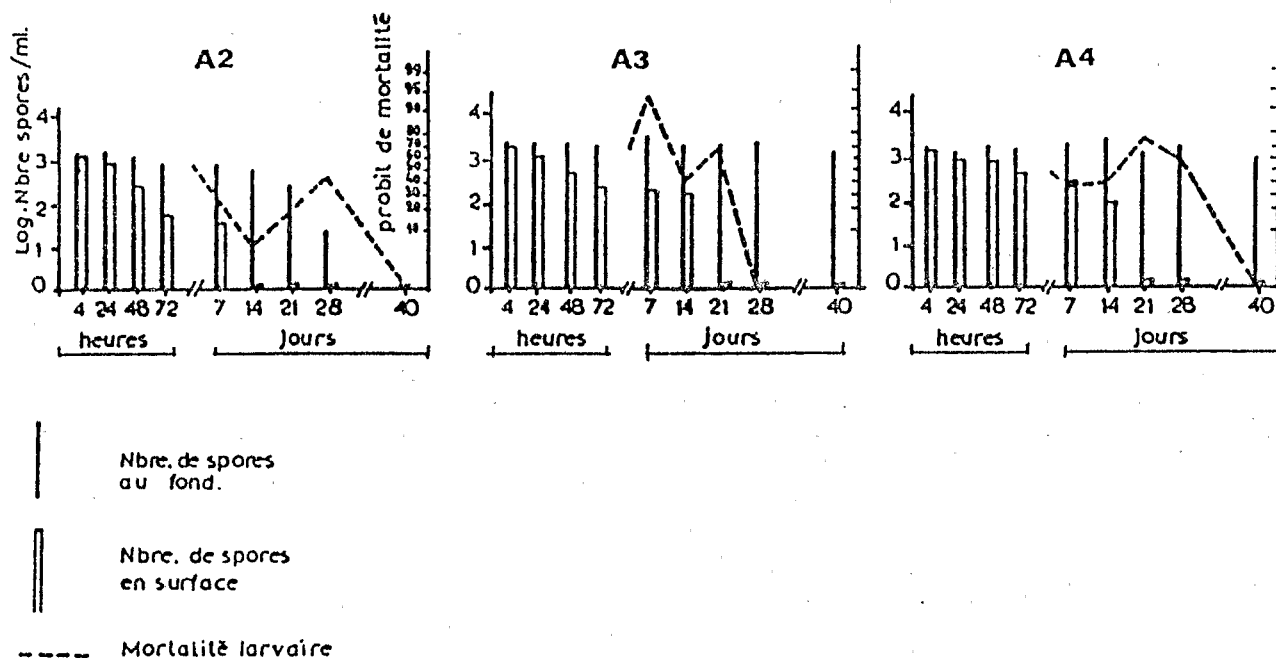
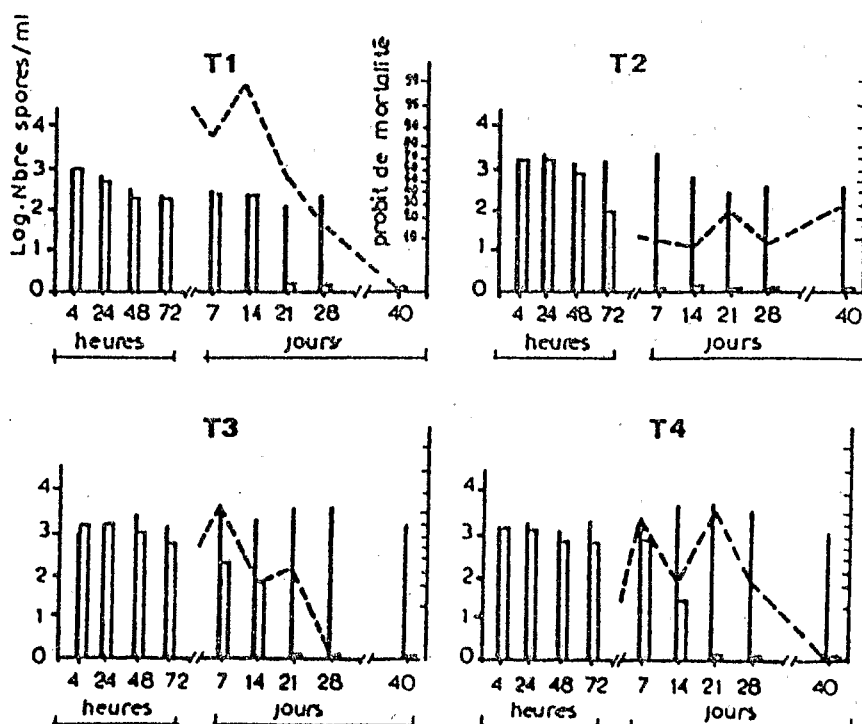


FIGURE 2 : Séquence de la sédimentation des spores de *B. sphaericus* souche 2362 et activité larvicide sur larves L2-L3 de *Cx. pipiens* dans les aquariums avec substrat de terre, à eau claire (T1), peu polluée (T2), moyennement polluée (T3) et très polluée (T4).



la viabilité des spores . En effet, en T1, en présence d'eau pure et de terre, la viabilité des spores est de 14 jours alors qu'elle est inférieure à 24h. en présence d'eau pure sans terre .

#### - Activité larvicide

Les graphiques liés aux histogrammes des figures 1 et 2 ne permettent pas d'établir une corrélation nette entre l'activité larvicide d'une part et, d'autre part, la nature du milieu, la présence du substrat de terre ou le nombre de spores. Ces divers facteurs jouent certainement un rôle que des études complémentaires plus fines pourraient mettre en évidence . On note seulement que dans tous les milieux à l'exception de T2, la mortalité diminue nettement à partir du 21e jour et qu'à J+40 il n'y a plus d'activité larvicide bien que les spores soient présentes sur le fond, souvent en nombre aussi élevé qu'en début d'expérience dans les aquariums A3 - 4 et T6 - 7 - 8 . On pourrait penser qu'après sédimentation la terre "masque" les spores comme l'ont montré SINEGRE et al., 1981 avec les cristaux de Bacillus thuringiensis . Ce facteur joue certainement un rôle mais il explique mal que les mêmes résultats soient obtenus en A3 - 4 sans fond de terre à moins que la sédimentation de la nourriture apportées aux larves en cours d'épreuve joue après plusieurs semaines le même rôle que le substrat .

#### - Epreuves de terrain

La numération bactériologique des 3 poudres a donné des résultats proches les uns des autres, à savoir :  $1,4 \cdot 10^9$  ,  $1,3 \cdot 10^9$  et  $1,9 \cdot 10^9$  respectivement pour les poudres 2362 Dulmage, 2362 Abbott et 2297 .

Les résultats du dénombrement, au cours du temps, des spores viables accumulées sur le fond des gîtes pour les concentrations initiales de 0,02, 0,05 et 1,5 mg/l de poudres sont donnés sous forme de graphiques figure 3 . Ces résultats confirment et prolongent ceux obtenus en aquarium : quelle que soit la poudre expérimentée, le nombre de spores accumulés sur le fond est élevé dès le 3e jour qui suit l'application . Ce nombre se maintient constant jusqu'au 28 e jour .

Sur le plan entomologique, les résultats détaillés concernant l'activité larvicide sur Culex pipiens font l'objet d'un article en préparation . Signalons toutefois que l'effectif larvaire s'est reconstitué dans les différentes cuves avant le 28e jour confirmant ainsi que les spores présentes au fond ne sont plus efficaces malgré la présence de cadavres quelle que soit la poudre utilisée .

#### Discussion et conclusion

Les rayons solaires détruisent totalement les spores de Bacillus sphaericus en eau claire dans les 24 heures qui suivent leur application, ce qui va dans le sens des travaux de MULLIGAN et al., 1980 . L'un des problèmes les plus importants est de connaître le devenir des spores après traitement et dans quelle mesure elles restent ou non disponibles pour les larves . HORNBY et al., 1984 pensent que la persistance de la bactérie dépend uniquement de la spore ; DES ROCHERS et GARCIA, 1984 ont montré que Bacillus sphaericus persiste en laboratoire pendant 20 jours et obtiennent une bonne activité vis à vis de Cx pipiens dans différents types d'eau en montrant qu'à l'extérieur, les cadavres de larves protègent les bactéries contre les effets délétères du soleil .

Nos travaux montrent que l'eau polluée et la présence de terre au fond des gîtes prolongent la viabilité des spores . La sédimentation rapide pose le problème de leur disponibilité pour les larves, c'est en effet en surface que se nourrissent essentiellement celles de Cx pipiens . Le phénomène de sédimentation de la matière active a été longuement évoqué pour Bacillus thuringiensis notamment par SINEGRE et al., 1981 et par HOUARD et al., 1983 .

Sur le terrain, dès le 3e jour, les spores des trois poudres accumulées au fond des gîtes restent en nombre sensiblement constant et gardent leur viabilité . Après sédimentation, elles ne semblent plus disponibles pour les larves, l'effectif larvaire se reconstitue en effet une semaine après l'application dans les gîtes traités à 0,5 et 1,5 mg/l.

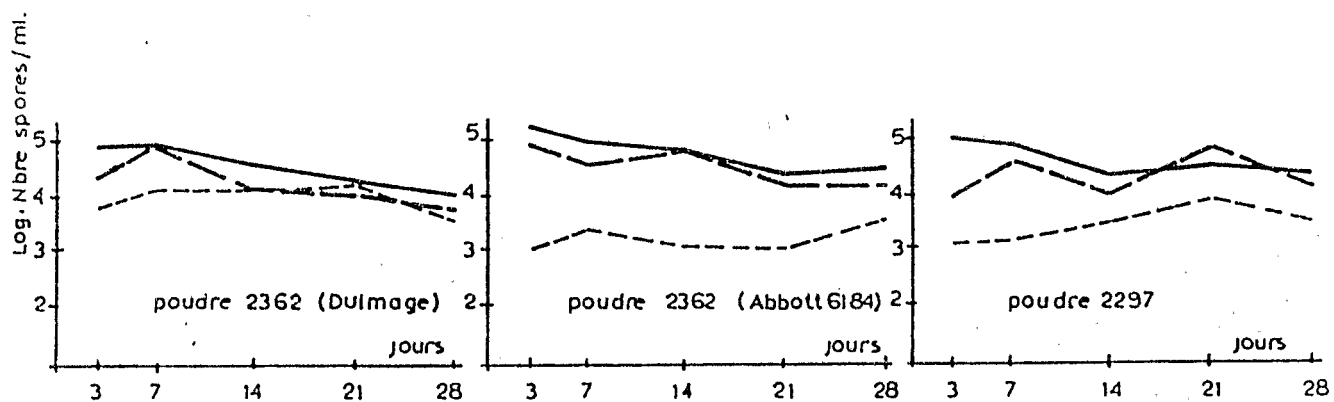


FIGURE 3: Nombre de spores viables accumulées au fond du gîte après application des poudres à 1,5 - 0,5 et 0,02 mg/l.

————— 1,5 mg/l.  
----- 0,5 mg/l.  
..... 0,02 mg/l.

Une bonne formulation de Bacillus sphaericus, assurant un maintien des spores en surface de l'eau, serait très utile dans le cadre de la lutte contre les populations de Cx pipiens devenant de plus en plus résistantes aux insecticides conventionnels .

#### Remerciements

Nous sommes reconnaissant envers toutes les personnes de l'E.I.D. Méditerranée qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Nous adressons nos très sincères remerciements aux Docteurs Y. VOLLHARDT et B. ANDRAL, respectivement Directeur Départemental et Chef du Laboratoire des Services Vétérinaires, à Montpellier pour nous avoir aimablement accueillis au sein de leur laboratoire de bactériologie .

#### Bibliographie

- de BARJAC H. LARGET I. COSMAO V. BENICHOU L. et VIVIANI G. 1979 . Innocuité de Bacillus sphaericus, souche 1593, pour les mammifères . WHO/VBC/79. 731, 20 pp.
- de BARJAC H. LARGET-THIERY I. COSMAO DUMANOIR V. et RIPOUTEAU H. 1985 . Sérological classification of Bacillus sphaericus strains on the basis of toxicity to mosquito larvae . Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 85-90.
- DES ROCHERS B. et GARCIA R. 1984 . Evidence for persistence and recycling of Bacillus sphaericus. Mosq. News. 44, 2, 160-165.
- HERTLEIN B.C. LEVY R. et MILLER T.W. Jr. 1979 . Recycling potential and selective retrieval of Bacillus sphaericus from soil in a mosquito habitat. J. Inverteb. Pathol. 33, 217-221 .
- HORNBY J.A. HERTLEIN B.C. et MILLER T.W. Jr. 1984 . Persistent spores and mosquito larvicidal activity Bacillus sphaericus 1593 in well water and sewage . J. Georgia Entomol. Soc. 19, 3, 165-167 .
- HOTI S.L. et BALARAMAN K. 1984 . Recycling potential of Bacillus sphaericus in natural mosquito breeding habitats . Indian J. Med. Res. 80, 90-94
- HOUGARD J.M. DARRIET F. et BAKAYOKO S. 1983 . Evaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de Bacillus thuringiensis sérotype H-14 sur Culex quinquefasciatus Say, 1828 et Anopheles gambiae Giles, 1902 S.L. (Diptera : Culicidae) en Afrique de l'Ouest . Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol. 21, 2, 111-117 .
- KALFON A. LARGET-THIERY I. CHARLES J.F. et de BARJAC H. 1983. Growth, sporulation and larvicidal activity of Bacillus sphaericus Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18, 168-173 .
- KARCH S. 1984 . Bacillus sphaericus, agent de lutte biologique contre Culex pipiens Linné, 1758 (Culicidae-Diptera) et contre d'autres moustiques . Thèse de Doct. Ing. Université de Paris XI, Centre d'Orsay .
- KARCH S. et COZ J. 1984 . Accélération de l'activité larvicide de Bacillus sphaericus sur Culex pipiens par l'ingestion de cadavres de larves de moustiques intoxiqués par ce bacille . Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol. 22, 3, 175-177.
- KAUL H.N., WATTAL B.L., SINGHA P. 1977. Chemical characteristics of Culex pipiens fatigans breeding waters in areas around Delhi . J. Commun. Dis. 9, 1, 8-21 .
- MULLIGAN F.S. SCHAEFER C.H. et MIURA T. 1978. Laboratory and field evaluation of Bacillus sphaericus as a mosquito control agent . J. Eco. Entomol. 71, 774-777.
- MULLIGAN F.S. SCHAEFER C.H. et WILDER W.H. 1980 . Efficacy and persistence of Bacillus sphaericus and Bacillus thuringiensis H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions . J. Eco. Entomol. 73, 684-688.
- SINEGRE G. GAVEN B. JULLIEN J.L. 1981 . 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. Parasit. 19, 3, 157-163 .