

**DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLARVICIDA
DE *Romanómermis iyengarí* (Nematoda:
Afermithidae) EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**DEMONSTRATION OF THE BIOLARVICIDAE ACTIVITY OF
Romanomermis iyengari (Nematoda: Mermithidae) IN
LABORATORY CONDITIONS**

V. Soto Alvarez¹ y A. Santamarina Mijares²

1. MSc. en Parasitología. MSc. en Bacteriología-Micología. Profesora Asociada-Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas. Facultad de Medicina-Universidad de Los Andes (ULA). Mérida-Venezuela. Autora de correspondencia Telf. 074-403150. Telefax 074-403045 y 403568. E. Mail: SotoV@ing.ula.ve. Celular 014-742979.

2. PhD. Investigador Auxiliar. Departamento de Vectores. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). La Habana-Cuba.

RESUMEN

Se llevaron a cabo pruebas de laboratorio para demostrar la eficacia del mermítido *Romanomermis iyengari* como agente biorregulador de larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* vectores de filariasis y de malaria en el área del Caribe.

Se probaron dosis de preparasíticos a larvas hospederas de 3:1, 5:1 y 10:1, encontrándose que las 2 especies de mosquitos ensayadas se comportaron de manera similar presentando medias de infectación más elevadas a medida que se incrementaba la dosis. Fue demostrado la selectividad de *R. iyengari* por larvas de los estadios más jóvenes de ambas especies, las cuales mostraron altas tasas de infectación y los porcentajes más altos de parasitismo.

Los ensayos realizados para valorar la edad de los cultivos del mermítido con el objeto de determinar el tiempo óptimo de almacenamiento, demostraron que los preparasíticos provenientes de cultivos almacenados durante 6 semanas a

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

temperatura ambiente arrojaron los más altos índices de infectación en larvas de *C. quinquefasciatus* del insectario.

Estos resultados permitieron concluir que *R. iyengari* puede ser utilizado como agente potencial de control biológico, para poblaciones larvales de mosquitos especialmente de los estadios más jóvenes.

Palabras clave: *Romanomermis iyengari*, *Culex*, *Anopheles*, preparasíticos, juveniles infectivos, mermitidos, larvas y biolarvicida.

ABSTRACT

Laboratory test were realized to demonstrate the efficacy of *Romanomermis iyengari* mermitide as bioregulator agent of *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles albimanus* larvae, vectors of filariasis and malaria in the Caribbean area.

Preparasitic doses were proved to host larvae of 3:1, 5:1 and 10:1; it was found that the two mosquitoes species assayed behaved similarly presenting higher infectation media as the dose increased. It was shown that *Retnanomermis iyengari* selectivity for younger instars larvae, from both species, which showed high infectation rate and the highest percentages of parasitism.

The realized assays to valúe the mermitide cultures age to determine the storage optimal time, showed that the preparasitic proceeding from the stored cultures during 6 weeks environment temperature yielded the highest infectation Indices in *C. quinquefasciatus* larvae from the insect colony.

These results allowed to conclude that *R. iyengari* can be used like a potential agent of biological control for mosquitoes larvae populations specially of the younger instars.

Key words: *Romanomermis iyengari*, *Culex*, *Anopheles* Preparasitics, juvenile infectives, mermitide, larvae, biolarvicide.

Recibido: 22-05-96. Aceptado: 01-07-96.

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el control biológico ha sido uno de los aspectos priorizados por el comité de expertos de la OMS⁷ ya que los diversos agentes biológicos utilizados pueden ser producidos a un costo relativamente económico con materias primas locales.

Además su comprobada efectividad contra larvas de mosquitos, y su inocuidad al hombre y al ecosistema hace que sean agentes prometedores en la lucha antivectorial. Entre estos los nema-todos son considerados elementos importantes en la regulación de las poblaciones de insectos; se han hecho estudios en los cuales se demuestra que existen 19 familias de nemátodos que atacan insectos, matando, esterilizando o alterando el desarrollo del hospedero, entre las cuales se encuentran la familia Mermithidae¹⁸. Esta familia agrupa una amplia variedad de especies de nemátodos que son parásitos obligados, los cuales deben cumplir parte de su ciclo vital en el interior de un insecto. Muchos de los miembros pertenecientes a esta familia son capaces de reciclar en el medio ambiente mejor que muchos organismos patógenos y se pueden considerar como agentes potenciales de control biológico porque presentan: especificidad para larvas de mosquitos, el parasitismo que provocan es siempre letal para el hospedero, son completamente inocuos para la fauna acompañante y poseen capacidad de permanencia después de su introducción¹².

Romanomermis iyegari es un nemátodo endoparásito obligado, cuya larva parásita o estado infectivo, completa su desarrollo en el hemocele de una larva de mosquito, que al emerger provoca la muerte del hospedero³.

En condiciones de laboratorio se han demostrado elevados promedios de parasitismo en larvas de diferentes especies de mosquitos; un 98% de *Aedes aegypti*, 92% de *Culex quinquefasciatus* y un 77% de varias especies de anofelinos fueron infectados por nemátodos⁴ y más recientemente Pridanseva et al¹⁹ lograron infectar con larvas de *Romanomermis iyengari* el 100% de larvas de los géneros *Anopheles* y *Culex*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de obtener suficiente material biológico para la realización de los experimentos se logró la multiplicación de 15 cultivos de *R. iyengari* en larvas de

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

I y II estadio de *C. quinquefasciatus* provenientes de insectario y expuestas a preparasíticos del mermítido en dosis de 5:1.

Para valorar la acción infectiva de *R. iyengari* para larvas de los 4 estadios de *C. quinquefasciatus* de insectarios y *Anopheles albimanus* colectadas en reservorios típicos, se expusieron 400 larvas, 100 por cada estadio, a los juveniles infectivos del parásito en dosis variables de 3:1 5:1,10:1.

Para determinar el nivel de selectividad del parásito con relación a los distintos instars de desarrollo de las 2 especies de insectos probadas, se tomaron 400 larvas de *A. albimanus* y 400 de *C. quinquefasciatus*, 100 por cada estadio y dicho grupo se expuso conjuntamente a los preparasíticos de *R. iyengari* en dosis 5:1.

Otras pruebas de laboratorio se llevaron a cabo con el objeto de valorar el tiempo óptimo de almacenamiento de los cultivos del nemátodo, para su posterior aplicación, por lo cual se tomaron 5 lotes de 200 larvas de *C. quinquefasciatus* de II estadio y se expusieron a los preparasíticos infectivos en dosis de 5:1, por lotes de cultivos que se habían mantenidos almacenados a temperatura ambiente por un tiempo variable de 3, 6, 9,13 y 16 semanas.

Para cada uno de los experimentos se realizaron 3 pruebas con réplicas y un control para comparar los resultados obtenidos. Las medias de infectación y los porcentajes de mortalidad se calcularon tomando muestras aleatorias de 70 larvas las cuales fueron disecadas con agujas entomológicas a través de un microscopio estereoscópico según el método de Levy y Miller⁶.

Todos los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente comprobándose previamente si los mismos presentaban homogeneidad de varianza y distribución normal. Algunos datos fueron transformados mediante $\log(x + 1)$. Para los efectos estadios larvales y dosis de aplicación sobre el valor medio de infectación se aplicó un ANOVA bifactorial y una prueba Duncan.

RESULTADOS

La multiplicación de los 15 cultivos del mermítido arrojaron un total de 100g de nemátodos post-parasíticos para un total de 120 cultivos, lo cual permitió realizar los experimentos.

En condiciones de laboratorio se evaluó la patogenicidad del parásito para las 2

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

especies de mosquitos probadas, resultando que para *C. quinquefasciatus* los índices de infectación más elevados correspondieron a la dosis de 10:1 con 100% de parasitismo y promedio de infectación de 5 para larvas de I estadio y otra media de 5,2 y 100% de mortalidad para larvas de II estadio. Se evidenció un incremento en los índices de infectación con el aumento de la dosis desde 3:1 hasta 10:1 (Fig. 1). El análisis de varianza bifactorial determinó que tanto el efecto de la dosis como el efecto del estadio larval influyeron significativamente en los niveles de infectación de larvas de *C. quinquefasciatus*, con $F=829,5$ para $P<0,01$ para el efecto de la dosis y $F=235,3$ para $p<0,01$ para el efecto estadio larval mientras que la interacción dosis por estadio no fue estadísticamente significativa (Fig. 1).

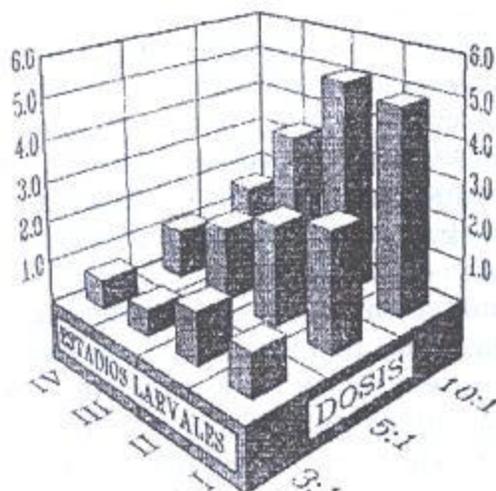


Fig. 1. Promedios de infectación en *C. quinquefasciatus* por *R. iyengari* en el laboratorio

Con relación a las pruebas desarrolladas con larvas de *A. albimanus* los resultados mostraron un comportamiento similar a la especie *C. albimanus* los resultados mostraron un comportamiento similar a la especie *C. quinquefasciatus*. Los niveles de infectación más elevados correspondieron a la dosis 10:1, con un valor medio de infectación de 7,1 con 100% de parasitismo en larvas de I estadio y 7.2 y 100% de mortalidad para larvas de II estadio. Se observó un incremento de la tasa de infectación con el aumento de la relación de infectación desde 3:1 hasta 10:1. (Fig. 2).

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

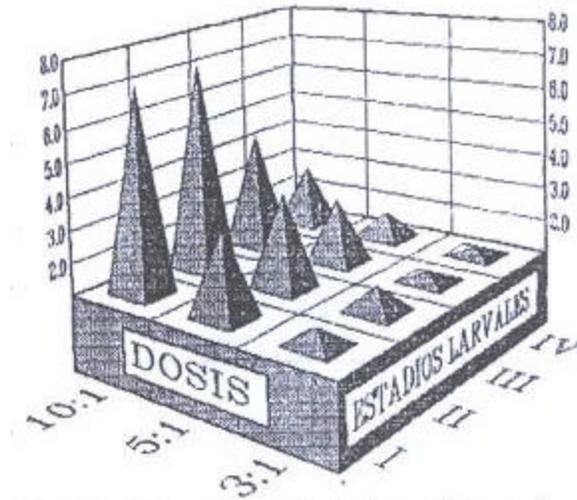


Fig. 2. Promedios de infección en *A. albimanus* por *R. iyengari* en el laboratorio

Los resultados analizados mediante un ANOVA bifactorial indicaron que tanto el efecto de la dosis de aplicación como el efecto de estadio de desarrollo, influyeron significativamente en los niveles de infección, con valor de $F=144,3$ para $p<0,001$ para el efecto de la dosis y $F=45,2$ para $p<0,001$ para el efecto estadio larval. No fue estadísticamente significativa la interacción dosis por estadio.

Para las dos especies de larvas hospederas la prueba Duncan demostró que la media de infección de las 3 dosis difieren significativamente a $p<0,05$, al igual que los promedios de infección de los cuatro instars larvales, para cada una de las dosis empleadas.

R. iyengari demostró selectividad por los estadios más jóvenes de las 2 especies de mosquito ensayadas *C. quinquefasciatus* y *A. albimanus*, ya que ellas presentaron altas tasas de infección y los porcentajes más altos de parasitismo. (Cuadros 1 y 2).

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

Cuadro 1
Selectividad de *R. iyengari* por los distintos estadios larvales de *C. quinquefasciatus*

Estadios	xInfectación	% Mortalidad
I	2,1	93
II	2,5	95
III	1,2	39
IV	0,9	16

Cuadro 2
Selectividad de *R. iyengari* por los distintos estadios larvales de *A. albimanus*

Estadios	xInfectación	%Mortalidad
I	2,7	95
II	2,9	98
III	1,9	56
IV	1,2	42

Los ensayos realizados para valorar la edad de los cultivos con el objeto de determinar el tiempo óptimo de almacenaje para una mejor explotación de los mismos, mostraron diferencias marcadas entre el promedio de infectación 4,4 de larvas infectadas con preparásitos provenientes de cultivos almacenados durante 6 semanas con relación a los restantes promedios de infectación con valores de 2,1; 3,1; 2,8; y 1,7; obtenidos en larvas infectadas con preparásitos de cultivo de 3, 9, 13 y 16 semanas de almacenamiento. (Fig. 3). Los valores medios de infectación encontrados

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

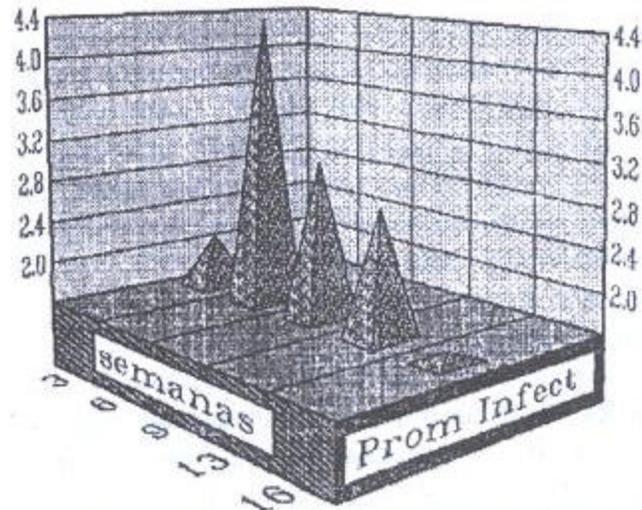


Fig. 3. Infectación en *C. quinquefasciatus* con cultivos de *R. iyengari* a diferente tiempo de almacenamiento

para cada lote de cultivos con diferentes edades, se compararon mediante un ANOVA simple, demostrando diferencias significativas $F=564,2$ para $p<0,001$ y mediante la prueba Duncan se encontró que todos los valores medios de infectación difieren entre si, excepto los valores 3,1 y 2,8, correspondientes a los cultivos con 9 y 13 semanas de almacenamiento.

DISCUSIÓN

Culex quinquefasciatus resultó ser un buen hospedero experimental, pues permitió obtener suficiente material biológico para evaluar las potencialidades patogénicas del nemátodo mermitido *R. iyengari* para larvas de culícidos de importancia médica, no obstante haberse reportado que los géneros *Aedes* y *Anopheles* manifestaron una elevada susceptibilidad al parasitismo¹.

El aumento en los índices de infectación en larvas de las dos especies con el incremento de las dosis de aplicación, e incluso por cada estadio y que los niveles de infectación más elevados ocurrieron con la dosis de 10:1, es similar a los encontrados por Petersen y Willis⁸ y Petersen¹⁰, quienes demostraron un incremento en los índices de parasitismo con el incremento de la relación de preparásitos infectivos a larvas hospederas. Estos mismos autores encontraron

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

diferentes grados de susceptibilidad de los distintos instars de desarrollo de las larvas expuestas a la acción del patógeno, lo cual concuerda con los resultados por nosotros obtenidos.[8,11](#)

Se demostró una mayor susceptibilidad al parasitismo de larvas de I y II estadio esto no ocurrió en larvas de III y IV instars las cuales presentaron un parasitismo más limitado. Esto indica claramente que bajo condiciones de laboratorio la susceptibilidad al parasitismo por estadio, está influenciada por el grado de desarrollo de cada uno, debido a que los estadios más jóvenes presentan un menor desarrollo orgánico y por lo tanto una limitada formación de quitina en la pared cuticular y un reducido engrosamiento de las mismas, lo que la hace menos rígida, permitiendo que el estilete de los juveniles infectivos puedan perforar dicha pared cuticular con mayor facilidad.[2,5,11](#)

El fenómeno de superparasitismo se demostró en estadios más tempranos, semejante a lo encontrado por Petersen^{9,14}. El 50% de mortalidad en las larvas hospederas de I y II estadio en las primeras 24 horas de infección con la dosis 10:1, se debió a la invasión múltiple de los preparasíticos al hemocele de dichas larvas, las cuales se alimentan de los nutrientes de la hemolinfa, provocando un agudo debilitamiento, lo cual conduce a la muerte de la larva. Esto mismo ha sido demostrado por Platzer^{15,17} quien concluyó que la severidad de los daños observados en la larva hospedera depende de la intensidad del parasitismo.

Los más altos niveles de infección provocados por los cultivos con 6 semanas de almacenamiento, está en concordancia con lo reportado por Santamarina y Broche²⁰ quienes encontraron un índice óptimo de parasitismo con cultivos almacenados por 6 semanas y un decremento del parasitismo por preparasíticos provenientes de cultivos con 3,9,13 y 16 semanas de almacenamiento, igual a lo demostrado por nosotros, ambos resultados difieren de lo reportado por Petersen y Levy¹³; quienes señalaban que una vez concluido el proceso de siembra de *R. iyengari* los cultivos pueden ser almacenados por períodos hasta de 15 semanas.

La disminución de la mortalidad de larvas hospederas por el parasitismo de los mermítidos de cultivos almacenados por mayor tiempo puede deberse al envejecimiento de dichos cultivos, lo cual produce la muerte de los preparasíticos. Se conoce que los huevos contenidos en los cultivos, puestos por las hembras de forma sincrónica completan su desarrollo embrionario en 18

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

días²¹ y al contacto con la humedad del sustrato de los cultivos, eclosionan emergiendo las formas juveniles que se mantienen activas durante 72 horas, consumiendo la energía acumulada en la etapa de huevo. Probablemente la disminución en los niveles de infección esta relacionada con la pérdida de la energía de los preparásitos debido a su actividad en búsqueda de larvas hospederas, para iniciar su etapa parásita y completar su ciclo de vida. Es por ello que la explotación óptima de los cultivos debe realizarse a las 6 semanas para obtener alto rendimiento en preparásitos activos.

CONCLUSIONES

Dada la alta patogenicidad de *R. iyengari* demostrada para las dos especies de mosquitos ensayadas y su mayor selectividad de acción por los estadios larvales I y II, sugerimos sea recomendado como agente potencial biorregulador de poblaciones larvales de mosquitos en estadios más jóvenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BHEEMAN Rao, US; GAJANANA, A, and RAJAGOPALAN PK.: A note on the tolerance of the mermithid nematode *Romanomermis culicivorax* to different pH and salinity. Indian J. Med. Res. 1979; 69:423-427.
2. FINNEY, JR.: Potential of nematodes for pest control In: Microbiol control of peat and plant diseases 1970-1980. H.D. Burges ed. Academic Press New York 1981; Vol.3.
3. GAJANANA, A; KAZMI, SJ; BHEEMA Rao, US; SUGUNA, SC and AHAS, R.K.: Studies on nematode parasite (*Romanomermis sp: Mermithidae*) of mosquitoes larvae isolated in Pondicherry. Indian J. Med. Rea. 1978; 68:242-247.
4. ICMR: Vector Control Research Centre Annual Report. 1978 p. 64.
5. KURIHARA, T. and HATA, K.: Two factore affecting parasitiam by *Romanomermis culicivorax* in mosquitoes larvae Jap. J. Sanit. Zool 1979; 30:200-202.
6. LEVY, R. and MILLER, TW.: Susceptibility of the mosquitoes nematode *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae) to pesticides and growth regulators, Environ Entornol. 1977; 64:447-448.
7. OMS-TDR,; Décimo informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

los Vectores y lucha antivectorial. Serie de informes técnicos, 1987; 774:127-133.

8. PETERSEN, J. and WILLIS, O.: Some factors effecting parasitism by mermithidae nematodes in southern house mosquito larvae. J. Econ. Entomol. 1970; 63:175-178.

9. PETERSEN, J.; HOY, JB and OBERG, AG. Preliminary field test with *Ressimermis nielseni* (Mermithidae: Nematoda) against mosquito larvae in California rice fields. Calif. Vector views. 1972; 19:47-50 (Mimeographed document WHO/VBC/72.357) Geneva, 4 pages.

10. PETERSEN, J. Observations of the mass production of *Romanomermis culicivorax* a nematode parasite of mosquitoes. Mosq. News 1978; 38:83-86.

11. PETERSEN, J. and CHAPMAN, H.C. Checklist of mosquito species tested against the nematode parasite *Romanomermis culicivorax*. J. Med. Entomol. 1979; 15:468-471.

12. PETERSEN, J. and CUPELLO, JM. Comercial development and future prospecte for entomogenous nematodes. J. Nematol. 1981; 13:1.

13. PETERSEN, J. and LEVY, R. Effects of culture age the shipment survival of mosquitoes parasite *Romanomermis culicivorax*, J. Nematol 1981; 13:229-231.

14. PETERSEN, J. Role of mermithid-nematodes in biological control of mosquitoes. Exp. Parasitol. 1983; 33:239-247.

15. PLATZER, E. Biological Control of mosquitoes whit mermithids. J. Nematol, 1981 a; 13:257-262.

16. PLATZER, E. Mermithid nematodes as mosquitos control agents. U. of California. Mosq. Control Research, Anual report 1981b; 91-94.

17. PLATZER, E. Biology of mermithis and steinernematids with vector control potential. Procc. Hlrd Internat. Colloquium on Invert. Phatol. Brighton, SussexUK. 1982; 6-10;374-379.

18. POINAR, GO. On the question of human infection by nematodes of the family Mermithidae (DorylaimidaAdenophora) WHO mineographed document. WHO/VBC/75 564-WHO/HELM/75.2, 1975; Geneva 8.

19. PRIDANTSEVA, EA; LEBEDEVA, NI; SHCHERBAN, ZP and KADY-ROVA, MK. An evaluation of the possibüty of using *Romanomermis iyengari* Welch mermithids for mosquito control in Uzbekistán Med. Parazitol (Mosk) 1990; 1:15-17.

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIO

20. SANTAMARINA, MA, and BROCHE GR. Estudio de la edad de los cultivos de *Romanomermis culicivorax* (Roas y Smith, 1976) (Rhabditida: Mermithidae) en la infección de larvas de mosquitos de la especie *Culex quinquefasciatus* Say 1823 en condiciones de laboratorio Rev. Cub. Med. Trop. 1988; 40:75-79.

21. THOMAS, OP; PLATZER, E. and HYMAN BC. Large mitochondrial genome and mitochondrial DNA size polymorphism in the mosquito parasite *Romanomermis culicivorax*. Curr. Genet 1986; 11:71-77.