

Pathologie animale/Animal Pathology

## Persistence of *Bacillus sphaericus* dans un gîte à moustiques 4 ans après son introduction en vue de lutte biologique

Said KARCH, Nicole MONTENY et Jean COZ

**Résumé** — La souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* a été ré-isolée à partir de larves mortes de *Culex pipiens* et d'eau prélevées dans un gîte où elle a été introduite 4 ans auparavant (en juillet 1983) par traitement culicide. La bactérie isolée a été trouvée en nombre constant (1 500 bactéries/ml en moyenne) au fond du gîte, essentiellement sous forme de spore. Durant la période d'observation (août et septembre 1987), la présence de ces spores serait à l'origine de l'absence quasi totale des stades 3 et 4 et de nymphes de *Culex pipiens* en dépit de l'existence constante des jeunes stades larvaires.

### Persistence of *Bacillus sphaericus* in a mosquito breeding site 4 years after its introduction for microbial control

**Abstract** — Spores of the entomopathogenic strain 1593-4 of *Bacillus sphaericus* were isolated from dead larvae of *Culex pipiens* and water sampled from a pond treated with the same strain 4 years earlier (in July 1983). During the observational period (August and September 1987) the presence of these spores would result in the almost total absence of older larval instars and of pupae in the population of *Culex pipiens* despite the constant young larval stages of this mosquito (Fig. 1). The isolated bacterium amounted to a constant number (on an average number of 1,500 bacteria/ml) at the bottom of the pond and was mainly in the form of the spore (Fig. 2). Recycling of detoxicated bacteria in *Culex* larvae or in other arthropods may result in this long period control of a natural breeding site.

Les modalités d'action de microorganismes sur la dynamique des populations d'invertébrés des biotopes aquatiques ont pris une signification nouvelle depuis que, dans la lutte contre les arthropodes vecteurs de maladies ou vulnérants, les inconvénients des insecticides chimiques ont fait envisager la mise au point de méthodes de lutte biologique. En ce qui concerne le problème mondial des nuisances dues aux moustiques, la lutte microbiologique fait appel surtout à deux agents bactériens qui présentent une forte activité insecticide sélective pour les larves de moustiques et qui ont été isolés à partir d'échantillons de sol ou de larves trouvées mortes en milieu naturel [1] : *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14 (*B.t.* H 14) et *Bacillus sphaericus*. *B.t.* H 14 possède un large spectre d'espèces cibles (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Simulium*) alors que *B. sphaericus* est surtout actif sur des espèces du genre *Culex*.

Toutefois, les conditions du maintien et de la prolifération bactérienne dans les biotopes (« recyclage » d'après Hertlein [2]) sont encore mal connues : on sait que les spores de *B. sphaericus* germent et se multiplient à l'intérieur des larves de *Culex* ([3], [4], [5]) et peuvent persister dans le sol ainsi que dans l'eau pendant 9 mois au moins [6], mais le maintien d'une activité pathogène dans ces conditions n'a pas été mis en évidence. On a noté par ailleurs que dans le sol, *B. thuringiensis* peut conserver une activité insecticide décroissante pendant 135 jours [6]. Vu l'actualité de ces problèmes en écopathologie aquatique et leur intérêt médical, nous nous sommes proposés d'examiner l'incidence du recyclage sur la capacité des spores de *B. sphaericus* à persister dans un milieu soumis aux fluctuations climatiques saisonnières en région tempérée.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — *Choix des gîtes.* — Les gîtes expérimentaux ont été installés dans une jachère (O.R.S.T.O.M., Bondy-France) en tenant compte des critères considérés

Note présentée par Constantin VAGO.

0249-6313/88/03070289 \$2.00 © Académie des Sciences

30 JAN. 1996

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

N° : 43719

Cote : B ex 1

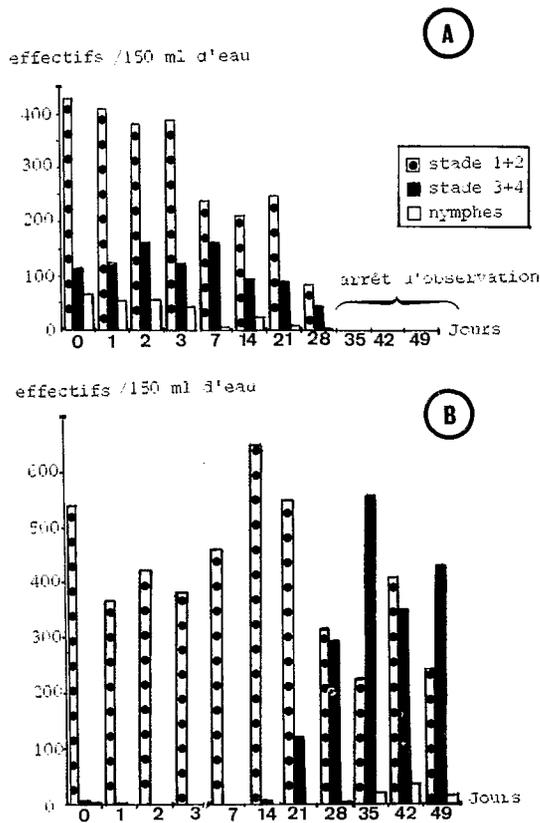


Fig. 1

Fig. 1. — Dénombrement des larves et des nymphes de *Culex pipiens* au cours d'une période d'observation de 49 jours. A : gîte témoin (l'arrêt d'observation est dû à l'apparition massive de prédateurs de larves dans cette mare); B : gîte traité 4 ans auparavant avec *B. sphaericus* souche 1593-4 (160 mg/m<sup>2</sup>).

Fig. 1. — Number of larvae and pupae of *Culex pipiens* during 49 days of observation. A: control (interruption of observation is due to a sudden invasion of predators in this pond); B: treated 4 years earlier with *B. sphaericus* strain 1593-4 (160 mg/m<sup>2</sup>).

Fig. 2. — Dénombrement des spores de *Bacillus sphaericus* présentes au fond du gîte B au cours de la période d'observation.

Fig. 2. — Number of spores of *B. sphaericus* on the bottom of site B during observation period.

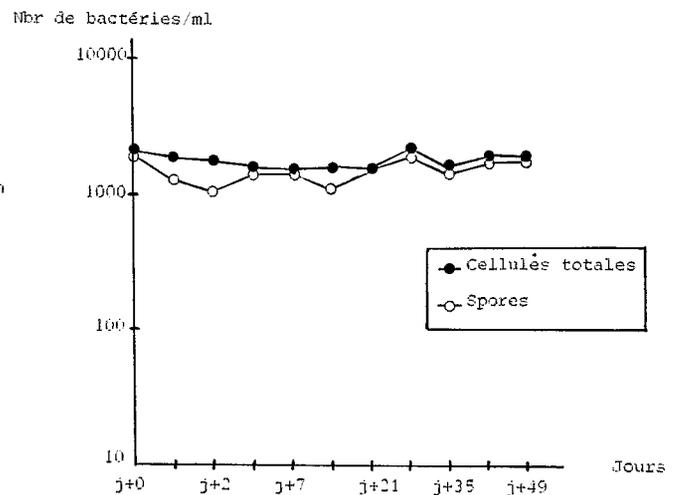


Fig. 2

comme facteurs de la persistance et du recyclage de *B. sphaericus* : forte teneur en matière organique, ombrage par un couvert végétal. Parmi les gîtes expérimentaux, deux ont été pris en considération pour cette étude : gîte A témoin (profondeur 15 à 25 cm, surface 12 m<sup>2</sup>), gîte B traité (profondeur 5 à 25 cm, surface 7 m<sup>2</sup>). Les deux présentaient une forte densité larvaire de *Culex pipiens* avant expérimentation.

**Traitement de lutte biologique. — Dose. —** En juillet 1983, le gîte B a reçu une dose unique de 160 mg/m<sup>2</sup> d'une poudre lyophilisée de *B. sphaericus* souche 1593-4 (Institut Pasteur, Paris). La suspension bactérienne a été projetée à la surface de l'eau à l'aide d'un asperseur (150 ml/mn).

**Efficacité. —** Trois jours après l'application, une suppression totale des populations larvaires de *Culex pipiens* a été observée dans le gîte B. Une persistance d'activité larvicide (récolte de larves mortes) était notée durant 20 jours.

*Souche de B. sphaericus. — Isolement.* — *B. sphaericus* est mis en culture sur un milieu sélectif M.B.S. [8] à partir des prélèvements (eau ou larves mortes). Deux aliquotes de chaque échantillon sont analysées séparément pour distinguer le nombre de cellules totales (végétatives et spores) et de spores seules : l'une d'elle est soumise à un choc thermique de 12 mn à 80°C qui tue les formes végétatives. L'activité toxique des colonies qui se développent est confirmée sur des larves de *C. pipiens* d'élevage.

*Caractérisation.* — La caractérisation de *B. sphaericus* est réalisée par immunofluorescence indirecte (anticorps anti-spores de *B. sphaericus* préparés sur souris puis anticorps anti-IgG de souris conjugués à l'isothiocyanate de fluoresceine).

*Identification.* — Les souches de *B. sphaericus* sont référées à un sérotype déterminé, par la méthode d'agglutination [9].

RÉSULTATS. — *Persistence de Bacillus sphaericus dans le gîte.* — En août 1987, 4 ans après l'introduction de *B. sphaericus* 1593-4, des souches bactériennes entomopathogènes ont été isolées à partir de prélèvements d'eau du gîte B et de larves de *C. pipiens* trouvées mortes. Les analyses ont précisé l'identité de ces souches à *B. sphaericus* 1593-4.

*Évolution de la population culicidienne.* — La comparaison de la densité larvaire de *C. pipiens* dans le gîte témoin A et dans le gîte B, 4 années après le traitement insecticide appliqué, révèle d'emblée un phénomène de limitation du stade de développement des populations d'insectes en pleine période d'activité (fig. 1) : dans le gîte témoin A, tous les stades larvaires et les nymphes sont présents simultanément ; alors que dans le gîte B, en dépit de la présence des stades 1 et 2 durant 2 semaines d'observation (10 au 24 août 1987), on note une absence quasi totale des larves stades 3 ou 4 et des nymphes. Ce n'est qu'en fin d'été (31 août) que les stades 3 et 4 sont présents ; quant aux nymphes, elles n'apparaissent qu'à partir de mi-septembre.

*Évolution de la population bactérienne.* — Des échantillons pour analyse bactériologique ont été prélevés dans les deux gîtes, en surface et au fond de l'eau, à plusieurs endroits.

Les résultats de ces analyses indiquent :

- que le gîte A témoin ne contient pas de *B. sphaericus* ;
- que la bactérie est ordinairement absente en surface de l'eau ;
- qu'elle se trouve essentiellement au fond du gîte B sous forme de spore (fig. 2) en nombre pratiquement constant au cours de 49 jours d'observation (de l'ordre de 1 500 spores/ml d'eau) ;
- que l'eau venant du fond du gîte B n'a qu'un effet de légère toxicité sur des larves de *C. pipiens* d'élevage ; mise en culture, elle donne lieu au développement de colonies dont les spores sont normalement toxiques.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Des observations citées dans la littérature écopathologique on peut retenir, malgré la difficulté de les comparer entre elles à cause de la diversité des gîtes larvaires et des souches de *B. sphaericus*, le fait que cette bactérie est susceptible de persister pendant quelques temps dans un milieu aquatique. Cependant c'est la première fois qu'elle est ré-isolée plus de 4 ans après son introduction par un traitement et que son efficacité est manifeste, comme le montre l'absence des stades larvaires âgés et des nymphes durant plusieurs semaines. En ce qui concerne les mécanismes susceptibles d'intervenir dans cette persistance, on reconnaît le rôle de la pathogénicité de *B. sphaericus*, liée surtout à la toxicité d'une inclusion cristalline associée à la forme sporulée, située principalement au niveau des cellules de l'épithélium intestinal des larves. Les lésions n'étant létales qu'environ 48 h plus tard, on observe une latence entre le

moment du premier contact avec le produit et la mort des larves. Ainsi dans un milieu à faible concentration en *B. sphaericus* les jeunes larves, très sensibles ne pourront se développer que pendant quelques jours, elles ne dépasseront pas les premiers stades de développement. L'équilibre entre les deux populations (bactérienne et larvaire) est cependant instable et sous la dépendance des facteurs qui peuvent les faire évoluer : pontes successives pour les moustiques, recyclage et dispersion pour la bactérie.

Pour certains auteurs ([3], [4], [10]) les larves de *Culex* représentent un milieu favorable pour la germination des spores; les cellules végétatives se multiplient puis redonnent des spores viables et toxiques qui sont libérées lors de la désintégration des larves mortes. Les arthropodes qui côtoient l'espèce visée pourraient intervenir dans le maintien de *B. sphaericus* dans le milieu pour une longue période en présentant des sites de protection : individus hibernant ou cadavres au fond du gîte. De même, en cas de perte de l'inclusion toxique décrite dans certaines conditions naturelles [11], un passage dans le tube digestif d'une première génération de larves de *Culex* ou d'autres arthropodes pourrait être à l'origine d'une nouvelle génération de spores, celles-ci toxiques.

Nos observations motivent, en particulier, les hypothèses considérant que la zone de nutrition des *C. pipiens* n'est pas strictement cantonnée à la surface, et que la bactérie est remise en suspension sous l'effet de mouvements de l'eau (inversions thermiques, bulles de fermentation, remous divers) ou par le transit dans le tube digestif d'autres espèces.

Ainsi, les spores de *B. sphaericus* présentes au fond des gîtes, à condition d'être dispersées (mécaniquement ou biologiquement), peuvent limiter le développement de la faune culicidienne. Enfin, il est à préciser que le recyclage est observé ici dans un milieu « fermé ». En milieu « ouvert », en eau courante ou en grandes superficies, dans le maintien de cet agent bactérien des mécanismes encore plus complexes doivent entrer en jeu aux niveaux des conditions physiques du milieu et des interactions avec la faune de l'écosystème. Plusieurs facteurs intervenant sont à l'étude, vu, en particulier, leur incidence probable sur l'efficacité et sur les modalités de la lutte biologique anticulicidienne.

Nous remercions M<sup>lle</sup> Véronique Cosmao Dumanoir (Laboratoire de la lutte biologique II à l'Institut Pasteur, Paris) pour la confirmation de l'identification de la souche bactérienne.

Note reçue le 10 mai 1988, acceptée le 16 mai 1988.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] W. R. KELLEN, T. B. CLARCK, J. E. LINDEGREN, C. B. HO, M. N. ROGOFF et S. SINGER, *J. Inverteb. Pathol.*, 7, 1965, p. 442-448.
- [2] B. C. HERTLEIN, R. LEVY et T. W. Jr. MILLER, *J. Inverteb. Pathol.*, 33, 1979, p. 217-221.
- [3] E. W. DAVIDSON, M. URBINA, M. S. MULLA, H. DARWASEH, H. DULMAGE et J. A. CORREA, *Appl. Environ. Micro.*, 47, 1984, p. 125-129.
- [4] S. KARCH et J. COZ, *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 24, 1986, p. 41-43.
- [5] L. NICOLAS, *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 24, 1987, p. 265-273.
- [6] S. SILAPANATAKUL, S. PANTUWATANA, A. BHUMIRATANA et K. CHAROENSIRI, *J. Inverteb. Pathol.*, 42, 1983, p. 387-392.
- [7] C. J. H. PRUETT, H. D. BURGESS et C. H. WYBORN, *J. Inverteb. Pathol.*, 35, 1980, p. 168-174.
- [8] A. KALFON, I. LARGET-THIERY, J. F. CHARLES et H. DE BARJAC, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 18, 1983, p. 168-173.
- [9] H. DE BARJAC, in H. D. BURGESS, Academic Press, London-New York, 1981, p. 35-43.
- [10] B. DES ROCHERS et R. GARCIA, *Mosq. News.*, 44, 1984, p. 160-173.
- [11] S. KARCH et J. F. CHARLES, *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)*, 138, 1987, p. 485-492.