

Intervention de l'entomofaune dans le recyclage et le potentiel d'action du complexe cristal/spore de *Bacillus sphaericus*, larvicide anti-moustiques ⁽¹⁾

Said KARCH ⁽²⁾, Nicole MONTENY ⁽²⁾,
Christine TONEATTI ⁽²⁾, Jean COZ ⁽²⁾

Résumé

La possibilité d'un recyclage ou d'une destruction par digestion de Bacillus sphaericus a été suivie chez des larves d'insectes cibles ou non : Culex pipiens, Anopheles stephensi, Culiseta annulata et Chironomus sp. Après la mise en évidence du recyclage de la bactérie chez les larves de Culex pipiens ainsi que chez celles d'Anopheles stephensi, le passage de cette bactérie dans le tube digestif d'espèces non sensibles comme Culiseta annulata et Chironomus sp. est suivi pour déterminer le rôle qu'elles peuvent jouer dans l'amplification de la bactérie dans le biotope et dans sa dissémination dans le milieu. Il n'y a pas nécessairement de lien entre le recyclage de cette bactérie et sa spécificité toxique vis-à-vis des espèces d'insectes.

Mots-clés : *Bacillus sphaericus* - Recyclage - Moustiques - Entomofaune.

Summary

ROLE OF ENTOMOFAUNA IN RECYCLING AND POTENTIAL ACTION OF CRYSTALLINE/SPORE COMPLEX OF *BACILLUS SPHAERICUS* AGAINST MOSQUITO LARVAE. *With the aim of studying the possibility of recycling or destruction of Bacillus sphaericus by digestion and their role in the residual activity, we followed this phenomenon in larvae of target and non target species : Culex pipiens, Anopheles stephensi, Culiseta annulata and Chironomus sp. Species treated with the strain 2362 showed progressive poisoning which is characterized by cessation of feeding. With time in target larvae, a recycling appeared more clearly in Culex pipiens than in Anopheles stephensi. In non target larvae, Culiseta annulata, it seems that the number of ingested bacteria was constant during 48 h. The Chironomus sp. larvae may play a role in the breeding site due to the multiplication of the bacteria in the larval gut. These bacteria may be degraded or ingested and a part was throwned in the medium. This phenomenon may contribute to its persistence ; the presence of non target species in the breeding site is very important because there is no relationship between the specific larvicidal activity of B. sphaericus and its recycling in the body of insecta. It appears to be very important to improve this phenomenon in natural conditions to explain the reason of the diversity in the results of different authors.*

Key words : *Bacillus sphaericus* - Recycling - Mosquitoes - Entomofauna.

(1) La présente étude bénéficie d'un soutien financier du Programme spécial PNUD/BANQUE MONDIALE/OMS de recherche et de formation concernant les maladies tropicales.

(2) Entomologistes médicaux, Laboratoire d'Entomologie médicale, ORSTOM, 70, route d'Aulnay, 93140 Bondy, France.

1. Introduction

L'introduction progressive de *Bacillus sphaericus* dans les campagnes de démoustication répond non seulement à la nécessité d'une action efficace sur le plan de la lutte contre certaines maladies tropicales transmises par les moustiques mais aussi à un besoin d'assainissement de l'environnement. *B. sphaericus* est une bactérie pathogène pour un grand nombre d'espèces de *Culex* et de certains *Anopheles*. Son utilisation en lutte antilarvaire présente les avantages de la spécificité que ne possèdent pas les insecticides chimiques. La précarité des équilibres biologiques incite à faire appel à des traitements non polluants. Un corps cristallin présent uniquement dans la forme sporulée de *B. sphaericus* est le support principal de la toxicité vis-à-vis des larves de moustiques (Kalfon *et al.*, 1984 ; Payne et Davidson, 1984 ; Karch et Hougard, 1986).

L'intérêt que présente *B. sphaericus* réside dans sa rémanence qui permet, dans certaines conditions, la suppression de la population préimaginaire, notamment de *Culex*, pendant plus d'un mois (Des Rochers et Garcia, 1984 ; Mulla *et al.*, 1984 ; Hougard *et al.*, 1985 ; Sinègre *et al.*, 1986). Des travaux plus récents ont mis en évidence l'existence d'un effet larvicide de *B. sphaericus* dans un gîte naturel à *Culex pipiens* quatre ans au moins après le dernier épandage (Karch *et al.*, 1988). Certains facteurs comme le rayonnement solaire et la composition de l'eau (Mulligan *et al.*, 1980 ; Karch *et al.*, 1986) peuvent modifier cette rémanence.

La sédimentation des spores après épandage dans les gîtes naturels limite l'efficacité de *B. sphaericus*. Cette diminution d'activité peut être observée, dans certaines circonstances, en dépit du maintien du nombre total de spores viables à un niveau pratiquement constant (Karch *et al.*, 1986). L'observation ultrastructurale de ces dernières montre alors une disparition progressive des cristaux au cours des semaines (Karch et Charles, sous presse). La décroissance de la toxicité pourrait être liée à la perte du matériel cristallin. Les spores gardent la propriété de donner naissance à une nouvelle génération de cellules végétatives qui, en sporulant, seront à nouveau entomopathogènes.

Il a été montré que ce recyclage pouvait se produire dans des larves de *Culex* (Davidson *et al.*, 1984 ; Karch et Coz, 1986 ; Nicolas, 1987). L'ensemble de ces observations conduit à rechercher dans les conditions naturelles les facteurs qui peuvent le favoriser.

La présente étude a été conduite pour déterminer le rôle éventuel des espèces d'arthropodes commensales des larves cibles dans le maintien de la population de *B. sphaericus* et de ses caractéristiques (viabilité, toxicité) dans le milieu naturel.

2. Matériel et méthodes

2. 1. CHOIX DES ESPÈCES

Espèces cibles : Deux espèces *Culex pipiens* et *Anopheles stephensi* présentant une sensibilité à la toxine de *B. sphaericus* ont été choisies pour illustrer le comportement alimentaire des larves d'espèces cibles.

Espèces non cibles : Deux espèces communément associées à *Culex pipiens*, *Culiseta annulata* et *Chironomus sp.*, on été prélevées d'un gîte naturel situé en région tempérée (Bondy - France). Les larves de *Chironomus sp.* vivent et se nourrissent au fond du gîte.

2. 2. SOUCHE BACTÉRIENNE

La toxicité d'une poudre mouillable de la souche 2362 (ABG 6184, ABBOTT) de *B. sphaericus* a été testée sur les larves de stade 3 et 4 jeune des quatre espèces d'insectes utilisées dans cette étude d'après la méthode d'évaluation des insecticides préconisée par l'OMS (OMS, 1963 ; OMS, 1985).

La toxicité est variable selon l'espèce, les CL 50 observées après 48 h de contact sont les suivantes :

- *Culex pipiens* : 0,005 mg/l
- *Anopheles stephensi* : 0,013 mg/l
- *Culiseta annulata* : les larves ne sont pas sensibles, à l'exception des jeunes stades pour lesquels on relève une faible mortalité aux doses très fortes, 5 et 10 mg/l.
- *Chironomus sp.* : les larves ne manifestent aucune sensibilité même à forte dose, 10 mg/l.

2. 3. TECHNIQUE DE MISE EN CONTACT

Les larves ne sont pas nourries durant les 12 heures qui précèdent l'expérimentation.

Deux protocoles de mise en contact avec *B. sphaericus* ont été appliqués, pour chaque espèce :

- contact continu : les larves sont maintenues dans la suspension de *B. sphaericus* tout au long de la période d'expérimentation ;
- contact interrompu : au bout d'un temps donné, les larves sont rincées et placées en eau bipermutée.

Selon le comportement alimentaire (observation préalable) et la sensibilité de l'espèce, les temps ont été différents : deux heures pour *Cx. pipiens* et *A. stephensi*, une heure pour *Cu. annulata* et 24 heures pour *Chironomus sp.* Les concentrations utilisées sont 0,1 mg/l pour *Cx. pipiens* et *A. stephensi* et 1 mg/l pour *Cu. annulata* et *Chironomus sp.*

2. 4. ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

L'étude du stade bactérien (cellules végétatives ou spores) à l'intérieur du tube digestif de chaque espèce a été effectué selon la technique suivante :

A différents moments, après contact continu ou interrompu, dix larves sont prélevées, rincées à l'eau bipermutée, broyées. L'échantillon dilué est partagé en deux aliots ; l'un d'eux est placé en attente dans la glace fondante, le second aliot est passé au bain-marie à 80 °C pendant 12 minutes. Le passage à la chaleur détruit les cellules végétatives et permet de compter le nombre de spores présentes dans l'échantillon. Des boîtes de Pétri contenant un milieu sélectif pour *B. sphaericus* (Kalfon *et al.*, 1983) sont ensemencées avec 0,1 ml de chaque aliot. L'ensemencement a lieu immédiatement après le traitement thermique pour éviter toute variation incontrôlable (prolifération, même à + 4 °C, ou mort des cellules végétatives par congélation).

Les boîtes de Pétri ensemencées sont placées à 35 °C ; le comptage des colonies est réalisé après 24 heures d'incubation.

3. Résultats

3. 1. LE RECYCLAGE CHEZ *CULEX PIPIENS*

Les observations sur l'évolution du nombre de bactéries dans les larves de *Cx. pipiens* montrent (fig. 1) que quelle que soit la durée du contact, la proportion de spores dans le total des cellules présentes diminue dès les premières évaluations indiquant une germination rapide de la bactérie dans un milieu qui lui est favorable. Par contre dès la mort des larves (24 heures après le premier contact), on assiste à une nouvelle sporulation qui s'étend à l'ensemble des cellules présentes dans le tube digestif. L'augmentation de la population bactérienne sans apport supplémentaire par ingestion (contact interrompu) met en évidence la multiplication des cellules végétatives qui entraîne une amplification de l'ordre de quatre fois en 24 heures. En fait, le recyclage est sous la dépendance de deux phénomènes : le premier, la *germination*, permet au second, la *multipliation*, d'avoir lieu.

3. 2. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE BACTÉRIES CHEZ *ANOPHELES STEPHENSI*

Une quantité importante de bactéries est ingérée par les larves d'*Anopheles stephensi* dès les deux premières heures de contact (fig. 2). Chez cette espèce comme chez *Cx. pipiens*, le comptage des cellules de *B. sphaericus* présentes dans le tube digestif révèle une augmentation du

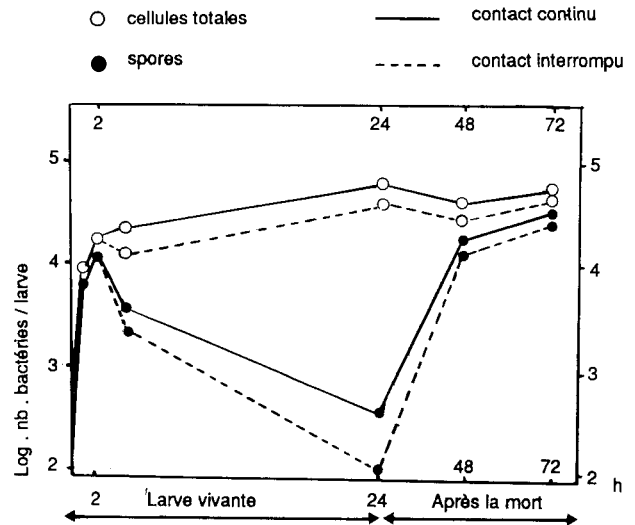


FIG. 1. — Cinétique de l'évolution de *B. sphaericus* 2362 (0,1 mg/l) dans le tube digestif des larves de *Culex pipiens*.
Kinetic of ingestion by *Culex pipiens* of spores of *Bacillus sphaericus*.
(Log. n° bacterial/larva, ○ total cells, ● spores, — continuous contact, - - - interrupted contact).

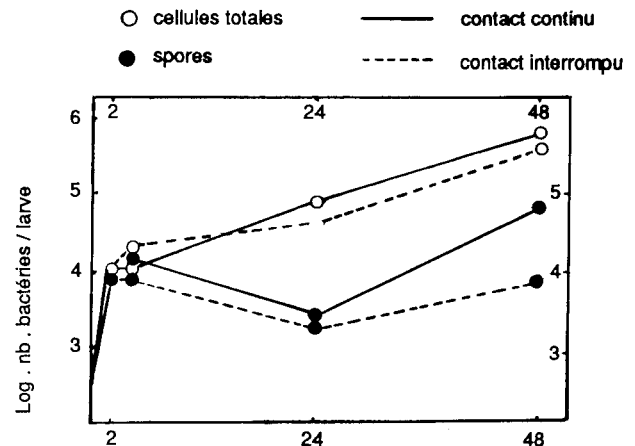


FIG. 2. — Cinétique de l'évolution de *B. sphaericus* 2362 (0,1 mg/l) dans le tube digestif des larves d'*Anopheles stephensi*.
Kinetic of ingestion by *Anopheles stephensi* of spores of *Bacillus sphaericus*.
(Log. n° bacterial/larva, ○ total cells, ● spores, — continuous contact, - - - interrupted contact).

nombre due à une prolifération bactérienne. Le facteur d'amplification est ici d'environ dix en 48 heures. *Anopheles stephensi* étant peu sensible, toutes les larves ne meurent pas à la concentration que nous avons utilisée. La sporulation, dans ces conditions, intéresse moins de 10 % de la totalité des cellules présentes.

3. 3. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE BACTÉRIES CHEZ *CULISETA ANNULATA*

Dès la première heure de contact, *Cu. annulata* ingère une grande quantité de bactéries (fig. 3). Ce nombre reste ensuite sensiblement constant, même si la larve a la possibilité d'en ingérer davantage. Ceci suggère qu'elle se nourrit de manière intermittente, ce qui n'a pas été observé chez les trois autres espèces étudiées. La germination des spores se produit pour environ la moitié d'entre elles dans les premières heures ; cette proportion augmente au cours du temps mais elle est accompagnée d'une diminution progressive de la quantité globale de cellules, indiquant soit une déjection, soit une dégradation à l'intérieur du tube digestif.

3. 4. DEVENIR ET ÉVOLUTION DE LA BACTÉRIE CHEZ *CHIRONOMUS SP.*

Lorsque les larves sont maintenues en continu dans la suspension de *B. sphaericus* (fig. 4), une quantité importante de bactéries est absorbée dès les premières 30 minutes. L'ingestion continue pendant 24 heures environ pour se maintenir à une valeur relativement constante ensuite. La très faible proportion de spores dénombrées (moins de 10 %) indique un milieu favorable à la germination. Dès que l'on prive les larves de l'apport constant de spores bactériennes, il se produit une chute brutale du nombre des cellules totales présentes dans le tube digestif indiquant, par comparaison avec ce qui précède, que les *Chironomus sp.* se nourrissent de manière continue lorsque les conditions le permettent. S'agissant essentiellement de cellules végétatives, la question se pose de savoir si elles sont digérées ou rejetées. Le comptage des bactéries présentes dans les déjections des larves va dans le sens d'un transit intestinal rapide. La larve en digère une part importante mais redissemine 2 à 3 % du nombre de spores ingérées, dans le milieu extérieur.

4. Discussion

Pour plusieurs auteurs (Davidson *et al.*, 1984 ; Des Rochers et Garcia, 1984 ; Karch et Coz, 1986 ; Charles et Nicolas, 1986), le tractus digestif des larves de *Culex sp.* constitue un milieu favorable à la germination des spores de *B. sphaericus*. Les cellules végétatives ainsi obtenues se multiplient. Elles redonnent des spores, viables et toxiques, qui sont libérées et disséminées dans le milieu lors de la désintégration des larves mortes.

Cette germination des spores et la prolifération bactérienne se retrouvent sous des modalités différentes dans d'autres espèces d'arthropodes même si celles-ci ne sont

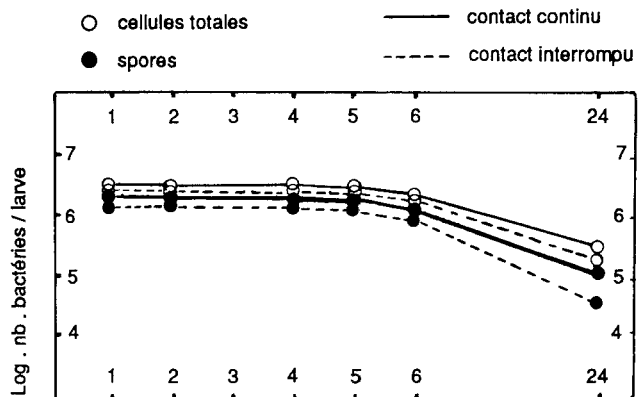


FIG. 3. — Devenir de *B. sphaericus* dans un tube digestif des larves de *Culiseta annulata* exposées à une dose de 1 mg/l.

Kinetic of ingestion by *Culiseta annulata* of spores of *Bacillus sphaericus*

(Log. n° bacterial/larva, ○ total cells, ● spores, — continuous contact, - - - interrupted contact).

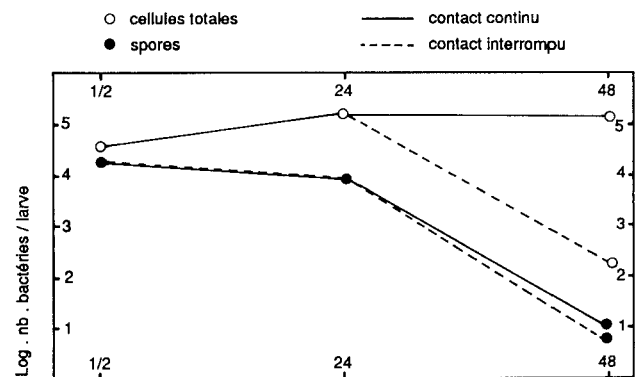


FIG. 4. — Devenir de *B. sphaericus* dans le tube digestif des larves de *Chironomus sp.* exposées à une dose de 1 mg/l.

Kinetic of ingestion by *Chironomus sp.* of spores of *Bacillus sphaericus*

(Log. n° bacterial/larva, ○ total cells, ● spores, — continuous contact, - - - interrupted contact).

pas sensibles à la toxine, autrement dit, il n'y a aucun lien entre le recyclage de *B. sphaericus* et son action entomopathogène. Ces populations larvaires commensales, non sensibles à *B. sphaericus*, participent à la dynamique du biotope. Les espèces choisies illustrent des types différents d'intervention possible :

- leur rôle se situe au niveau du recyclage des spores résiduelles qui combine une amplification du nombre et une dissémination continue ;
- les larves qui se nourrissent sur le fond du gîte interviennent en particulier dans la remise en suspension, compte tenu de la sédimentation rapide de la bactérie ;

— le transit alimentaire peut être l'occasion de la réactivation de spores qui auraient perdu leur inclusion toxique suite à un séjour prolongé au fond du biotope.

Selon l'espèce amplificatrice (espèces carnivores ou nécrophages de larves ou de zooplancton), on assiste à une modification de l'activité larvicide résiduelle dans le biotope. Il sera donc nécessaire de la prendre en compte lors de l'utilisation opérationnelle.

En fait lorsqu'il s'agit de gîtes urbains : bouches d'égoût, vides sanitaires, fosse couvertes, il est courant de ne rencontrer que des populations monospécifiques de *Culex*. La stratégie de lutte, particulière à chaque cas, sera donc adaptée aux conditions locales. Par contre, en zone rurale et périurbaine, les gîtes sont constitués de ruisse-

lets, de canaux de drainage ou de petites mares et sont densément peuplés d'une faune invertébrée.

Les conditions naturelles favorables aux espèces commensales sont des éléments essentiels. Elles permettent le maintien d'une faune susceptible de contribuer à la persistance de la bactérie dans le biotope.

Ces différents éléments interviennent dans le maintien de l'effet de limitation des populations culicidiennes par *B. sphaericus*. Ils peuvent en particulier expliquer les observations, faites par de nombreux auteurs, sur l'action larvicide de cette bactérie et sa rémanence ou recyclage dans certains milieux.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction, le 12 janvier 1989.

BIBLIOGRAPHIE

- CHARLES (J.F.) et NICOLAS (L.), 1986. — Recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 in mosquito larvae : a laboratory study. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 137 B : 101-111.
- DAVIDSON (E.W.), URBINA (M.), MULLA (M.S.), DARWAZEH (H.), DULMAGE (H.) et 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.) et GARCIA (R.), 1984. — Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. *Mosq. News*, 44, 2 : 160-165.
- HOUGARD (J.M.), KOHOUM (G.), GUILLET (P.), DOANNIO (J.), DUVAL (J.) et ESCAFFRE (H.), 1985. — Évaluation en milieu naturel de l'activité de *Bacillus sphaericus* Neid, 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.*, 23, 1 : 35-44.
- KALFON (A.), LARGET-THIERY (I.), CHARLES (J.F.) et de BARIJAC (H.), 1983. — Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 18 : 168-173.
- KALFON (A.), CHARLES (J.F.), BOURGOUIN (C.) et de BARIJAC (H.), 1984. — Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297 : an electron microscope study of cristal-like inclusion biogenesis and its toxicity to mosquito larvae. *J. Gen. Microbiol.*, 130 : 893-900.
- KARCH (S.) et COZ (J.), 1986. — Recycling of *Bacillus sphaericus* in dead larvae of *Culex pipiens* (Diptera - Culicidae). *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 24, 1 : 41-43.
- 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. IV^e Congrès sur la Protection de la Santé Humaine et des Cultures en milieu tropical. Marseille, 2-4 juillet 1986.
- KARCH (S.) et HOUGARD (J.M.), 1986. — Étude comparative au laboratoire du devenir de la matière active et des spores de *Bacillus sphaericus* 2362 et de *Bacillus thuringiensis* H-14 en milieu aqueux. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 24, 3 : 175-179.
- KARCH (S.) et CHARLES (J.F.), (sous-presse). — Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore / cristal complex used in the field. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*.
- KARCH (S.), MONTENY (N.) et COZ (J.), 1988. — Persistance de *Bacillus sphaericus* dans un gîte à moustiques 4 ans après son introduction en vue de la lutte biologique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 307, série III : 289-292.
- MULLA (M.S.), DARWAZEH (H.A.), DAVIDSON (E.W.) et DULMAGE (H.T.), 1984. — Efficacy and persistence of the microbial agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae in organically enriched habitats. *Mosq. News*, 44, 2 : 166-173.
- 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.
- NICOLAS (L.), 1987. — Potentialité de *Bacillus sphaericus* dans la lutte anti-vectorielle en Afrique tropicale. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 24, 4 : 265-273.
- O.M.S., 1963. — Insecticide resistance and vector control. Thirteenth report of the WHO expert committee on insecticides. *Org. Mond. Santé, sér. Rap. techn.*, 265 : 51-61.
- O.M.S., 1985. — Informed consultation on development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. *Org. Mond. Santé*, Geneva, 7-11 October 1985.
- PAYNE (J.M.) et DAVIDSON (D.W.), 1984. — Insecticidal activity of the crystalline parasporal inclusions and other components of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. *J. Invert. Path.*, 43 : 383-388.
- SINEGRE (G.), GAVEN (B.), JULLIEN (J.L.), VIGO (G.) et KARCH (S.), 1986. — Activité initiale et résiduelle de *Bacillus sphaericus* dans les gîtes larvaires à *Culex pipiens* du Sud de la France. IV^e Congrès sur la protection de la Santé Humaine et des Cultures en milieu tropical. Marseille, 2-4 juillet 1986 : 482-488.