

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

ACTIVITE INITIALE ET RESIDUELLE DE BACILLUS SPHAERICUS DANS  
LES GITES LARVAIRES A CULEX PIPIENS DU SUD DE LA FRANCE

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

- (1) Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen  
165, Av. Paul Rimbaud 34030 MONTPELLIER-CEDEX
- (2) Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer, 70-74 Route  
d'Aulnay 93140 BONDY

Résumé

L'activité initiale et résiduelle de Bacillus sphaericus a été évaluée sur larves de Culex pipiens à partir d'expériences de laboratoire et d'épreuves de terrain. En laboratoire, en simulant les conditions de terrain avec fond de terre et eau polluée, les activités résiduelles des poudres DULMAGE et ABBOTT 6184 de la souche 2362 et celles de la poudre DULMAGE souche 2297 ont été comparées après cinq applications espacées de 15 jours et après une application. Les résultats indiquent que les poudres ont à peu de chose près les mêmes performances et qu'à l'issue de cinq traitements répétés, à 0,032 mg/l, l'activité résiduelle est légèrement supérieure à celle obtenue à l'issue d'un seul traitement à 0,032 mg/l. L'expérience montre sur le plan opérationnel, que les traitements répétés dans un même gîte n'augmenteront pas pour autant l'activité résiduelle de façon significative. Sur le terrain, dans de l'eau polluée contenue dans des cuves à ciel ouvert, l'activité des poudres 3 jours après traitement était voisine de 98 % à 25 mg/m<sup>2</sup>. Par contre, l'activité résiduelle n'excédait pas 3 à 4 jours à la dose maximale utilisée de 750 mg/m<sup>2</sup>, et ce malgré la présence de cadavres de larves sur le fond des gîtes. La formulation liquide BSP1 de SOLVAY, dérivant de la souche 2362 a été expérimentée dans un gîte naturel à 1 l/ha. A cette dose, l'activité est de 92,5 % après deux jours. La réduction d'effectif notée par la suite semble due à la suppression des géniteurs dans le gîte et non à un recyclage bactérien.

Summary

The initial and residual activities of Bacillus sphaericus have been determined against Culex pipiens larvae in laboratory and field tests. In laboratory conditions mimicking field conditions, i.e. soil substrat and polluted water, the residual efficiency of Dulmage and Abbott 6184 powders of strain 2362, and the Dulmage powder of strain 2297 were compared after 5 treatments at fortnight intervals and after only one treatment. The results show that the powders had similar efficiencies and that after 5 treatments at 0.032 mg/l, the residual activity was slightly higher than with only one at the same dosage. This shows that repeated treatments will not enhance significantly residual activity in operational conditions. In the field 3 days after treatment of open tanks containing polluted water, the powders had a 98 % efficiency at 25 mg/m<sup>2</sup>. At the highest dosage (750 mg/m<sup>2</sup>) residual activity lasted only for 3-4 days although larval cadavers were present on the bottom of the tanks. The Solvay liquid formulation BSP1 strain 2362 was tested in a natural breeding site at 1 l/ha. At this dosage the activity was 92,5 % two days after treatment. The subsequent activity was probably due to the absence of adults and not to bacterial recycling.

Dans le sud de la France, les larves du biotype autogène urbain et anthropophile de Culex pipiens colonisent les plans d'eau polluée. On les rencontre, par ordre décroissant d'affinité dans les fosses septiques, caves et vides sanitaires inondés, puis dans les égouts à ciel ouvert et bassins de lagunage (GABINAUD et al., 1985). En raison de leur nombre en secteur urbain, de tels gîtes doivent être traités avec des composés non toxiques pour l'utilisateur et dotés d'une activité résiduelle la plus prolongée possible de manière à éviter les applications trop fréquentes.

ORSTOM Fonds Documentaire  
N° : 24 580  
Cote : B M

- 6 JUL. 1988

Parmi les nouveaux agents de lutte susceptibles de suppléer aux insecticides organophosphorés vis à vis desquels l'espèce est devenue résistante (SINEGRE et al., 1984), Bacillus sphaericus paraît être l'un des plus prometteurs. Il est en effet sans danger pour les mammifères (de BARJAC, 1979 ; SHADDUCK et al., 1980) et les larves de Culex sont les plus sensibles aux souches entomopathogènes (DAGNOGO et COZ, 1982 ; MIAN et MULLA, 1983 ; BOURGOUIN et al. 1984 ; KARCH, 1984). Par ailleurs, de bons résultats ont déjà été obtenus en eau polluée, notamment par DAVIDSON et al., 1981, 1984 et par HOUGARD et al., 1985. Eu égard aux insecticides de synthèse, l'intérêt majeur de B. sphaericus est lié à la persistance des spores et à la possibilité d'un recyclage bactérien dans les cadavres de larves et/ou dans l'environnement, caractéristiques évoquées par plusieurs auteurs (HERTLEIN et al., 1979 ; DAVIDSON et al., 1984 ; DES ROCHERS et GARCIA, 1984 ; HORNBY et al., 1984 ; HOTI et BAMARAMAN, 1984 ; KARCH et COZ, 1984). Ces caractéristiques ne semblent pourtant pas conférer une activité résiduelle très prolongée sur les larves de moustiques d'après les résultats obtenus sur le terrain avec la souche 1593 par DAVIDSON et al., 1981 et par HOUGARD et al., 1985.

Dans la présente étude, nous avons évalué, à partir de tests de laboratoire et de terrain, l'activité initiale et résiduelle de quelques souches et préparations de B. sphaericus dans des conditions d'application et de milieu variées. L'un des tests de terrain a donné lieu à un suivi du devenir des spores. Les résultats font l'objet d'un article séparé (KARCH et al., 1986 (sous presse)).

#### MATERIEL ET METHODE

Les tests ont été réalisés avec les souches et les préparations suivantes : 2362 (poudre Dulmage), 2362 (poudre ABG 6184), 2362 (liquide émulsionnable BSPI Solvay) et 2297 (poudre Dulmage). Les poudres Dulmage ont été fournies par la Division contrôle biologique des Vecteurs de l'Organisation Mondiale de la Santé, la poudre ABG 6184 par les Laboratoires Abbott et la préparation liquide BSPI par les laboratoires Solvay.

Les suspensions-mère et dilutions successives ont été préparées avant chaque essai en dispersant les échantillons dans l'eau distillée et en agitant énergiquement. Les applications de terrain ont été faites au pulvérisateur à dos.

#### Epreuves de laboratoire :

- une expérience de laboratoire a permis de comparer l'activité résiduelle des poudres après plusieurs applications espacées de 15 jours et après une seule application. Des aquariums soustraits à la lumière solaire directe ont reçu, chacun, un substrat organique sur 10 cm d'épaisseur et 130 litres de milieu composé pour 4/5e d'eau du réseau et pour 1/5e d'effluent primaire de station d'épuration. Les milieux sont thermostatés à 25°C. L'opération consiste ensuite à introduire 200 larves au stade 3 par aquarium puis les suspensions bactériennes à la concentration de 0,032 mg/l, suffisante pour tuer toutes les larves en 72 h. La même opération est répétée cinq fois à 15 jours d'intervalle. L'activité résiduelle est suivie dès la dernière application en introduisant tous les sept jours et jusqu'à diminution notable de mortalité, 200 larves au stade 3 dont les survivantes sont dénombrées après 72 heures de contact. Parallèlement, l'activité résiduelle est suivie dans des aquariums agencés comme les précédents mais venant de recevoir une seule application de 0,032 mg/l. de poudre.

#### Epreuves de terrain :

- une première expérience de terrain a permis d'évaluer l'activité initiale et résiduelle des poudres, appliquées à différents dosages dans des gîtes péri-urbains tous identiques. Ces gîtes, à ciel ouvert et très ensoleillés sont constitués par des cuves cimentées de 2,7 m de côté, remplies avec de l'eau du réseau urbain sur une hauteur de 50 cm. De nombreuses larves de Cx pipiens colonisent les cuves après quelques jours. Des dippings portant sur les stades 3 et 4 sont effectués avant traitement puis 3, 7, 10, 14 et 17 jours après. Les poudres sont appliquées aux doses de 3, 10, 25, 75, 250 et 750 mg/m<sup>2</sup>. Parmi l'en-

semble des 22 cuves disponibles sur le site expérimental , quatre n'ont pas été traitées de manière à sauvegarder une population de moustiques suffisante pour recoloniser naturellement les cuves traitées . Une étude bactériologique a complété l'évaluation entomologique .

- une seconde expérience de terrain a permis d'évaluer l'activité initiale et résiduelle du concentré liquide BSP1 appliqué à 1 l/ha . Le gîte larvaire est un réceptacle d'effluents très pollués provenant d'une station d'épuration . Ce gîte est ombragé, il a une superficie de 600 m<sup>2</sup> et sa profondeur d'eau est voisine de 20 cm. Le fond est constitué par des cailloutis, de la boue organique et de débris végétaux . La densité larvaire était tellement importante que nous avons procédé par pesée des larves L3/L4 tamisées à la maille adéquate après capture au filet en quatre points de prélèvement régulièrement répartis sur le gîte . Les captures ont été faites deux et un jour avant traitement puis 2, 12, 19, 26 et 33 jours après .

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Epreuves de laboratoire :

Les résultats sont résumés dans les graphiques de la figure 1 . Ils montrent une excellente activité initiale des trois poudres, une concentration de 0,032 mg/l seulement étant en effet suffisante pour détruire les larves, que ce soit après une ou plusieurs applications .

L'activité résiduelle à J7 est légèrement plus élevée après cinq traitements qu'après un traitement . La différence est encore plus nette à J14. Par contre, à J21, on note avec les trois poudres une reprise d'activité après un seul traitement, particulièrement marquée avec ABG 6184 . A J28, il n'y a plus d'activité dans les milieux .

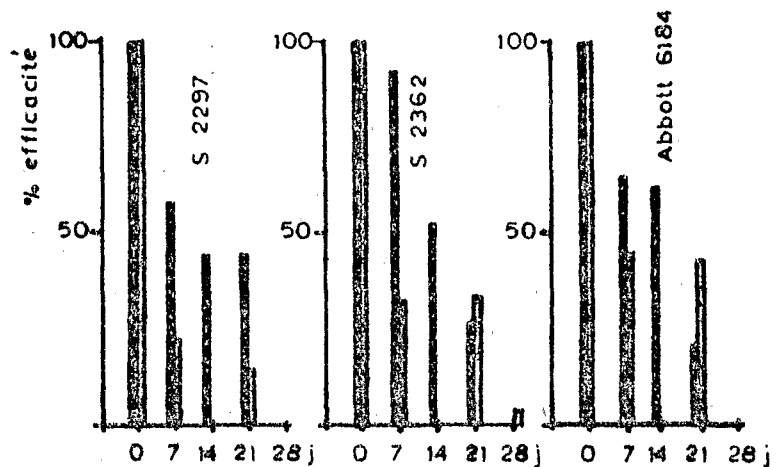


Figure 1 : Comparaison des efficacités larvicides résiduelles de *B. sphaericus* sur *Cx pipiens* en eau polluée, à l'issue de cinq applications à raison d'une tous les 15 jours (▬) et à l'issue d'une seule application (▨) .

Concentration de poudre par application :  
0,032 mg/l

Ces résultats pourraient témoigner d'un recyclage bactérien dont le processus nécessiterait de 15 à 21 jours pour qu'une certaine activité larvicide s'exerce dans nos conditions particulières de milieu . Après un seul traitement, l'activité à J7 pourrait être essentiellement due au complexe spores-cristaux introduits (DE BARJAC et CHARLES, 1983) alors qu'après cinq traitements l'activité résulterait de l'action conjuguée de ces derniers et des spores issues du recyclage .

D'un point de vue opérationnel, l'étude montre qu'il ne faut pas s'attendre à ce que l'activité résiduelle des poudres expérimentées augmente de façon très significative lorsqu'un même gîte larvaire aura été traité plusieurs fois.

### Epreuves de terrain :

- Les résultats de la première expérience sont résumés dans les graphiques de la figure 2 où sont portés, en ordonnée logarithmique, le nombre total de larves capturées en 4 dippings par cuve un jour donné . Compte tenu des effectifs élevés avant traitement, le plus souvent compris entre 500 et 1000 larves, on peut raisonnablement estimer qu'en dessous de  $\log = 1$  après traitement (moins de 10 larves par dipping) l'activité est excellente .

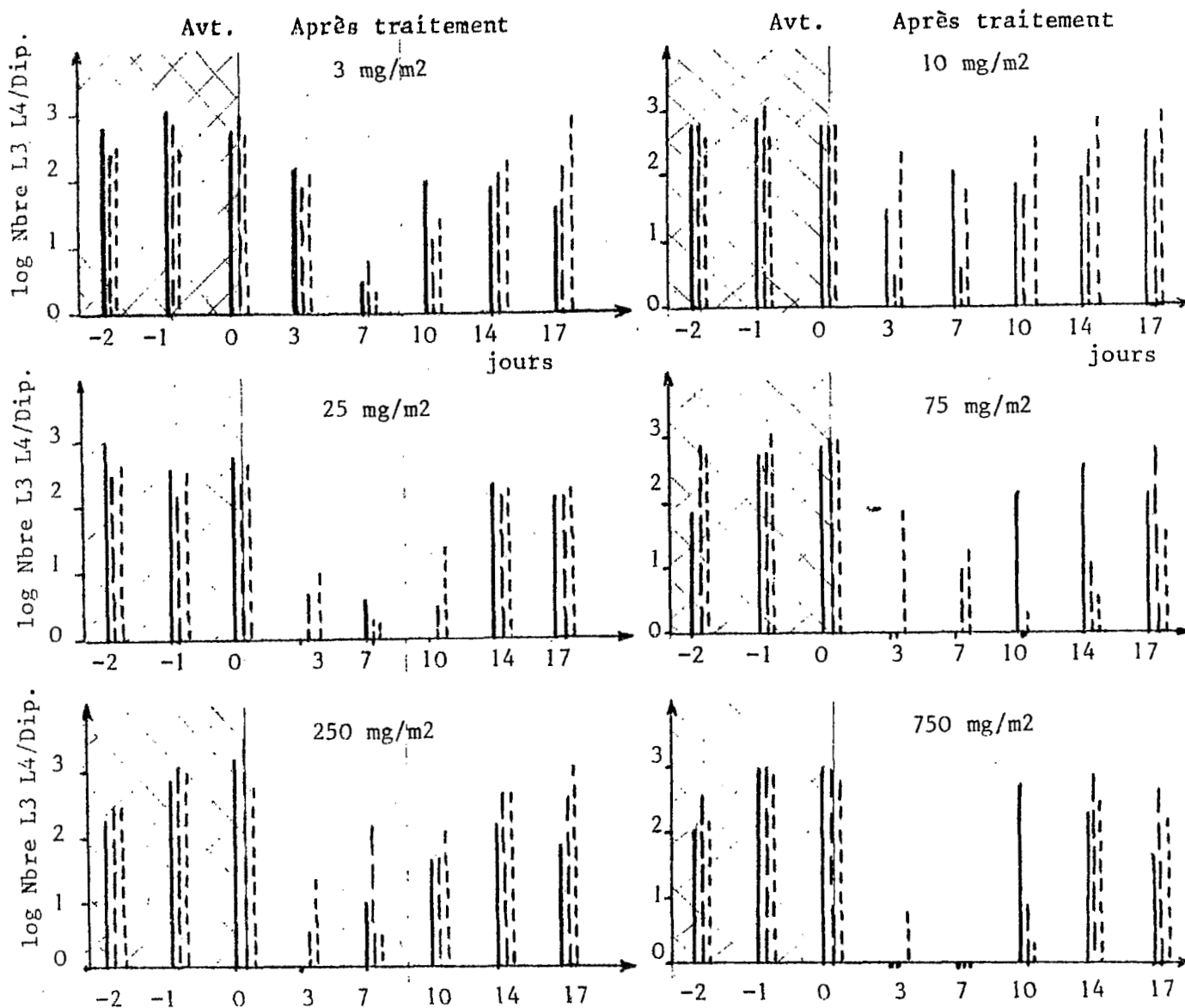


Figure 2 : Effectif larvaire de Culex pipiens, dans des cuves à ciel ouvert, avant et après traitements effectués avec les poudres :

————— DULMAGE 2362  
 - - - - - DULMAGE 2297  
 - · - · - ABG 6184

D'une manière générale, les histogrammes ne montrent pas de différence d'activité initiale marquée entre les trois poudres. La dose minimum efficace à J3 se situe entre 10 et 25 mg/m<sup>2</sup> ou entre 100 et 250 g/ha de poudre. Une action similaire est rapportée par DAVIDSON et al., 1984 avec les souches 1593 et 2362, actives à 122 et 244 g/ha sur Culex tarsalis. Indépendamment de sa bonne activité, Bacillus sphaericus agit rapidement contrairement à la plupart des inhibiteurs de développement. Les contrôles des traitements s'en trouvent largement facilités, ce qui est un atout important dans le choix d'un larvicide.

Nos résultats montrent par contre qu'au delà de 10 jours après traitement, les cuves sont toutes recolonisées. Aux doses les plus élevées - 250 et 750 mg/m<sup>2</sup> - on a capturé, en moyenne, de 100 à 600 larves âgées à J14 et J17 quelle que soit la poudre. La présence de ces larves, à ce stade de l'expérience, indique clairement que les larves écloses 3 à 4 jours seulement après les traitements se sont développées normalement. Il est possible qu'une certaine fraction de la population larvaire continue de mourir en présence de spores introduites ou recyclées,

l'analyse bactériologique montrant que leur nombre au fond des cuves, élevé dès le 3e jour, se maintient constant jusqu'au 28e et dernier jour de l'étude. Nos résultats montrent cependant que, d'un point de vue opérationnel, l'activité résiduelle des poudres expérimentées n'excède pas 3 à 4 jours à des doses d'emploi raisonnables, la plus forte équivalent à 7,5 kg/ha. Nos conclusions convergent avec celles tirées par DAVIDSON et al., 1981 et par HOUGARD et al., 1985 à partir d'essais de terrain réalisés dans des conditions proches des nôtres.

- Les résultats de la seconde expérience, résumés dans le tableau 1 montrent que la formulation BSPI de *B. sphaericus* réduit de 92,5 % l'effectif larvaire 48 heures après un traitement effectué à 1 l/ha, dose ayant été choisie en fonction de considérations techniques et économiques. On peut ainsi contrôler efficacement les populations de *Cx pipiens* en eau polluée à des dosages voisins de 1,5 l/ha de la formulation considérée.

Points de dipping	Pré-traitement		Post-traitement				
	J-2	J-1	J 2	J 12	J 19	J 26	J 33
A	65,8	121,7	38,6	61,2	48,9	41,2	92,5
B	117,4	119,7	4,8	39,4	46,1	75,4	97,4
C	264,1	189,6	1,5	19,9	31,5	44,4	86,3
D	308,1	177,9	0,7	11,3	3,9	23,1	33,3
Poids moyen/g	188,9	152,2	11,4	40	32,6	46,9	77,4
% Réduction	-	-	92,5%	76%	81%	72,5%	54,6%

Tableau 1 : Evaluation de terrain, en eau polluée et sur larves de *Cx pipiens* de la formulation liquide BSPI - 2362 - Solvay utilisée à 1 l/ha. Les résultats sont établis sur les poids donnés, en grammes, de larves récoltées au filet en quatre points A, B, C et D régulièrement répartis dans le gîte

Les résultats concernant l'activité résiduelle appellent certains commentaires. Il semblerait, à priori, qu'une activité notable persiste jusqu'à J 26. En réalité, la dynamique de population imaginaire au sein du gîte est en majeure partie responsable des réductions d'effectifs constatées. Le biotope traité est isolé de sorte que sa recolonisation par des moustiques issus d'autres gîtes est improbable à court terme. On a noté, par ailleurs, la présence de nombreuses pontes durant les cinq jours qui ont suivi le traitement. Celles-ci provenaient des femelles localisées aux abords du gîte avant traitement. Par la suite, les pontes sont devenues rares du fait de la diminution brutale du nombre des géniteurs dont la majorité des stades préimaginaux ont été tués. Ainsi, le développement larvaire s'effectuant en 10-12 jours, la réduction d'effectif notée à J 12 est due à l'activité de *B. sphaericus* sur les premiers stades larvaires durant les trois ou quatre jours qui ont suivi le traitement. Par contre, les réductions d'effectifs notées par la suite, et en diminution régulière du reste, paraissent essentiellement dues à la rareté des pontes. Cependant, rien dans cet essai ne permet d'exclure une activité partielle résultant d'un recyclage bactérien. Si tel est le cas, le recyclage ne suffit pas à assurer un bon contrôle bien que quelques conditions favorables aient été réunies, à savoir la présence de nombreux cadavres et l'absence de soleil affectant la viabilité des spores (MULLIGAN et al., 1980 ; DAVIDSON, 1984 ; KARCH et al., 1986).

#### CONCLUSION

Tous les résultats présentés montrent que les souches et formulations de *B. sphaericus* utilisées ont une excellente activité initiale sur larves de *Cx pipiens*. Il serait possible d'envisager l'emploi de cet agent biologique lors des opérations de démoustication en milieu pollué si l'activité résiduelle était améliorée par le biais de formulations spéciales évitant au complexe spores-cristaux de sédimenter rapidement. L'analyse de nos résultats montre en effet que la persistance d'action n'est pas supérieure à 3-4 jours à des doses raisonnables d'emploi. Pourtant, dans nos expériences, les conditions favorables à une multiplication des spores nous semblaient réunies.

BIBLIOGRAPHIE

- BARJAC H. de CHARLES J.F. 1983 . Une nouvelle toxine active sur les moustiques présente dans des inclusions cristallines produites par Bacillus sphaericus . C.R. Acad. Sci. Paris, Série III, 296 : 905-910 .
- BARJAC H. de LARGET I. COSMAO V. BENICHOU L. et VIVIANI G. 1979 . Innocuité de Bacillus sphaericus, souche 1593, pour les mammifères . Genève, Organisation Mondiale de la Santé, WHO/VBC/79.731 : 20 p.
- BOURGOUIN C. LARGET-THIERY I. et BARJAC H. de 1984 . Efficacy of dry powders from Bacillus sphaericus : RB 80, a potent reference preparation for biological titration . J. Invert. Pathol., 44 : 146-150 .
- DAGNOGO M. et COZ J. 1982 . Un insecticide biologique : Bacillus sphaericus . I. Activité larvicide de B. sphaericus sur quelques espèces et souches de moustiques . Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasit., 20, 2, 133-138 .
- DAVIDSON E.W. 1984 . Microbiology, pathology and genetics of Bacillus sphaericus: biological aspects which are important to field use . Mosq. News, 44, 2, 147-152 .
- DAVIDSON E.W. SWEENEY A.W. et COOPER R. 1981 . Comparative field trials of Bacillus sphaericus strain 1593 and B. thuringiensis var. israelensis commercial powder formulations . J. econ. Ent., 74, 3, 350-354 .
- DAVIDSON E.W. URBINA M. PAYNE J. MULLA M.S. DARWAZEH H. DULMAGE H.T. et CORREA J.A. 1984 . Fate of Bacillus sphaericus 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment . Appl. environm. Microbiol. 47 : 125-129 .
- DES ROCHERS B. et GARCIA R. 1984 . Evidence for persistence and recycling of Bacillus sphaericus. Mosq. News, 44, 2, 160-165 .
- GABINAUD A. VIGO G. COUSSERANS J. ROUX M. PASTEUR N. et CROSET H. 1985 . La mammophilie des populations de Culex pipiens pipiens L., 1758 dans le sud de la France ; variations de ce caractère en fonction de la nature des biotopes de développement larvaire, des caractéristiques physico-chimiques de leurs eaux et des saisons . Conséquences pratiques et théoriques . Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasit. 23, 2, 123-132 .
- 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. Invert. Pathol. 33, 217-221 .
- HORNBY J.A., HERTLEIN B.C. et MILLER T.W. jr. 1984 . Persistent spores and mosquito larvicidal activity of Bacillus sphaericus 1593 in well water and sewage . J. Georgia ent. Soc., 19, 3, 165-167 .
- HOTT S.L. et BALARAMAN K. 1984 . Recycling potential of Bacillus sphaericus in natural mosquito breeding habitats . Indian J. med. Res. 80, 90-94 .
- HOULARD J.M. KOHOUN G. GUILLET P. DOANNIO J. DUVAL J. et ESCAFFRE H. 1985 . Evaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de Bacillus sphaericus Neide, 1904 souche 1593-4 dans les gîtes larvaires à Culex quinquefasciatus Say, 1823 en Afrique de l'Ouest . Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasit. 23, 1, 35-44 .
- KARCH S. 1984 . Bacillus sphaericus, agent de lutte biologique contre Culex pipiens Linné, 1758 (Culicidae-Diptera) et contre d'autres moustiques . Université de Paris XI, Centre d'Orsay, 104 p. (thèse de docteur ingénieur) .
- 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. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasit., 22, 3, 175-177 .
- KARCH S. COZ J. JULLIEN J.L. VIGO G. et SINEGRE G. 1986 . Viabilité et persistance des spores de Bacillus sphaericus dans divers milieux aquatiques . In IVe Congrès sur la Protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical . Marseille, 2-4 juillet 1986 .

MIAN L.S. et MULLA M.S. 1983. Factors influencing activity of the microbial agent Bacillus sphaericus against mosquito larvae . Bull. Soc. Vector Ecol., 8, 2, 128-134 .

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. econ. Ent. 73, 684-688 .

SHADDUCK J.A. SINGER S. et LAUSE S. 1980 . Lack of mammalian pathogenicity of entomocidal isolates of Bacillus sphaericus . Environm. Entomol. 9, 4, 403-407.

SINEGRE G. 1984 . La résistance des Diptères Culicidés en France . In Colloque sur la Réduction d'efficacité des traitements insecticides et acaricides et problèmes de résistance . Paris, 20 mars 1984, 47-57 .

---