

O. C. C. G. E.

Institut Pierre Richet

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

Institut Français de Recherche

Scientifique pour le

Développement en Coopération

PERSISTANCE ET RECYCLAGE DE BACILLUS SPHAERICUS

2362 DANS LES GITES URBAINS A

CULEX QUINQUEFASCIATUS EN AFRIQUE DE L'OUEST \*

par

L. NICOLAS \*\*

J.M. HOUGARD \*\*\*

J. DOSSOU-YOVO \*\*\*

J.M.C. DOANNIO \*\*\*

J. DUVAL \*\*\*

H. ESCAFFRE \*\*\*

N° 24/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.

\*\*\* OCCGE/IPR - B.P. 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE.

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire  
N° : 28681  
Cote : B

## INTRODUCTION.

A Bouaké (Côte d'Ivoire), des suivis entomologiques des populations de Culex quinquefasciatus dans des puisards traités par Bacillus sphaericus 1593-4 ont montré que cette bactérie semblait se recycler dans les cadavres de larves de moustiques, mais seulement dans quelques gîtes (HOUGARD et al., 1985). Cependant, l'impossibilité de réaliser sur place des études bactériologiques n'a pas permis de confirmer le recyclage de B.sphaericus dans ces gîtes. Le but de cette étude est par conséquent de compléter les données précédentes à l'aide d'analyses bactériologiques d'une part en évaluant la persistance et le recyclage de B.sphaericus dans les puisards, d'autre part en déterminant les paramètres de pollution de l'eau des gîtes afin de voir s'ils influent sur l'efficacité, la persistance et le recyclage de B.sphaericus. En effet, différents auteurs ont montré que le niveau et le type de pollution de l'eau pouvaient influencer l'efficacité, la persistance et le recyclage de B.sphaericus dans les gîtes à C.quinquefasciatus (DES ROCHERS & GARCIA, 1984 ; DAVIDSON et al., 1984 ; MULLA et al., 1984).

## MATERIEL ET METHODES.

### 1. EVALUATION DE B.sphaericus SUR LE TERRAIN.

#### 1.1. Les gîtes étudiés.

Cinq puisards ont été choisis dans la ville de Bouaké comme lieu d'étude. Deux types de puisards ont été retenus : 3 puisards à fond et parois cimentés, divisés en 2 à 3 compartiments, et 2 puisards creusés à même le sol argileux, à fond et parois non cimentés. La surface des puisards était comprise entre 0,4 m<sup>2</sup> et 1,8 m<sup>2</sup> et leur profondeur totale entre 0,90 m et 1,10 m au moment du traitement et la teneur en matières en suspension entre 10 et 450 mg/l selon les puisards. La température et le pH de l'eau en surface, ainsi que la hauteur d'eau ont été mesurés tous les 2 jours pendant l'étude. Des analyses bactériologiques ont été effectuées à l'Institut Pasteur d'Abidjan Cocody pour évaluer la concentration en germes anaérobies stricts et en germes aéro-anaérobies dans l'eau de surface et le substrat.

#### 1.2. L'entomofaune colonisant les puisards.

L'entomofaune a été évaluée par la méthode du dipping, prélèvement de 5 échantillons d'eau de surface à l'aide d'une louche, soit un volume d'eau d'un litre, prélevé dans les 10 premiers centimètres d'eau. Avant le traitement, les puisards étaient essentiellement colonisés par C.quinquefasciatus, à des densités larvaires pouvant atteindre 1300 larves stades III et IV par litre. Quelques larves de Culex cinereus et Culex decens ont été rencontrées à des densités toutefois inférieures à 10 larves stades III-IV par litre. Les densités larvaires et nymphales des espèces au moment du traitement sont données dans le tableau I en annexe. Outre des Culex, seules des larves de Psychodidés (Diptères) étaient présentes à des densités larvaires très rarement supérieures à 100 larves par litre.

#### 1.3. Le traitement insecticide.

Quatre des puisards ont été traités à 10 g/m<sup>2</sup> de BSP I (souche 2362), suspension concentrée contenant  $2 \cdot 10^{10}$  spores/g fournie par la firme Solvay. L'insecticide a été dilué au préalable à 1% dans de l'eau du

.../...

robinet et épanché à l'aide d'une bouteille.

1.4. Rémanence de l'insecticide et sédimentation des spores dans l'eau.

La mortalité des larves de C.quinquefasciatus a été estimée par la méthode du dipping 24 et 48h après le traitement, puis tous les 2-3 jours jusqu'à la réapparition de larves stade III et IV et de nymphes.

La sédimentation des spores a été suivie en prélevant des échantillons d'eau en surface, à 1 mètre de profondeur et dans le substrat avant, immédiatement après, 2h, 6h, 1, 2, 3 jours après le traitement, puis tous les 4-7 jours.

Tous les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à numération des spores. Des dilutions au dixième, d'un volume total d'un ml, ont été chauffés au bain-marie pendant 12 minutes à 80°C, et des aliquots de 0,1 ml de ces dilutionsensemencés par étalement en boîtes de Pétri sur milieu MBS (KALFON et al., 1983) à 15 g/l de bacto-agar et 100 mg/l de sulfate de streptomycine. Les boîtes ont été incubées à 30-32°C pendant 48h. 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 H5-1, préparé sur lapin à l'Institut Pasteur de Paris (de BARJAC et al., 1980).

2. RECYCLAGE EN LABORATOIRE DES SPORES DE B.sphaericus DANS DES LARVES DE C.quinquefasciatus.

Le recyclage de B.sphaericus dans des larves de C.quinquefasciatus a été étudié sur des larves dans des eaux provenant de trois puisards différents en comparaison avec des larves vivant dans de l'eau distillée. Les effluents des puisards étant essentiellement des eaux de douche, l'influence sur le recyclage de deux détergents couramment utilisés en Côte d'Ivoire, le savon de Marseille Blohorn et la lessive Hélios, a été aussi étudié. Des lots de 25 larves stade IV jeune ont été mis en contact pendant 1/4 h avec une suspension de 150 ml à  $2 \cdot 10^5$  spores/ml. Six types d'eaux ont été testés : 3 eaux de puisards filtrées

.../...

sur 200  $\mu$  m pour éliminer les particules non ingestibles par les larves, eau distillée, solution de savon à 100 mg/l, solution d'Hélios à 100 mg/l. Toutes contenaient 10 mg/l de levure de boulanger. Après 1/4 h de contact, les larves ont été rincées et remises dans le même type d'eau non traitée et contenant aussi 10 mg/l de levure de boulanger.

Des échantillons de 15 à 25 larves ont été prélevées à 1/4, 1, 4, 6, 12, 24, 48 et 72 h après le début du contact. Après désinfection superficielle à l'alcool 70 % et deux rinçages à l'eau distillée stérile, les larves ont été broyées dans 0,1 ml d'eau par larve. Lorsqu'un lot de larves contenait à la fois des larves vivantes et des larves mortes, ces deux catégories n'étaient pas broyées ensemble. Les broyats ont été congelés à - 20°C jusqu'au comptage des bactéries avant (CFU) et après (spores) pasteurisation à 80°C selon la technique décrite au paragraphe 1.4..

## RESULTATS.

### 1. EVALUATION EN PUISARD.

#### 1.1. Variation des caractéristiques de l'eau.

La température de l'eau en surface était de  $27,5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , avec une amplitude journalière inférieure à  $2^{\circ}\text{C}$ . Le pH moyen de l'eau mesuré in situ était compris entre 7,65 et 7,97 selon les puisards, atteignant les valeurs extrêmes de 7,21 et 8,25 pendant l'étude. La hauteur d'eau a peu varié au cours des deux mois d'observation, ces trois paramètres ont donc été relativement stables.

Selon les puisards, la concentration en germes anaérobies stricts était comprise entre  $10^2$  et  $10^4$  germes/ml en surface et entre  $10^5$  et  $10^8$  germes/ml dans le substrat. Celle en germes aéro-anaérobies variait de  $10^8$  à plus de  $10^{10}$  germes/ml en surface et était supérieure à  $10^{10}$  germes/ml dans le substrat.

#### 1.2. Résultats entomologiques.

La mortalité a été évaluée après le traitement en comparant le nombre de larves stade III-IV mortes au nombre total de larves présentes dans 5 dippings. La mortalité à 24h était comprise entre 99 et 100 % dans les 4 puisards, et atteignait 100 % à 48h. La réapparition de larves stades III a eu lieu au plus tôt entre 35 et 42 jours, soit 5-6 semaines, après le traitement. Tout au long de cette période, des pontes et des larves stade I (50 à plus de 2000/l) de C.quinquefasciatus étaient présentes dans les puisards mais n'ont jamais atteint le stade II.

D'autres espèces de Culex, C.decens, C.tigripes et surtout C.cinereus, ont été trouvées pendant cette période à des densités inférieures à 10 larves stade III-IV et nymphes par litre.

Il n'y a pas eu de diminution significative du nombre de larves et nymphes de Psychodidés, 24h après le traitement, malgré une ingestion de  $5 \cdot 10^3$  à  $10^4$  spores par larve.

### 1.3. Résultats microbiologiques.

La figure I en annexe montre que la diffusion du BSP I dans l'eau a été rapide puisque 6h après le traitement les spores étaient réparties de façon homogène de la surface au substrat (de l'ordre de  $10^4$  spores/ml). La sédimentation des spores en surface a été très lente, la concentration en spores viables passant de  $10^4$  spores/ml 24h après le traitement à environ  $10^2$  spores/ml deux mois plus tard. La concentration et la vitesse de sédimentation des spores à 1m de profondeur et en surface étaient similaires.

Le puisard n° 3 présentait cependant une concentration en spores viables en surface environ 10 fois moins élevée que dans les autres puisards, bien que la rémanence y ait été la même.

La sédimentation des spores dans le substrat semble suivre deux profils suivant le type de puisard. Dans les puisards à fond non cimenté (N° 3 et 4), la concentration en spores dans le substrat a diminué alors que dans les puisards à fond cimenté (N° 1 et 2), elle est restée stable ou a augmenté légèrement.

## 2. RECYCLAGE AU LABORATOIRE DES SPORES DANS LES LARVES DE C. quinquefasciatus.

### 2.1. Mortalité (tableau II en annexe).

La concentration en spores dans ces expériences en gobelets ( $2 \cdot 10^5$  spores/ml) était très proche de celle de l'eau de surface des puisards quelques minutes après le traitement à 10 g/m<sup>2</sup>, de façon à obtenir une mortalité aussi élevée que possible à 24h. Hormis dans l'eau savonneuse, où les témoins ont survécu moins de 4h, la mortalité des témoins des autres lots d'eau a été comprise entre 0 et 8%, à 72h. La mortalité des larves traitées dans l'eau distillée, l'Hélios et l'eau d'un des puisards (N° 5) était proche de 100 % à 24h, alors que dans les eaux des autres puisards (N° 3 et 4), respectivement 1/3 et 1/4 des larves étaient vivantes. Celles-ci ont été retirées des lots à broyer et mises en observation pour calculer la mortalité à 48h et 72h.

.../...

## 2.2. Evolution des spores dans les larves.

Dans les 6 types d'eau testés, l'évolution des spores dans les larves a suivi le même schéma (fig. 2). Le nombre de CFU et de spores a diminué entre 1/4h et 6 h puis a augmenté à partir de 12h pour atteindre à 72h une concentration par larve supérieure dans tous les cas à la quantité ingérée : il y a donc eu recyclage des spores dans les larves.

Le nombre de CFU ingérées en 1/4 h varie selon le type d'eau de  $4 \cdot 10^2$  CFU/larve dans l'eau savonneuse à  $8 \cdot 10^3$  CFU/larve dans l'Hélios. Alors que la suspension de BSP 1 contient environ 74 % de spores, résistantes à la chaleur, ce pourcentage n'est plus que de 5 à 10 % dans les larves 1/4 h après l'ingestion.

La concentration minimale en CFU par larve a été atteinte 6 h à 12 h après le contact et était au plus de 15 % du nombre de CFU ingérées. A partir de 12 h, le nombre de CFU a augmenté très rapidement jusqu'à atteindre  $10^5$  -  $10^6$  CFU et spores par larve dans 4 types d'eaux. La sporulation a commencé peu de temps après le début de la multiplication végétative des cellules ayant survécu à 12 h ; 60 à 98 % des CFU étaient sporulées à 72h. Dans l'eau savonneuse le recyclage dans les larves a été plus faible que dans les autres eaux.

DISCUSSION - CONCLUSION.

Les larves de C.quinquefasciatus vivant en surface, il est donc essentiel de disposer de produits à sédimentation très lente. Un traitement à 10 g/m<sup>2</sup> soit une concentration de 2 à 3.10<sup>5</sup> spores/ml d'eau en surface quelques minutes après le traitement, a entraîné une mortalité de 99-100 % en 24h, et pendant 5-6 semaines sur des populations larvaires stade III-IV dont les densités variaient de 90 à plus de 1300 larves par litre. La rémanence de l'insecticide s'est poursuivie jusqu'à un seuil de 1 à 5.10<sup>2</sup> spores/ml en surface, ce qui est proche des résultats d'autres auteurs (DAVIDSON et al., 1984 ; DES ROCHERS & GARCIA, 1984 ; MULLA et al., 1984).

La diminution du nombre de spores dans le substrat pourrait s'expliquer par une percolation des spores dans les couches profondes, phénomène qui serait limité dans les puisards à fond cimenté, ou par perte de la viabilité des spores après un séjour prolongé dans le substrat.

La faible concentration en spores dans le puisard n° 3 pourrait être due à sa teneur très élevée en matières en suspension (450 mg/l). Des expériences sont en cours à Bouaké pour étudier l'influence de celle-ci sur la vitesse de sédimentation des spores et l'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques de l'eau sur le maintien de la viabilité des spores dans l'eau et le substrat.

Des expériences de laboratoire ont montré que les spores se recyclaient dans les larves vivant dans de l'eau de puisard traitée. Le recyclage proprement dit, c'est-à-dire la multiplication des CFU ayant survécu dans les larves et la sporulation commence lors de la mort des larves. Les cadavres contenaient au plus 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> spores/larve trois jours après le traitement, chiffres également trouvés par DAVIDSON et al., 1984 ; DAVIDSON et al., 1975 et RAMOSKA & HOPKINS 1981. Le nombre de spores ingérées et la concentration à 72h semblent être inversement proportionnels à la teneur en matières en suspension des eaux de puisard. La lessive Hélios, à 100 mg/l, n'affecte pas le recyclage. Les larves n'ayant pas survécu plus de 4h dans

l'eau savonneuse, il n'est pas possible de préciser dans ces conditions si le recyclage aurait pu avoir lieu à un niveau aussi élevé que dans les autres eaux.

Malgré ces résultats de laboratoire encourageants il reste à vérifier si le recyclage a lieu également sur le terrain et à évaluer le rôle des spores recyclées par rapport aux spores issues du traitement dans la lutte antilarvaire. De plus, les cadavres des larves sédimentant moins de 48h après le traitement des puisards, les spores éventuellement recyclées à ce moment là sont hors de portée de larves vivant en surface.

Les recherches en cours à Bouaké vont donc porter sur le rôle de plusieurs facteurs (matières en suspension, densité larvaire notamment) sur l'ingestion des spores et leur germination, c'est-à-dire pendant la phase vivante des larves, puis, celles-ci sédimentant rapidement après leur mort, sur le rôle des paramètres du substrat (pH, O<sub>2</sub>, potentiel redox ...) sur la multiplication végétative et la sporulation de B.sphaericus à l'intérieur des cadavres. Enfin, des études seront menées pour suivre séparément la persistance d'activité, dans le substrat, de spores issues du traitement ou de recyclage dans les larves. Il s'avèrerait donc que dans des gîtes profonds dont le fond est hors d'atteinte des larves les spores présentes dans le substrat auraient comme rôle de servir de réserve insecticide qui pourrait être remise en suspension lors de vidanges des gîtes notamment.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- de BARJAC, H., VERON, M. & 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. & BRIGGS, J.D., 1975 - Pathogenesis of Bacillus sphaericus strain SSII. 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. & 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. & GARCIA, R., 1984 - Evidence for persistence and recycling of Bacillus sphaericus. Mosq.News., 44 : 160-165.
  
- HOUGARD, J.M., KOHOUN, G., GUILLET, P., DOANNIO, J., DUVAL, J. & ESCAFFRE, H., 1985 - Evaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de Bacillus sphaericus Neide, 1904 souche 1593-4 dans des gîtes larvaires à Culex quinquefasciatus Say, 1823 en Afrique de l'Ouest. Cah.ORSTOM.sér.Ent.méd.et Parasitol., sous presse.
  
- KALFON, A., LARGET-THIERY, I., CHARLES, J.F. & de BARJAC, H., 1983 - Growth, sporulation and larvicidal activity of Bacillus sphaericus. Ent. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18 :
  
- MULLA, M.S., DARWAZEH, H.A., DAVIDSON, E.W. & DULMAGE, H.T., 1984 - Efficacy and persistence of the microbiol agent Bacillus sphaericus against mosquito larvae in organically enriched habitats. Mosq.News., 44 : 166-173.
  
- RAMOSKA, W.A. & HOPKINS, T.L., 1981 - Effects of mosquito larval feeding behavior on Bacillus sphaericus efficacy. J.Invertebr. Pathol., 37 : 269-272.

N° puisard	Culex quinquefasciatus			Autres Culex		Psychodidés	
	Pontes	L1-L2	L3-L4	Nymphes	C.cinereus L3 - L4	C.decens L3 - L4	Larves Nymphes
1	1	17	130	23	-	-	-
2	1	4	90	5	-	-	1 2
3	0	> 100	> 300	6	-	-	1 1
4	2	> 1000	> 1300	8	4	1	- 1

**TABLEAU I.** : Entomofaune des puisards avant le traitement  
(individus/5 dippings = individus/litre en surface).

	H <sub>2</sub> O distillée		Hélios 100 mg/l		Savon 100 mg/l		Puisard 3		Puisard 4		Puisard 5	
	BS	T	BS	T	BS	T	BS	T	BS	T	BS	T
¼h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4h	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
6h	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
12h	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
24h	97,6	0	96	4	100	100	63,2	4	74,4	4	96,8	0
48h	100	0	100	4	100	100	72	8	79,1	4	100	0
72h	100	0	100	4	100	100	83,2		81,6	4	100	4

**TABLEAU II.** Mortalité (%) des larves de C.quinquefasciatus mises en contact avec une suspension à  $2 \cdot 10^5$  sp/ml dans différents types d'eau polluée (BS = traité, T = témoin).

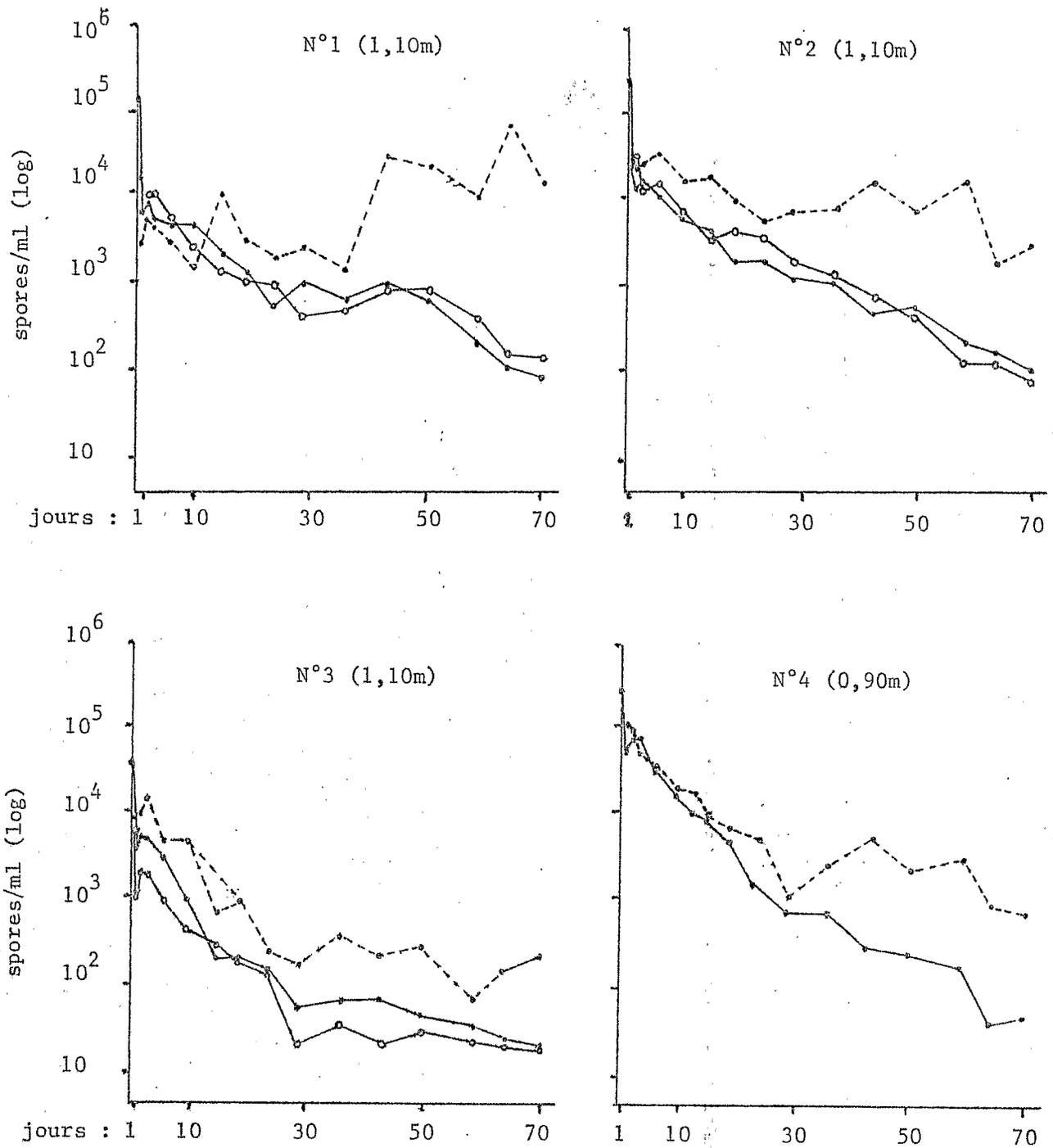


FIG. 1. Spores résistantes à la chaleur présentes dans les puisards après traitement à 10 g/m<sup>2</sup> de BSP 1 (souche 2362) :  
 —●— surface, —□— 1 m de profondeur, - - -▲- - - substrat.  
 N° 1 et n° 2 : puisards cimentés; n° 3 et n° 4 : puisards non cimentés.  
 (1, 10 m) : hauteur d'eau au moment du traitement.

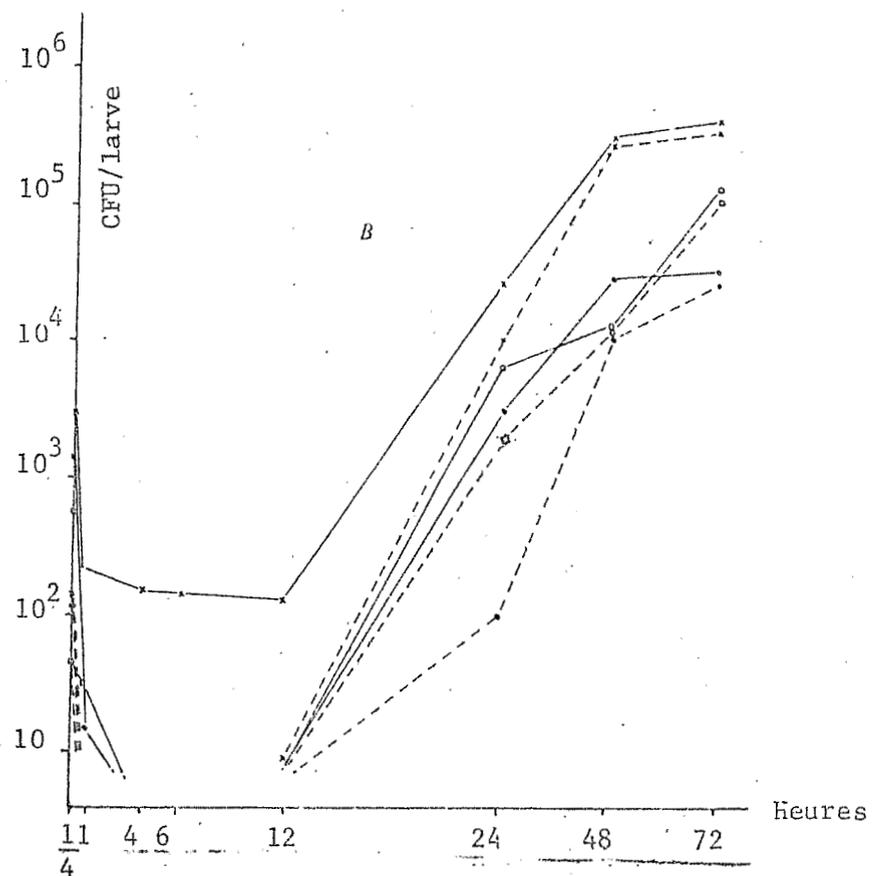
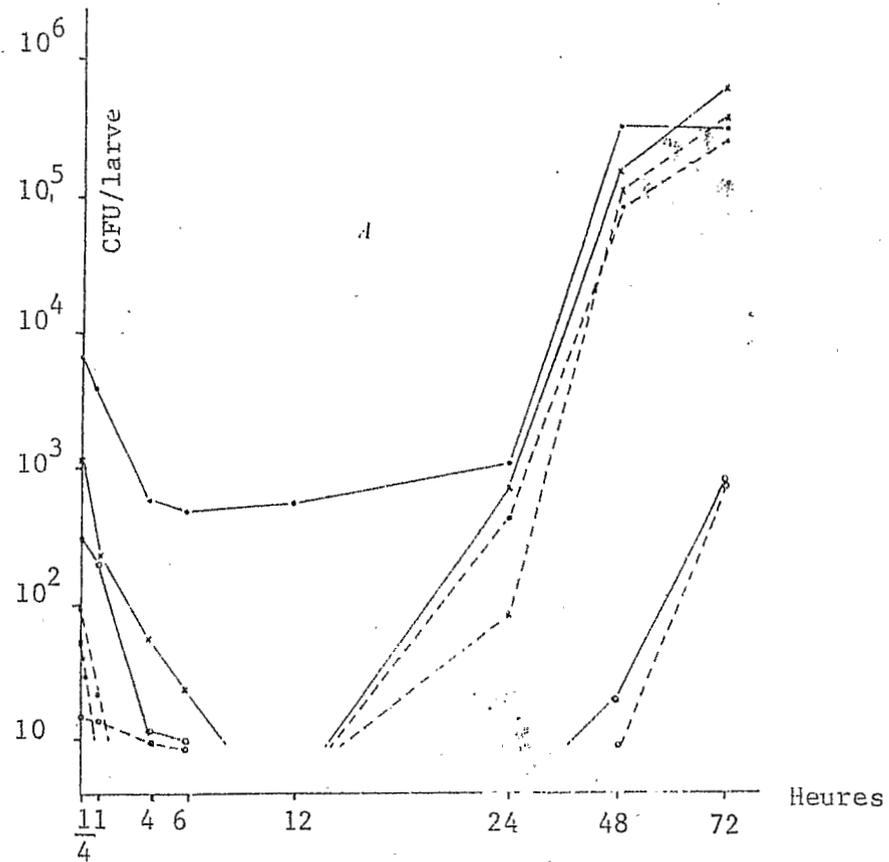


FIG. 2. - *B. sphaericus* totaux (—) et spores résistantes à la chaleur (---) présents dans les larves de *C. quinquefasciatus* mises en contact pendant 15 minutes dans les solutions suivantes de BSP 1 à  $2 \cdot 10^7$  spores par ml :

A : eau distillée, (•) solution d'Jellios à 100 mg/l, (o) solution de savon de Marseille à 100 mg/l.

B : eau des puisards n° 3 (•), n° 4 (o) et n° 5 (x).