

Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 sobre larvas de *Anopheles nuñeztovari*. Mérida, Venezuela.

Janeth E. Rojas¹, Milena Mazzarri¹, Mayira Sojo¹
y Giraldo Ysrael García-A².

¹Dirección de Endemias Rurales de Malariología del Ministerio de Salud y Asistencia Social, Maracaibo, Venezuela e

²Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba.

Palabras clave: *Bacillus sphaericus* 2362, bacilos, malaria, control biológico de vectores.

Resumen. Con la finalidad de evaluar la efectividad, persistencia en el tiempo y algunos factores que puedan afectar la acción del biolarvicida *Bacillus sphaericus* cepa 2362, se condujo un estudio en condiciones de laboratorio y campo con la formulación Griselef basado en bacterias esporógenas del tipo *Bacillus sphaericus* cepa 2362, sobre las poblaciones larvales de *An. nuñeztovari* Gabaldón, principal vector de la malaria en el occidente de Venezuela. Se determinaron los niveles de susceptibilidad en el laboratorio de esta especie al *Bacillus sphaericus*, ubicándose la CL50 en 0,07 ppm y la CL95 en 0,69 ppm. Los rangos de pH del agua, evaluados en el laboratorio, determinaron que los valores entre 7 y 9 no afectaron la acción del biolarvicida alcanzando mas del 95% de mortalidad larvaria a las 72 horas de observación. En condiciones controladas de campo se comprobó la alta susceptibilidad de larvas de *An. nuñeztovari* a la acción larvicida del producto, obteniéndose un 100% de mortalidad a las 72 horas de exposición. La variable radiación solar fue evaluada en estas condiciones, resultando que la misma influye en la efectividad del producto a las 12 horas de exposición, reduciéndose la efectividad en un 30%, sin embargo la presencia de la variable vegetación, redujo la efectividad del biolarvicida entre 5% y 12% en promedio. En condiciones naturales de campo se demostró que el biolarvicida fue efectivo al alcanzar un 100% de mortalidad larval en dos criaderos tratados, persistiendo el efecto hasta los 4 meses de observación, demostrando que el mismo es capaz de mantenerse en el medio, logrando mas de un 85% de reducción larval.

Evaluation of the effectiveness of *Bacillus sphaericus* strain 2362 on larvae *Anopheles nuñeztovari*. Mérida, Venezuela.

Invest Clín 2001; 42(2): 131-146

Key words: *Bacillus sphaericus* 2362, bacillus, biological control of vectors.

Abstract. A study, under laboratory and field conditions, was conducted to evaluate the effectiveness, persistence in the time and some factors that can affect the larvicidal action of the Griselef formulation of the sporogenous bacteria *Bacillus sphaericus* strain 2362, on the larvae population of the *Anopheles nuñeztovari* Gabaldón, the main malaria vector in western Venezuela. The degree of susceptibility of this species to the *Bacillus sphaericus* was determined to be at a LD50 in 0.07 ppm a LD95 in 0.69 ppm. The pH ranges of the water, as tested in the laboratory, showed that values between 7.0 and 9.0 did not affect the action of the larvicide, producing more than 95% of mortality after 72 hours of observation. Under controlled field conditions, the high susceptibility of the *An. nuñeztovari* larvae to the larvicidal action of the product was demonstrated. With a dose of 5 ml/m², a 100% mortality was obtained after 72 hours of exposure. In the field, it was determined that after 12 hours, solar radiation decreased the effectiveness of the *B. sphaericus* in 30% and that the presence of vegetation reduced the biolarvicidal effect between 5 and 12%. Under natural field conditions, it was shown that the larvicide was effective, since a 100% larval mortality was obtained in the two treated breeding places. This effect persisted up to 4 months of observation, with more than 85% of larvae reduction, showing that it is capable or remaining in the natural environment.

Recibido: 02-03-2000. Aceptado: 20-02-2001.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos maláricos que afectan al humano son transmitidos por mosquitos del género *Anopheles* Meigen (*Diptera: Culicidae*); de las 500 especies de anofelinos descritas, cerca del 20% están señaladas como vectores (1).

El deterioro de los programas antimaláricos actualmente se debe en gran parte a la resistencia generada por estos vectores a los insecti-

cidas químicos (2), debido a que la lucha contra estas especies vectoras en el mundo se ha venido realizando principalmente mediante estos métodos químicos (3). De 117 especies de mosquitos resistentes a insecticidas químicos, el 57% pertenecen al género *Anopheles* (4).

En Venezuela, las especies vectoras de malaria más importantes son: en la región Occidental, *An. nuñeztovari* Gabaldón; *An. darlingi* Root, en los estados Amazonas y Bo-

lívar y *An. aquasalis* Curry en el oriente de Venezuela. *Anopheles nuñeztovari* ha desarrollado un comportamiento exofílico, por lo que las medidas de control químico con insecticidas de acción residual intradomiciliar se han hecho inefectivas (5). Esta situación ha puesto de manifiesto que la lucha antivectorial no puede basarse únicamente en el control químico. Se hace necesario la implementación de métodos más efectivos para el control de este vector como alternativa al uso de insecticidas químicos.

En la actualidad a escala mundial se han ensayado gran variedad de agentes biológicos para el control de vectores dentro de los cuales se destacan los biolarvicidas elaborados a partir de bacterias esporógenas productoras de endotoxinas (*Bacillus thuringiensis* De Barjac (6) y *Bacillus sphaericus* Weiser (7)). Estos biolarvicidas por ser específicos de larvas de mosquitos son inocuos para la fauna y flora acompañante de los criaderos, garantizando la protección del ambiente y además son eficientes, factibles y usados en forma integral, coadyuvan en la reducción de la densidad de los vectores en tal medida que no constituyan riesgos para la salud y causen los mínimos efectos adversos, ajustándose con precisión a las condiciones epidemiológicas y a la ecología del lugar (8).

A pesar de que en el ámbito mundial estos métodos se utilizan para controlar poblaciones de mosquitos Culícidos (*Culicidae*) y Simúlidos (*Simuliidae*) con buenos resulta-

dos (8-14), en Venezuela es escasa la información acerca de la factibilidad del uso de los mismos como larvicidas; solo se conocen algunos estudios con *Bacillus thuringiensis*, sobre larvas de *An. aquasalis*, en el estado Sucre del Oriente del país (15-17) y en poblaciones naturales de larvas de *Aedes aegypti* en Aragua (18). Sobre la factibilidad del uso de *Bacillus sphaericus* como agente larvicida, no se tiene ninguna información, ni del efecto que el mismo puede ejercer sobre la dinámica poblacional tanto de anofelinos como sobre otras especies de culícidos.

El *Bacillus sphaericus* es un microorganismo Gram variable (puede teñirse Gram + como Gram -), aeróbico estricto, formador de esporas esféricas de allí su nombre, las cuales esporulan en un 100%. Posee unos cristales redondeados que son los productores de endotoxina. Esta toxina es la que ocasiona la muerte de la larva del mosquito (19). Al ser ingerida la toxina, ocurren cambios patológicos en las células del intestino de la larva, produciendo parálisis de la pared intestinal, cuyo mecanismo aún se desconoce (20). La existencia de cepas más tóxicas que otras dependen de la expresión genética de las proteínas que forman la toxina (21-23). Las cepas altamente tóxicas son la 1593, 2362 y 2297 (20). Su acción patógena depende de varios factores: dosis de aplicación, ingestión de la toxina por la larva, velocidad de alimentación de la misma y rapidez con la cual la bacteria cae al fondo del criadero y se vuelve inaccesible a los anofeli-

nos, competencia con otras materias orgánicas, grado de contaminación del agua, presencia o ausencia de vegetación y por último de los hábitos alimentarios de las especies del género *Anopheles*. Esto determina que el *B. sphaericus* presente un amplio rango de actividad larvicida (10, 24), siendo particularmente efectiva para los géneros *Culex* y *Anopheles* (25).

La persistencia y el reciclaje de este bacilo ha sido comprobado por varios autores los cuales refieren que el mismo puede ser influenciado por las actividades de otros insectos en el hábitat de los mosquitos (26), ya que las bacterias son capaces de germinar en el intestino de larvas de *Chironomus* spp y otros artrópodos como la *Daphnia*, los cuales son los responsables de la redistribución de esporas y bacterias (27).

En consecuencia, este estudio tiene la finalidad de evaluar la acción del biolarvicida *Bacillus sphaericus* cepa 2362 sobre larvas de *Anopheles nuñeztovari* el cual posee un valor potencial como método alternativo al uso de insecticidas químicos que han demostrado limitada efectividad en el control de este vector (5, 28).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la efectividad del *Bacillus sphaericus* cepa 2362 se utilizó la formulación líquida Griselelf (LABIOFAM) y larvas de *An. nuñeztovari* de III y IV estadio temprano (0-16 horas después de la muda), método utilizado por Mulla y col.

(29), cultivadas en el laboratorio de Endemias Rurales de Malariología en Mérida.

Para la cría de la larva *An. nuñeztovari*, se realizaron capturas nocturnas del mosquito con cebo humano (30), siguiendo la metodología recomendada por la OMS para captura de anofelinos (31). Se realizaron un total de 25 capturas en la localidad de Onia del Municipio Alberto Adriani del Edo. Mérida. Después de su captura fueron llevados al laboratorio bajo condiciones adecuadas de transporte (32), las especies fueron identificadas según las claves gráficas de Cova y Sutil, (33), posteriormente fueron separados en forma individual en vasos de cartón parafinados con un algodón con azúcar al 10% para su alimentación. En el fondo del vaso se colocó un papel filtro humedecido como superficie para la postura. Los huevos obtenidos se colocaron en bandejas plásticas de 50 cm y 120 ml de capacidad. Después de la eclosión fueron alimentadas con alimento para peces (Ictiosan) y Levadura (Squibb) (50% x 50%) triturados (34), hasta completar los estadios requeridos para las pruebas biológicas.

Bioensayo de Laboratorio

Las condiciones ambientales para los bioensayos fueron: 27,5°C ± 2,5°C y fotoperíodo de 12:12 horas.

Para la titulación del producto se realizó el conteo de esporas en una cámara de Neubauer con microscopio de contraste de fase con objetivo 40X, utilizando la fórmula: Título = N° de esporas x 5 x 10⁴ x di-

lución. El valor se expresa en esporas por ml, obteniendo el producto evaluado una titulación de 3×10^9 esporas por ml. (35) (Montero comunicación personal).

Para determinar las Concentraciones Letales (CL50 y CL95), se realizaron diluciones del producto según las normas para bioensayos estipuladas por el Instituto Pasteur (35), con la finalidad de obtener 6 concentraciones de la formulación. Estas diluciones se realizaron utilizando una pipeta graduada en microlitros, partiendo inicialmente con 100 del producto puro conteniendo 1000 ppm, de allí mediante diluciones seriadas se obtuvieron las concentraciones evaluadas: 0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm. El intervalo inicial de estos bioensayos se determinó mediante la revisión de investigaciones similares basándose en los valores mayores y menores obtenidos de CL50 y CL95 (10, 36-39).

Se realizaron 4 réplicas por cada concentración y un control. En recipientes de vidrio estéril de 120 ml de capacidad, se agregó 80 ml de agua de clorinada a pH = 7,2 y un total de 25 larvas de III y VI estadio temprano de *An. nuñeztovari*, contenidas en 20 ml de agua en iguales condiciones, con un volumen final de solución de 100 ml por cada réplica. El control se preparó en iguales condiciones solo que no contenía el biolarvícida. Este bioensayo se repitió en tres ocasiones diferentes, con intervalo de un mes cada uno a fin de corregir las posibles variaciones por efecto de la manipulación.

La mortalidad fue observada a las 48 y 72 horas de exposición, corregida por la fórmula de Abbot (40) si esta excedía del 5% en el control. Los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico, utilizando el paquete estadístico del programa Probit (41).

Para la determinación de los tiempos letales TL50 y TL95, se realizaron igualmente 4 réplicas en las mismas condiciones descritas y un control con la concentración de CL95 obtenida, observando la mortalidad después de 4, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de exposición.

Los tiempos letales (TL50 y TL95) fueron calculados a partir de la regresión: log tiempo exposición - % mortalidad; la significación de dicha regresión se determinó mediante la prueba chi cuadrado ($p < 0,05$) a través del análisis Probit (41).

En condiciones de laboratorio se evaluó la variable pH del agua y su influencia en la efectividad del producto, utilizando una concentración de 1ppm.

Se realizaron igualmente 4 réplicas para cada variación de pH. Se utilizó agua a pH = 7,2, añadiendo gota a gota solución de NaOH del 10 al 20%, hasta obtener rangos variables entre 7 y 9. Cada réplica se preparó de la forma siguiente: en envases de vidrio estériles se le agregaron 100 ml de agua con el valor de pH a evaluar, se le agregó la dosis respectiva de cada biolarvícida, agitando suavemente el envase para lograr un grado de homogenización de la solución, posteriormente se agregaron 25 larvas de *An. nuñeztovari*

de III y IV estadio temprano. El grupo control se preparó en iguales condiciones sólo que no fue sometido a cambio de pH. Los resultados se evaluaron a las 72 horas.

Ensayo en Condiciones Controladas de Campo

Con el fin de evaluar la efectividad así como también la influencia de las variables presencia de vegetación y radiación solar del *B. Sphaericus*, se realizaron ensayos en condiciones controladas de campo.

En la localidad de Caño Negro del Municipio Alberto Adriani, del Estado Mérida, Venezuela, se cavaron 4 huecos de 1m^2 y 20 cm de profundidad. Cada hueco fue cubierto por material plástico transparente (polietileno) para preservar el agua, a éstos se le agregaron 200 litros de agua aproximadamente, obtenida de fuentes naturales del área de trabajo. Se colocaron en cada uno, 200 larvas de *An. nuñeztovari* de III y IV estadio temprano, 3 réplicas, con la dosis de 5 ml/m^2 del producto puro disuelto en 95 ml de solución (agua natural), dosis ésta calculada según los resultados obtenidos de laboratorios, así como también las recomendaciones del fabricante (11) y un control bajo las mismas condiciones, pero sin tratamiento. Estos huecos se cubrieron con tapas de marcos de madera de 1m^2 con una malla de nylon fino de 0,89 mm cada orificio.

La mortalidad fue determinada por muestreos utilizando el método del jamo (42), valorando el porcentaje de reducción de la densidad larval

post-tratamiento, comparada con la densidad pretratamiento según la ecuación de Mulla y col. (29), este muestreo se realizó a las 72 horas. Las variables fisicoquímicas se midieron con Kits de Diagnóstico físico-químico.

Para evaluar la influencia de la variable radiación solar en la efectividad del *B. sphaericus* 2362 se cavaron huecos con las condiciones descritas, 3 réplicas por cada tiempo de exposición y dos controles, uno con sombra y tratamiento y otro en presencia de radiación solar sin tratamiento, con la finalidad de comparar ambos resultados. Se agregó a cada réplica una dosis de 5 ml/m^2 en 95 cc de solución (agua natural) y 200 larvas de *An. nuñeztovari*, éstos fueron expuestos a la radiación solar a intervalos de 4, 8 y 12 horas. Los huecos fueron cubiertos con tapas de 1m^2 realizadas con polietileno negro las cuales se colocaban al cumplirse las horas estipuladas de exposición a la radiación solar. Las observaciones y registros de mortalidad se realizaron en las siguiente 72 horas después de los distintos horarios de exposición.

La variable presencia de vegetación se evaluó mediante la clave empírica progresiva de abundancia de 5 términos según Margalef (43):

- 5= Masa muy abundante (100)
- 4= Masa abundante (60)
- 3= Medianamente numerosa (30)
- 2= Escasa (10)
- 1= Rara (1)

La vegetación para esta prueba fue la *Pistia stratiotes* o lechuga de

agua, especie ésta, encontrada frecuentemente en los criaderos naturales del área en estudio.

En los huecos con las características descritas, se realizaron 3 réplicas por cada escala de presencia de vegetación y se les agregó una misma dosis 5 ml/m² y 200 larvas de igual estadio con un control en iguales condiciones de vegetación, pero sin tratamiento. La evaluación se realizó mediante la valoración de la mortalidad después del tratamiento a las 72 horas.

Todos los huecos de las pruebas hechas en condiciones controladas de campo fueron cubiertos con tapas de marcos de madera y nylon fino para evitar la entrada de insectos, así como también para capturar cualquier mosquito que haya podido pasar al estado adulto, durante el estudio.

Ensayo en condiciones naturales de Campo

La última etapa de la investigación planificada consistió en la aplicación en condiciones naturales del *B. sphaericus* 2362, para evaluar la efectividad del mismo en reservorios naturales. Para ello se midieron previamente los índices larvarios antes del tratamiento y se estableció la acción efectiva calculando posteriormente el porcentaje de reducción del total de larvas en los criaderos de mosquitos tratados, utilizando la ecuación de Mulla y col. (29):

$$\% \text{ de Reducción} = 100 - \frac{C1 \times T2}{T1 \times C2} \times 100$$

C1 Densidad larvaria pretratamiento en el control.

T1 Densidad larvaria pretratamiento en el criadero a tratar.

T2 Densidad larvaria postratamiento.

C2 Densidad larvaria postratamiento en el control.

La dosis calculada en campo fue de 10 ml/m² disueltos en 90 ml de agua natural del mismo criadero, obteniendo una solución final de trabajo de 100 ml por cada m².

Para esta etapa se escogieron 3 criaderos, para dos réplicas y un control, los mismos se ubicaron en el Municipio Alberto Adriani, ubicado a 135 m sobre el nivel del mar con temperaturas máximas de 32°C y mínimas de 22°C (promedio 26°C) y humedad relativa entre 70 y 100% (promedio 80%), precipitación pluvial entre 1000 y 2000 mm, (promedio 1800 mm) al año.

La aplicación del biolarvícida se realizó con equipos de aspersión Hudson de 12 litros de capacidad a una presión de 50 psi.

Durante los muestreos pretratamiento se determinaron las especies de mosquitos presentes, la densidad larvaria, fauna acompañante, flora existente, además se realizaron mediciones en m² del área de criadero a tratar para el cálculo de las dosis a aplicar y se midieron las variables físico químicas del agua del criadero con los kits de diagnóstico físico químicos.

RESULTADOS

Bioensayos de Laboratorio

Durante el proceso de cría de larvas se obtuvo un 25% de producción durante la F1, éste porcentaje fue suficiente cantidad para los ensayos de laboratorio y de condiciones controladas de campo. De acuerdo al marco metodológico descrito se observaron respuestas de mortalidad deduciéndose los valores de CL50, CL95, TL50 y TL95. Al analizar el efecto de *B. sphaericus* sobre la mortalidad de larvas de *An. nuñeztovari* en condiciones de laboratorio se observó que con la concentración de 1ppm se alcanzó un 100% de mortalidad a las 72 horas de exposición, ubicándose la CL50 en

0,07 ppm y la CL95 en 0,69 ppm. Los tiempos letales se ubicaron en TL50 en 21,7 horas y TL95 a las 46,6 horas (Tabla I).

En cuanto a la valoración del pH del agua, el rango entre 7 y 9 (ambos inclusive), no afectó la actividad larvica del *Bacillus sphaericus*, alcanzando más del 95% de mortalidad en larvas de *An. nuñeztovari* (Tabla II).

Etapas en Condiciones Controladas de Campo

En condiciones controladas de campo se demostró la efectividad de *Bacillus sphaericus* al lograr el 100% de mortalidad a las 72 horas de ob-

TABLA I

DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD EN LARVAS DE *Anopheles nuñeztovari* EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Bacillus sphaericus* CEPA 2362

Concentración / ppm	No. de Larvas x Réplica	Réplicas				% Mortalidad
		I	II	III	IV	
0,01	25	3	3	1	4	11
0,05	25	10	9	8	10	37
0,10	25	15	14	13	14	56
0,25	25	20	22	19	18	79
0,5	25	24	23	25	25	97
1	25	25	25	25	25	100
Control	25	0	0	0	0	0

Tiempo de Observación 72 horas

Concentración Letal <i>B. sphaericus</i> 2362	Límites por Encima (95%)	Límites por Debajo (95%)
CL50 = 0,07082	0,08472	0,05845
CL95 = 0,69020	1,05220	0,50097
Chi ² = 6,226592.	Desviación Standard = 1,663851 ± 0,1324887.	M = 8,960985.

servación. En presencia de radiación solar (Tabla III), se pudo observar que a las 12 horas de exposición a la misma, la efectividad declinó en un 30%. La variable presencia de vegetación, obtuvo con vegetación escasa y mediana un 100% de mortalidad, declinando este valor con vegetación abundante y muy abundante en un promedio de 5% y 12% (Tabla IV).

Etapa en Condiciones de Campo

En los 2 criaderos tratados, uno permanente de 20 m² y otro temporal de 10 m², se encontraron las especies de mosquitos *An. nuñeztovari* en un 60%, *An. oswaldoy* 30% y *Culex erraticus* 10%, en estadios larvales del I al IV y en fase de pupa, la vegetación se encontraba en baja cantidad. Después del tratamiento con el biolarvicida se obtuvo un porcentaje de reducción larval de 100% en ambos criaderos a las 72 horas post-tratamiento, persistiendo el efecto en los 3 meses siguientes, declinando en menos de

un 15% al cuarto mes de observación (Tabla V).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos señalan que esta bacteria posee una alta efectividad, ocasionando el 100% de mortalidad en las poblaciones de larvas de *An. nuñeztovari*, tanto en condiciones de laboratorio como de campo, a las 72 horas a una concentración de 1 ppm (Tabla I), ubicándose las dosis letales CL50 y CL95 en 0,07 ppm y 0,69 ppm respectivamente, correspondiéndose con los resultados obtenidos por la WHO (44) quienes reportaron valores de CL50 en 0,06 ppm en *An. albimanus* y en *An. quadrimaculatus*. Mulla y col. (10) y Yousten y col. (39) obtuvieron valores de CL50 de 0,06 ppm en larvas de *Culex quinquefasciatus*, con el producto concentrado en polvo. Estos resultados evidencian que con dosis bajas se obtienen intervalos efectivos de mortalidad larval. Por otra parte los

TABLA II
EFECTO DEL pH DE LA SOLUCIÓN SOBRE LA EFICACIA DEL *Bacillus sphaericus* CEPA 23 62 EN LARVAS DE *Anopheles nuñeztovari*.

Concentración 1 ppm	Número de larvas por Réplica	% Mortalidad		
		pH = 7	pH = 8	pH = 9
E1	25	100	100	100
E2	25	100	100	96
E3	25	100	100	100
E4	25	100	100	100
Control	25	0	0	0

Tiempo de Observación 72 horas.

TABLA III

EFFECTO DE LA RADIACION SOLAR EN LA EFECTIVIDAD DEL *Bacillus sphaericus* CEPA 2362 SOBRE LARVAS DE *Anopheles nuñeztovari*

Réplicas	Tiempo (Horas de exposición a la radiación solar)				
	0 horas % mortalidad	4 horas % mortalidad	8 horas % mortalidad	12 horas % mortalidad	Control con sombra y con <i>B. sphaericus</i> % mortalidad
Hueco 1	100	100	100	70	100
Hueco 2	100	100	98	72	100
Hueco 3	100	100	100	68	100
Control con radiación solar sin <i>B. sphaericus</i>	0	0	0	0	0

Tiempo de observación 72 horas.

TABLA IV

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE VEGETACION EN LA EFECTIVIDAD DEL *Bacillus sphaericus* 2362 EN LARVAS DE *Anopheles nuñeztovari*

Réplicas	% Mortalidad				
	Sin Vegetación	Vegetación Muy abundante	Vegetación Abundante	Vegetación mediana	Vegetación escasa
Hueco 1	100	86	90	100	100
Hueco 2	100	85	91	100	100
Hueco 3	100	95	96	100	100
$\bar{X}$	100	88,6	92,3	100	100
Control sin tratamiento	0	0	0	0	0

Tiempo de observación: 72 horas.

X = Promedio.

tiempos letales obtenidos demuestran que su acción larvicida es realizada en corto tiempo.

En los diferentes intervalos de pH evaluados no se observaron dife-

rencias significativas en la mortalidad por efecto del mismo (Tabla II). Este hallazgo tiene gran importancia en el control de criaderos de este vector ya que los mismos poseen

TABLA V
EFFECTIVIDAD DEL *Bacillus sphaericus* cepa 2362 EN DOS CRIADEROS
NATURALES DE LARVAS DE *An. Nuñeztovari*.

N° Criadero Localidad	Tipo de criadero Área m ²	Especies de mosquitos/ Estadios existentes	% de reducción				
			72 h	1er. Mes	2do. Mes	3er. Mes	4to. Mes
1 El Taladro	Permanente 20m ² - Vegetación Escasa	<i>An. nuñeztovari</i> I, II, III, IV y pupa	100	100	100	98	86
2 Caño Frío	Temporal 10m ² Vegetación es- casa	<i>An. oswaldoi</i> I, II, III, IV y pupa <i>Culex erraticus</i> III, IV y pupa	100	100	100	100	90
3 Control Caño Frío	Temporal 3m ²	<i>An. nuñeztovari</i> I, II, III, IV <i>An. oswaldoi</i> III, IV y pupa	0	0	0	0	0

rangos de pH dentro de estos valores en la naturaleza. Yousten y col. (39) refieren que manteniendo el pH controlado cercano a la neutralidad, este bacilo esporula mejor y aumenta su toxicidad ya que el incremento de esta bacteria hace que el pH aumente de la neutralidad a pH 8,5 y 9, en fase estacionaria, por lo que siempre es importante realizar un estudio previo de las características físico-químicas del agua del criadero a tratar para evitar alteraciones de los resultados esperados. Morejón (12) encontró que en criaderos con pH 8,5, nitritos 1 ppm y amonio 5 ppm, la efectividad de la formulación no fue la esperada, al parecer la estabilidad de la toxina en los criaderos ensayados fue afectada por estas variables. En este sentido

es importante realizar este tipo de análisis físico químico en todo criadero previamente al tratamiento con cualquier producto biológico, para lograr la efectividad deseada.

En el ensayo bajo condiciones controladas de campo, se demuestra que bajo la radiación solar durante las primeras 8 horas de exposición, se produjo alta mortalidad a las 72 horas. A partir de 12 horas de exposición la actividad letal del *B. sphaericus* 2362 se redujo en un 30%. Al comparar estos resultados con el control bajo sombra con *B. sphaericus* 2362 se puede inferir, que en los criaderos protegidos de la radiación solar, la efectividad y persistencia del biopreparado será más efectiva que en los criaderos expuestos al sol, recomendándose en estos casos,

hacer las aplicaciones en horas nocturnas y ajustar las dosis para asegurar la permanencia de la bacteria y la ingestión de la misma por la larva del mosquito. Mulla (45) y Morejón (12) aplicando *B. sphaericus* 2362 en las mismas condiciones de exposición a la radiación solar, obtuvieron un resultado similar con dosis de 10 ml/m², permaneciendo hasta dos semanas la acción del producto.

Al analizar la variable presencia de vegetación en condiciones controladas de campo, se observó que la misma reduce la efectividad del producto en un 12% en promedio, en presencia de vegetación muy abundante. Morejón (12) y Montero y col. (11, 46), demostraron que la presencia de vegetación abundante no influyó en la efectividad del *B. sphaericus* 2362, alcanzando 100% de mortalidad en criaderos naturales de *An. albimanus* en Cuba.

En el ensayo bajo condiciones de campo, en un total de dos criaderos tratados con la formulación líquida de *B. sphaericus* 2362 con una titulación de 3×10^9 esporas/ml y con una dosis de 10 ml/m² se obtuvo un porcentaje de reducción del 100% a las 72 horas, en larvas de *An. nuñeztovari*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ramoska (47) y Mulla y col. (10, 45, 48) quienes encontraron en criaderos naturales, con la misma dosis de 10ml/m² un 100% de mortalidad en *An. albimanus* a las 72 horas de aplicación. Karch y col. (25) obtuvieron iguales resultados en el control de *An. gambiae*. More-

jón (12) obtuvo también con la misma dosis, en campos de arroz de Cuba, una alta efectividad con la aplicación de este bacilo en el control de *An. albimanus*. Estos resultados evidencian que el Género *Anopheles* en general es muy susceptible a la acción de este bacilo, observándose además que las larvas de primeros estadios fueron mas susceptibles que las de tercero y cuarto ya que estas desaparecieron primero en los criaderos naturales tratados con el biolarvicida.

El efecto residual del *B. sphaericus* 2362 fue comprobado en condiciones de campo, mediante muestreos efectuados durante cuatro meses consecutivos en los criaderos tratados, resultando negativos en cuanto a la presencia de larvas de mosquitos; los que resultaron positivos, se mantuvieron por debajo de los valores iniciales (Tabla V), correspondiéndose con los resultados obtenidos por Montero y col. (11) quienes demostraron la efectividad del *B. sphaericus* 2362 con dosis de 10 ml/m² en 157 criaderos de Cuba, alcanzando un 100% de mortalidad en *An. albimanus* y en *Culex quinquefasciatus* con una persistencia hasta de 5 meses en los criaderos tratados. Morejón (12) obtuvo una persistencia en el tiempo por espacio de 11 meses en los criaderos tratados, comprobándolo a través del aislamiento del bacilo a partir de muestras de detritus y cadáveres de larvas en un medio diferencial NYST. Esta residualidad permite que las aplicaciones del biolarvicida sea menos frecuente, lo

que aminora los costos en el control vectorial.

Por otra parte Karch y col. (25) comprobaron que esta bacteria es capaz de germinar en el intestino de larvas de algunos artrópodos, incluso en los cadáveres de larvas muertas, por lo que la persistencia y el reciclaje de esta bacteria esporógena se deba a este fenómeno (12, 45). El reciclaje puede ocurrir a través de la germinación y crecimiento de la bacteria en el intestino larval, seguido por la formación de nuevas esporas las cuales son liberadas cuando el cadáver de la larva se desintegra. Este reciclaje también puede verse influenciado por las actividades de otros insectos en el hábitat de los mosquitos (26).

El uso de *B. sphaericus* cepa 2362 posee un gran beneficio de acuerdo a los resultados obtenidos durante los ensayos, por su baja dosis de acción efectiva y su efecto residual que hace que las aplicaciones sean menos frecuentes, bajando así los costos en las actividades de control vectorial, así como también la inocuidad a la fauna y flora acompañante de los criaderos, respetando el ambiente y los ecosistemas, lo que hace vislumbrar un gran futuro en cuanto al empleo de este biolarvívica para el control de la malaria en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COLLINS F., PASKEWITZ S.: Malaria: Current and future prospect for control. *Ann Rev Entomol* 1995; 40:195-219.
2. TROPICAL DISEASES RESEARCH NEWS. Consultation in Geneva Tackles malaria diagnostics. *TDR/BVC*: Geneva 2000; 61:1-22.
3. GEORGHIU G., LAGUNES T.: The occurrence of resistance to pesticide in arthropod. 1991. *FAO Rome*, 318 p.
4. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. 1992. Serie de Informes Técnicos No 818, Geneva 784 p.
5. GABALDON A.: *Anopheles nuneztovari*: importante vector y agente de malaria refractaria en Venezuela. *Bol Dir Malariolol San Amb* 1981; 21(1):28-38.
6. DE BARJAC H.: Un nouveau candidat a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis var israelensis* *Entomophaga* 1978; 23(4): 309-319.
7. WEISER J.: A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult. *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. *Z bl Microbiol* 1984; 139:57-60.
8. LACEY L., LACEY C.: The medical importance of Riceland mosquitos and their control using alternative to chemical insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 1990; Sup: 1-93.
9. DUBITZKY A.M., MONTERO G., ESPINO R., GARCÍA I.: Efectividad de *Bacillus thuringiensis var israelensis* sobre larvas de mosquitos hematófagos en las condiciones de Cuba. *Rev Cub Hig Epid* 1982; 20(1):22.

10. MULLA M.S., DARWASEH H.A., DAVIDSON E.W., DULMAGE H.T., SINGER S.: Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strain mosquito larvae and their safety to non target organism. Mosq News 1984; 44:336-342.
11. MONTERO G., DIAZ M., MARRERA-CASTILLO A., CASTILLO F.: Resultados de las aplicaciones en pilotaje del biolarvicida *B. Sphaericus* 2362 en criaderos de mosquitos del municipio Sta. Cruz del Norte (Prov. La Habana). Rev Cub Med Trop 1991; 43(1):39-44.
12. MOREJON P.L.: Eficacia de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 y peces larvivoros para el control de larvas de mosquitos (*Díptera Culicidae*) (1992). Tesis de Maestría Inst. Pedro Kouri, La Habana, Cuba, 1992. P. 1-67.
13. RODRIGUEZ I B., TAIDE W.P., DIAS J.M.: Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998; 93(4): 441-444.
14. BARBAZAN P., BALDET T., DARRIET F., ESCAFFRE H., DJODA D.H., HOUGARD J.M.: Impact of treatments with *Bacillus sphaericus* on *Anopheles* populations and transmission of malaria in Maroua, a large city in a Savannah region of Cameroun. J Am Mosq Control Assoc 1998; 14(1):33-39
15. ZIMMERMAN R., BERTY J.: The importance of integrated of malaria vectors for the preservation of wetlands in Latin America. En: Global Wetlands: Old World and New. Edit. W. Mitsch. Ohio State University. Columbus, USA. Elsevier Science B.V. 1994.
16. DELGADO N.: Implicación ecofisiológica de la introducción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como controlador biológico de *Anopheles aquasalis* (*Diptera Culicidae*). Tesis doctoral Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela 1996. pp. 259.
17. SAUME F.Y., HERNÁNDEZ A.: Evaluación de la efectividad del Vectobac (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) en el control de *Anopheles emilianus* (*aquasalis*). Primer Simposio Latinoamericano sobre Biología y Control de enfermedades Tropicales (Resúmenes). 1990 México DF, México.
18. SAUME F.: Efectividad de Vectobac (Bti) sobre poblaciones naturales de larvas de *Aedes aegypti* (L). Informe Técnico. Unidad de Asesoramiento y Evaluación de Plaguicidas 1986. Fac. Agronomía. UCV. Maracay, Venezuela.
19. YOUSTEN A., DAVIDSON E.: Ultraestructural analysis of spores and paraesporal crystals formed by *Bacillus sphaericus* 2297. Appl Environ Microbiol 1982; 44:1449-1455.
20. PRIEST F. G.: Biological control of mosquitoes and other biting flies by *B. sphaericus* and *B.*

- thuringiensis*. J Appl Bacteriol 1992; 72:357-369.
21. BAUMANN P., BAUMANN L., BOWDITCH R.D., BROADWELL AH.: Cloning of the gene for larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362, evidence for family of related sequences . J Bacteriol 1987; 169:4061-4067.
 22. SGARELLA F., SZULMAYSTER J.: Purification and characterization of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 1593 M. Bioch Biophys Research Comm 1987; 143: 901-907.
 23. DE LA TORRE F., SEBO P., SCHULMAJSTER J.: On the respective roles of the two proteins recoded by the *Bacillus sphaericus* 1593 M. toxin genes expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Bioch Biophys Res Commns 1989; 164:1417-1422
 24. RAMOSKA W. A., HOPHINS T. L.: Effects of mosquito larvae feeding behaviour *Bacillus sphaericus* efficacy. J Invertebr Pathol 1984; 37:269-272.
 25. KARCH S., MONTENEY N., JULIEN J. L., SINEGRE G.: Control of *Culex pipiens* by *Bacillus sphaericus* and role of nontarget arthropods in it's recycling.. J Am Mosq Control Assoc 1990; 6:47-54.
 26. DES-ROCHERS B., GARCIA R.: Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. Mosq News 1984; 44:160-165.
 27. DAVIDSON E.W.: Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus*: Biological aspects which are important to field use. Mosq New 1984; 44:147-152.
 28. BERTY A.: El equilibrio de la naturaleza en la lucha antimalaria. Academia Nacional de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Mimeografiado 1977. Caracas, 40pp.
 29. MULLA M. S., FREDERICI A., DARWAZEH H. A., EDE L.: Field evaluation of the microbial insecticide *B. thuringiensis* serotype H-14 against floodwater mosquitoes. APP/Environ Microbiol 1982. pp. 1288-1293.
 30. RUBIO-PALIS Y., CURTIS C. F.: Evaluation of different methods catching anopheline mosquitoes in western Venezuela. J Amer Mosq Contr Assoc 1992; 8: 261-267.
 31. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Entomological field techniques for malaria control. 1992. Part. I 77 pp. Geneva.
 32. AVILA J., SEGNINI S., ROSSELL O.: Metodología para la cría de *Anopheles nuneztovari* Gabaldón 1940, (*Diptera: Culicidae*) Bol Entomol Venez 1993; 9(1):19-31.
 33. COVA-GARCÍA P., SUTIL Y.: Claves Gráficas para la clasificación de anofelinos de Venezuela. Pub. Div. Endem. Rurales. Malariología. MSAS. Maracay, Venezuela. 1977. p. 92.
 34. MONCADA-PEREZ, A.M.: Estudios de Cromosomas politécnicos de cuatro poblaciones de *Anopheles aquasalis* (*Diptera Culicidae*) en Venezuela. Tesis

- de Maestría, Fac. Agronomía UCV. Maracay. 1992. p. 49.
35. LECADETT M.M.: Titration of *Bacillus thuringiensis* susp *israelensis* and *Bacillus sphaericus* products unite Des Bacteries Entomopathogenes. Institut Pasteur, Paris France 1998, 2p.
 36. MULLIGAN F., SCHAEFER C., WILDER W.: Efficacy and persistence of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 against mosquitos under laboratory and field conditions. J Econ Entomol 1980; 73:648-688.
 37. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Data sheet on the biological control agent *Bacillus sphaericus* strain 1953. WHO/VBC/80. 1980. p 777.
 38. VAN ESSEN F., HAMBREE S.: Simulate field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes residual activity and effect of soil constituents. Mosq News 1982; 42: 66-72.
 39. YOSTEN A. A., MANDHEKAR N., WALLIS D.: Fermentation condition affecting growth, sporulation and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus*. Develop Indust Microbiol 1984; 25:727-762.
 40. ABBOTT W.S.: A method of computing the effectiveness of on insecticide. J Econ Entomol 1925; 18:265-267.
 41. RAYMOND M.: Presentation d'un programme basis d'analyse log probit pour microordinateur. Cah ORTON; Ser Ent Ned Parasitol 1985; 23:117-121.
 42. DUBITZKY A.M.: Métodos biológicos de lucha contra dípteros hematófagos en la UUSS Acad Cienc Kasajastan Alma Ata 1978, p. 5-65.
 43. MARGALEF R.: Ecología. Edic. Omega S.A. 1986. p 25.
 44. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. WHO/TDR/BVC/85.3. 1985. Geneva 24 pp.
 45. MULLA M.S.: Field evaluation and efficacy of bacterial agents and their formulation against mosquito larvae. In Integrated Mosquito Control Methodologies. (1985) Eds. Laird, M. and, J. W. Vol.2, pp. 227-250. London Academic Press
 46. MONTERO G., ESPINO R., GARCIA Y., DIAZ M.: Efectividad del *B. Thuringiensis* var *israelensis* H-14 en criaderos de *Anopheles albimanus* Wiedeman en condiciones naturales de Cuba. Rev Cub Hig Epid 1986; 24(2):165-171.
 47. RAMOSKA W. A.: Bioassay of three strains of *Bacillus sphaericus* on field collected mosquito larvae. J Invertbr Pathol 1977; 30:151-154.
 48. MULLA M. S., DARWASEH H. A., ALY C.: Laboratory and field studies on new formulations of two microbial control agents against mosquitoes. Bull Soc Vector Ecol 1986; 11:255-263.