

Eficacia del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* (Theobald, 1901) y *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) en bioensayos de laboratorio

Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 in the control larvae of *Anopheles pseudopunctipennis* (Theobald, 1901) and *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) in laboratory bioassays

Diana Nongrados¹, Julia Castro¹, Carlos Mariños¹, Alberto Laguna² y Roxana Ríos²

RESUMEN

Se probó la actividad del *Bacillus sphaericus* 2362 en formulación líquida contra larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* (Theobald, 1901) y *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) en bioensayos de laboratorio. Se utilizó agua destilada y agua de criadero, con concentraciones de 1×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,9 \times 10^{11}$ esporas/mL. La población blanco se mantuvo en condiciones de laboratorio, usándose agua y flora nativa de criadero. Se vertieron dosis de 1 mL en vasos de prueba que contenían 25 larvas del II y III estadio y 150 mL de agua de criadero o agua destilada respectivamente; se usaron vasos con igual cantidad de agua y larvas como controles para cada concentración, tipo de agua y especie de larva probada. Las pruebas fueron realizadas tres veces para cada concentración, en condiciones de laboratorio. Se realizaron 12 réplicas divididas en 6 para cada especie, usándose un total de 4,800 larvas por especie. Las lecturas de la mortalidad de larvas fueron a las 12, 24, 48 y 72 h después de añadido *Bacillus sphaericus*. Se observó la elevada susceptibilidad de *Culex quinquefasciatus* a *Bacillus sphaericus* 2362, con una mortalidad mayor al 90% cuando se compararon los grupos tratados y controles (valor de $p = 0,031$ y $0,012$ para cada tipo de agua respectivamente) a las 48 h y con una concentración de $1,5 \times 10^{11}$ esporas/mL.

Se demostró ampliamente que *Anopheles pseudopunctipennis* no es susceptible a *Bacillus sphaericus* 2362 en bioensayos de laboratorio y no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con diferentes tipos de agua (valor de $p > 0,05$).

Palabras clave: *Bacillus sphaericus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Culex quinquefasciatus*, control biológico, larvicida.

ABSTRACT

Bacillus sphaericus 2362 liquid formulation, activity against *Anopheles pseudopunctipennis* and *Culex quinquefasciatus* larvae was tested in laboratory bioassays. Breeding place water and distilled water were used with concentrations of 1×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,9 \times 10^{11}$ spores/mL. Target population was kept in laboratory conditions by using breeding native water and flora. One mL doses were added into test cups containing 25 II and III stage larvae and 150 mL of breeding water or distilled water respectively; cups tests with the same amount of water and larvae were used as controls for each concentration, water type and larval specie tested. Testing was made three times for each concentration in laboratory conditions. Twelve replicas were made and divided in six for each species, using a total of 4800 larvae for species. Reading of larvae mortality were at 12, 24, 48, and 72 hours after addition of *Bacillus sphaericus*. It was observed the high susceptibility of *Culex quinquefasciatus* to *Bacillus sphaericus* 2362, with an overall mortality $> 90\%$ as compared with treated and controls (p -value = $0,031$ and $0,012$ for each type of water respectively) at 48 hours and with a concentration of $1,5 \times 10^{11}$ spores/mL.

1 Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Epidemiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela s/n, Lima, Perú. E-mail: dnongrados@hotmail.com, d19007@unmsm.edu.pe
2 Oficina General de Epidemiología, MINSA. Grupo ASIS.

It was widely demonstrated that *Anopheles pseudopunctipennis* is not susceptible to *Bacillus sphaericus* 2362 in laboratory bioassays and no significant differences were found in treatments with different types of water (p-value > 0,05).

Key words: *Bacillus sphaericus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Culex quinquefasciatus*, biological control, larvicide.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, la malaria producida por *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* se ha convertido en un serio problema de salud a nivel nacional. Desde su reintroducción, en 1992 a través de la frontera norte y de otras áreas de riesgo como lo son las zonas fronterizas del Perú con Colombia y Brasil y la dispersión del *Anopheles darlingi* en la Amazonía, la malaria por *P. falciparum* se ha desplazado al Norte y Oriente del país, estableciendo un patrón ascendente en los departamentos de Loreto, Piura, Tumbes, Lambayeque, Cajamarca, San Martín, Amazonas y La Libertad (OGE MINSA, 1998).

Investigaciones sobre el control de los mosquitos hematófagos han tenido gran influencia en el campo de la salud pública, por el importante papel que cumplen en la transmisión de enfermedades al hombre. En el Perú, se conocen alrededor de 150 especies de mosquitos, de las cuales 43 son del género *Anopheles*. (Calderón *et al.*, 1995). Entre ellos se encuentran los vectores de malaria, y el resto corresponde al grupo de los Culicíneos que incluyen los géneros *Culex*, *Aedes*, *Sabethes*, vectores de encefalitis equina, dengue y fiebre amarilla silvestre, respectivamente. Han sido incriminados como vectores principales de malaria en el Perú, *Anopheles darlingi*, *An. benarrochi*, *An. albimanus* y *An. pseudo-punctipennis*, éste último de amplia distribución en el país; es altamente doméstico y de marcada preferencia antropofílica. Es considerado el principal vector de malaria en la costa y sierra del Perú (Calderón *et al.*, 1995).

Asimismo, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles pseudopunctipennis* son considerados vectores implicados en las epidemias de Encefalitis Equina Venezolana ocurridas en el Perú (Ministerio de Salud, 1989) en los diferentes nichos ecológicos que presentan las zonas donde ocurrieron las epizootias en nuestro país.

El incremento de enfermedades transmitidas por vectores en los últimos diez años ha creado la necesidad de buscar métodos alternativos para el control vectorial. Los insecticidas de acción residual revolucionaron las estrategias de lucha antivectorial; sin embargo en años recientes su uso indiscriminado ha permitido la aparición y propagación de resistencia a los insecticidas y el surgimiento de formas de comportamiento evasivo en vectores de enfermedades, la contaminación ambiental y el uso creciente de nuevos tipos de insecticidas químicos y con elevados costos ponen de manifiesto que la lucha antivectorial ya no puede basarse exclusivamente de los productos químicos (OMS, 1976). Frente a estos problemas se plantea el método de Control Biológico en la lucha antivectorial como una buena alternativa de control, que consiste fundamentalmente en la manipulación del sistema de regulación natural, en beneficio del hombre (OMS, 1982).

De los métodos de control biológico, el microbiológico ha merecido el mayor apoyo y atención en todo el mundo (OMS, 1982). Las bacterias esporógenas han demostrado ser más específicas en su toxicidad contra organismos blancos que otros insecticidas. Son

biodegradables, inocuas para el hombre, animales y plantas, además de que su autodispersión asegura su eficacia en sitios inaccesibles y tienen un alto efecto residual que las convierte en biolarvicidas muy económicos al no ser necesaria su aplicación frecuente (Montero *et al.*, 1991).

Montero *et al.* (1991) en criaderos temporales y permanentes en la Habana, Cuba, comprobaron la efectividad de *Bacillus sphaericus* 2362, en formulación líquida, con dosis de 10 ml/m², sobre mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* y *Aedes taeniorhynchus*, obteniendo 100% de mortalidad entre las 24 y 72 h postaplicación. Arredondo *et al.* (1990) probaron 2 formulaciones de *Bacillus sphaericus* 2362: una granular y una líquida, sobre larvas de *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus* y *Culex coronator*, en parcelas de campo en Tapachula y Chiapas al sur de México; obtuvieron para larvas de *Culex* una efectividad mayor al 87% utilizando 0,125 ml/m² de formulación líquida y 67% de efectividad con 0,5 g/m² de formulación granular, después de 12 semanas de tratamiento y una reducción larvaria de 68% con 2 g/m² de formulación granular y 57% con 2 ml/m² para larvas de *Anopheles* después de 18 semanas de tratamiento.

Castro *et al.* (1996) realizaron aplicaciones con *Bacillus sphaericus* 2362 en criaderos naturales ubicados en 5 subregiones de Salud obtuvieron una eficiencia de mortalidad larvaria de 96,6% (La Libertad), 96,9% (Piura), 89,2% (Sullana) y 84,6% (San Martín) de poblaciones de mosquitos de la Familia Culicidae a las 48 h postaplicación con una dosis de 10 ml/m², mientras que Tumbes mostró valores negativos.

Lacey *et al.* (1986a) evaluaron en cultivos de arroz en Arkansas, concentraciones de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de mosquitos, demostrando que con dosis de 0,58 y

1,17 L/ha se obtuvo una reducción de *Anopheles quadrimaculatus* de 71 y 82% respectivamente a las 48 h de aplicado. Una semana después de la aplicación, también observaron reducción de la población larvaria.

El objetivo fundamental del presente trabajo fue determinar la susceptibilidad del *Bacillus sphaericus* 2362 formulación líquida frente a larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* y *Culex quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio, a través de la reducción larvaria, y determinar si las características fisicoquímicas y bacteriológicas del agua influyen en la acción tóxica del bacilo, investigación que aportará al conocimiento de la eficacia del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de vectores transmisores de enfermedades metaxénicas en nuestro país.

MATERIAL Y MÉTODOS

A Identificación de criaderos y mantenimiento de larvas en el insectario

Los criaderos se caracterizaron según su permanencia, presencia o no de vegetación y grado de contaminación de las aguas; se identificaron tres criaderos en el área urbana y rural, cercana a la ciudad de Lima, un criadero permanente (Laguna de 500 m² de área) con larvas de *Anopheles pseudopunctipennis*, ubicado en el Asentamiento Humano "Nueva Jerusalén" km 20 de la Panamericana Norte, distrito de Carabaylo, cuyas aguas son filtraciones del río Chillón, y 2 criaderos temporales (tanques de cemento para almacenar agua, con un área de 5 m²) ubicados en el Fundo Pando, 10 km de la ciudad de Lima, distrito de San Miguel y en el Asentamiento Humano "Pachacutec" 50 km de Lima, distrito de Ventanilla con larvas de *Culex quinquefasciatus*. (Fig. 2).

Las colectas larvarias se realizaron durante los meses, entre julio y diciembre de 1997 y para el análisis de los parámetros físico-

químicos y bacteriológicos del agua de los criaderos se tomaron muestras de agua en frascos estériles de 1 litro de capacidad que fueron analizadas por el laboratorio de Control Ambiental de la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) del Ministerio de Salud.

La población blanco fue colectada con bandejas de plástico y separada con cucharones esmaltados de 350 ml. Se colectaron todos los estadios larvarios, siendo transportadas al Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Epidemiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las muestras colectadas fueron separadas por estadios larvarios I y II y colocadas en bandejas de plástico blanco (26 cm de largo x 16 cm de ancho y 5 cm de altura) tratando de mantenerlas en condiciones naturales y a temperatura ambiente (27 °C) y humedad relativa de 97%, alimentadas cada 24 horas con 1,5 gramos de alimento para pollos (Purina) pulverizado, durante 7 días previos a los bioensayos para la adaptación a las condiciones de laboratorio.

B Caracterización del biolarvicida, preparación y cuantificación del inóculo

El biolarvicida utilizado fue *Bacillus sphaericus*, cepa 2362 en formulación líquida de color gris con nombre comercial GRISELEF, proporcionado por LABIOFAM (Cuba), que contiene esporas y cristales tóxicos, con un título 3×10^9 esporas/mL, con CL_{50} 0,090691 mg de esporas/L; un CL_{90} 0,15058 mg de esporas/L, de aspecto concentrado por fermentación.

Para el aislamiento de las colonias se utilizó como medio de cultivo Agar NYSM (medio caldo nutriente, extracto de levadura y sales) (Yousten y Davidson, 1982) e incubando a 37°C durante 24 h. Las colonias aisladas fueron marcadas y sometidas a su identificación morfológica a través de la coloración GRAM

y bioquímica diferencial (acidez, gas, acetoina, reducción de nitratos, indol, caldo V-P, hidrólisis de almidón, catalasa, caseína y tirosina). Para el análisis cuantitativo del inóculo, se utilizó el método del recuento estándar en placas, con diluciones seriadas hasta obtener la cuantificación de 1 inóculo por cada dosis de biolarvicida; se realizó diluciones hasta 10^{-11} de cada una. El recuento de colonias se hizo por el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), registrándose como cuenta estándar en placa por mililitro. Se utilizaron 4 diferentes concentraciones de biolarvicida como inóculos en los bioensayos de laboratorio 1×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,9 \times 10^{11}$ esporas/mL que corresponden a las dosis 50 ml/L, 100 ml/L, 150 ml/L y 200 ml/L respectivamente. Cada inóculo de aplicación fue preparado colocando en tubos de prueba volúmenes de 9,5, 9, 8,5 y 8 mL de agua destilada estéril; se agregó 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL y 2 mL de biolarvicida puro respectivamente, y se obtuvo un volumen final de 10 ml en todos los tubos con inóculo.

C Bioensayos de Laboratorio

Para el estudio experimental se utilizaron larvas del segundo y tercer estadio de *Anopheles pseudopunctipennis* y *Culex quinquefasciatus*. En condiciones de laboratorio se hicieron 12 réplicas divididas en 6 por especie. Para los bioensayos se dispusieron de 32 vasos de prueba (7,5 cm de alto y 8,5 de diámetro con capacidad de 250 ml) para cada especie larvaria y se utilizaron dos tipos de agua: destilada y de criadero. En 16 vasos se colocaron 150 ml de agua destilada y en otros 16 vasos 150 ml de agua de criadero, luego se añadieron 25 larvas en cada vaso. Las pruebas se hicieron por triplicado para cada concentración de biolarvicida probada, utilizándose también un vaso control con la misma densidad larvaria por concentración y por tipo de agua para cada especie larvaria, con un total de 800 larvas por prueba. El procedimiento experimental siguió los lineamientos recomendados por la OMS (WHO, 1985).

Se tomó la temperatura media del agua destilada y del criadero, así como el pH de las mismas, antes de aplicarse cada una de las concentraciones de biolarvicida; luego se vertió 1 mL de cada concentración sobre la superficie del agua en cada uno de los recipientes, a los controles sólo se les colocó agua destilada y/o agua de criadero y 25 larvas. Los recuentos de la mortalidad larvaria se realizaron a las 12, 24, 36, 48 y 72 h postaplicación. Fueron consideradas larvas muertas aquellas que no reaccionaron cuando se les tocó en la región cefálica; larvas moribundas las que se mantenían por debajo de la superficie del agua o las que no tuvieron la reacción característica de sumergirse.

D Análisis de la entomotoxicidad

El porcentaje de mortalidad larvaria por dosis se evidenció con el número total de larvas muertas y moribundas. Cuando la mortalidad larvaria en los vasos control estuvo comprendida entre el 5-10% se corrigieron los

porcentajes de mortalidad mediante la fórmula de Abbott (WHO, 1985). La toxicidad se reportó como Concentración Letal Media CL_{50} y CL_{90} según programa de análisis Probit 1.4. Para medir la eficacia del *Bacillus sphaericus* 2362, se utilizó la prueba paramétrica de análisis de varianza ANOVA y para comprobar la significancia entre tratamientos y medir si la calidad del agua intervino en los resultados obtenidos, se utilizó el método de análisis multivariado (MANOVA) del paquete estadístico SPSS-WIN 7.5.

RESULTADOS

Los resultados de los análisis físico-químicos y microbiológicos de las aguas de los criaderos de *Culex* y *Anopheles* reportan aguas claras con bajos niveles de polución y se expresan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas y bacteriológicas del agua de los criaderos

| Indicadores | Criadero de <i>An. pseudopunctipennis</i> | Criadero de <i>Cx. quinquefasciatus</i> |
|---------------------------|---|---|
| pH | 6,9 | 7,8 |
| Temperatura °C | 20°C | 21°C |
| Turbiedad | 1,79 UNT | 5,6 UNT |
| Color | 18 Unidad Color | 29,1 Unidad Color |
| Cloruros | 12 mg/L Cl ⁻¹ | 8 mg/L Cl ⁻¹ |
| Sólidos totales disueltos | 316 mg/L | 560 mg/L |
| Nitritos | 0,03 ppm | 0,15 ppm |
| OD ppm | 1,8 ppm | 0,2 ppm |
| Conductividad | 407 umhos/cm | 337 umhos/cm |
| NMP coliformes totales | 6,3 x 10 ⁵ UFC/ml | 4,5 x 10 ⁴ UFC/ml |
| NMP coliformes fecales | 1,2 x 10 ³ UFC/ml | 3,2 x 10 ² UFC/ml |

El cultivo de *Bacillus sphaericus* 2362 en Agar NYSM evidenció colonias cremosas, opacas, de borde irregular, con crecimiento ramificado y abundante. Se observaron bacterias bacilares, y se presentaron esporas esféricas que se sitúan en la parte terminal del esporangio, Gram (+) y pruebas diferenciales [Acidez (-), Gas (-) y Acetoína (-), Caseína (+), Tirosina (-), Hidrólisis del Almidón (-), Reducción de Nitratos (-), Indol (-), Caldo V-P (+) y Catalasa (+)] que caracterizaron a la especie *Bacillus sphaericus*.

La mortalidad larvaria de *Culex quinquefasciatus* aumentó en relación directa a la concentración (esporas/mL) en ambos tipos de agua (Fig. 1). Durante el desarrollo experimental, se comprobó la elevada susceptibilidad de larvas del II y III estadio de *Culex quinquefasciatus* frente a diferentes concentraciones utilizadas de *Bacillus sphaericus* 2362. También se comprobó por

ensayos repetitivos (6 réplicas) que *Anopheles pseudopunctipennis* no es susceptible a *Bacillus sphaericus* 2362, porque no se evidenció mortalidad larvaria, con ninguna concentración.

Los porcentajes acumulativos de mortalidad larvaria en agua destilada y agua de criadero de *Culex quinquefasciatus* frente a *Bacillus sphaericus* 2362 son presentados en las Tablas 2 y 3. A las 12 horas de exposición los porcentajes de mortalidad larvaria alcanzaron valores menores al 3% con todas las concentraciones utilizadas y en ambos tipos de agua. A las 24 horas de exposición usando concentraciones mayores a 1.5×10^{11} ufc/mL se observó porcentajes acumulativos de mortalidad larvaria mayor al 50% de la población expuesta en ambos tipos de agua. Los valores máximos de mortalidad se obtuvieron a las 48 horas de exposición, obteniendo porcentajes acumulativos de reducción larvaria del 85,8%, 91,1%, 96,4% y

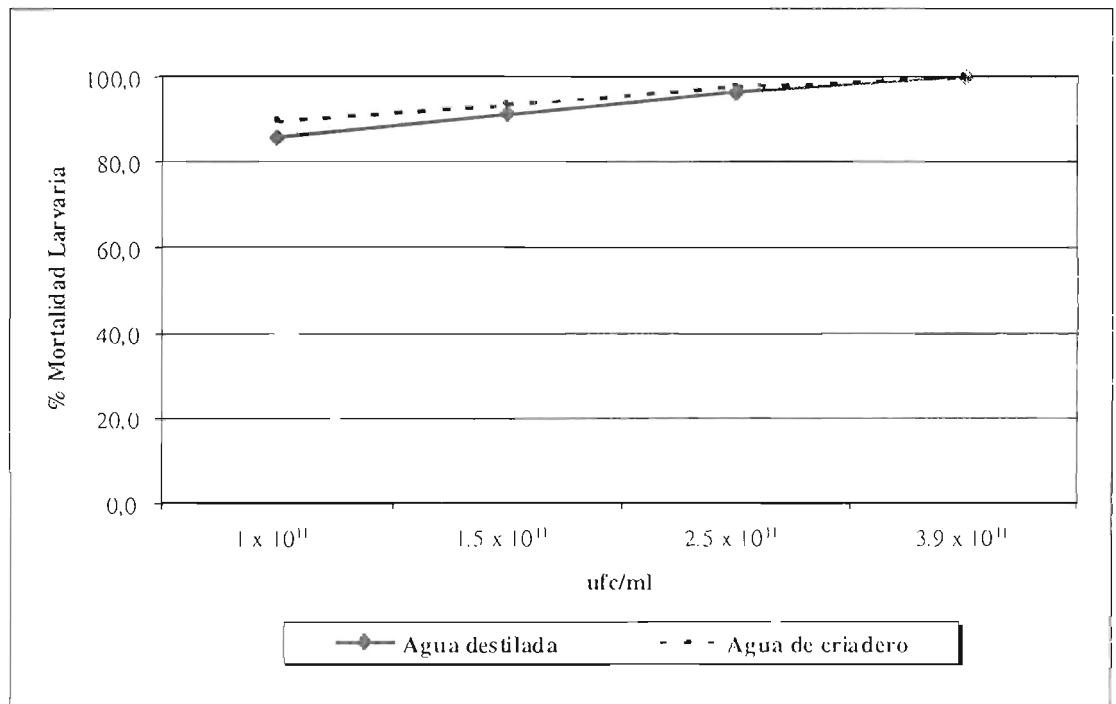


Fig. 1 Curva de Mortalidad Acumulativa de *Cx. quinquefasciatus* vs. Concentración de *Bacillus sphaericus* 2362 a las 48 horas de exposición

Tabla 2. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles pseudopunctipennis* con *Bacillus sphaericus* 2362 en agua destilada

| Concentración esporas/ml | Tiempo de exposición | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|-----|------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|---|
| | 12 h | | 24 h | | 36 h | | 48 h | | 72 h | | |
| | Cx. | An. | Cx. | An. | Cx. | An. | Cx. | An. | Cx. | An. | |
| Control o testigo (100 larvas II y III) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 x 10 ¹¹ | 0,9 | 0 | 48,4 | 0 | 73,3 | 0 | 85,8 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 1,5 x 10 ¹¹ | 0,9 | 0 | 58,7 | 0 | 79,6 | 0 | 91,1 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 2,5 x 10 ¹¹ | 1,3 | 0 | 69,3 | 0 | 84,9 | 0 | 96,4 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 3,9 x 10 ¹¹ | 1,9 | 0 | 83,1 | 0 | 92,9 | 0 | 100,0 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 2,2 x 10 ¹¹ | 1,3 | 0 | 64,8 | 0 | 82,6 | 0 | 93,3 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |

Cx. = *Culex quinquefasciatus*

An. = *Anopheles pseudopunctipennis*

Tabla 3. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles pseudopunctipennis* con *Bacillus sphaericus* 2362 en agua de criadero

| Concentración esporas/ml | Tiempo de exposición | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|-----|------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|---|
| | 12 h | | 24 h | | 36 h | | 48 h | | 72 h | | |
| | Cx. | An. | Cx. | An. | Cx. | An. | Cx. | An. | Cx. | An. | |
| Control o testigo (100 larvas II y III) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 x 10 ¹¹ | 1,3 | 0 | 64,9 | 0 | 82,2 | 0 | 89,8 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 1,5 x 10 ¹¹ | 1,8 | 0 | 69,8 | 0 | 85,3 | 0 | 93,3 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 2,5 x 10 ¹¹ | 1,8 | 0 | 72,9 | 0 | 89,8 | 0 | 97,8 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 3,9 x 10 ¹¹ | 2,2 | 0 | 80,4 | 0 | 94,7 | 0 | 100,0 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |
| 2,2 x 10 ¹¹ | 1,8 | 0 | 72,0 | 0 | 88,0 | 0 | 95,2 | 0 | 100,0 | 0 | 0 |

Cx. = *Culex quinquefasciatus*

An. = *Anopheles pseudopunctipennis*

100% en agua destilada y 89,8%, 93,3%, 97,8% y 100% en agua de criadero con concentraciones de 1×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,9 \times 10^{11}$ esporas/ml respectivamente. El 100% de mortalidad larvaria se obtuvo a las 72 h de exposición con todas las concentraciones aplicadas en ambos tipos de agua; no se observó mortalidad larvaria en los controles Tablas 2 y 3.

La prueba paramétrica de ANOVA (Tablas 6 y 7) determinó que la presencia de *Bacillus sphaericus* 2362 en los vasos de prueba indujo la mortalidad larvaria de *Culex quinquefasciatus*, y se obtuvo diferencias significativas entre los grupos tratados y control a un nivel de significancia de 0,05, se obtuvo un valor $p = 0,031 < 0,05$ para agua destilada y $p = 0,012 < 0,05$ para agua de criadero, lo que determina que existen diferencias significativas entre tratamientos. Para probar si la calidad de agua tuvo influencia en los resultados obtenidos se utilizó el Análisis Estadístico de MANOVA (Tablas 8 y 9), donde

no se obtuvo diferencias significativas entre los tipos de agua a un nivel de significancia 0,05. El valor $p = 0,789 > 0,05$, indica que estadísticamente no existen diferencias significativas entre los dos tipos de agua para cualquier nivel de concentración del biolarvicida. Igualmente las pruebas individuales para cada nivel de concentración de biolarvicida entre los dos tipos de agua no difieren significativamente ($p = 0,847 > 0,05$, $p = 0,905 > 0,05$, $p = 0,952 > 0,05$, $p = 0,996 > 0,05$) cuando se usa una concentración específica de 1×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,9 \times 10^{11}$ esporas/ml respectivamente.

La toxicidad de *Bacillus sphaericus* 2362 sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* a las 48 h de exposición presentó valores de $LC_{50} = 0,1750$ mg esporas/l y $LC_{90} = 0,7481$ mg de esporas/l en agua destilada, asimismo, para agua de criadero los valores de toxicidad fueron de $LC_{50} = 0,1081$ mg de esporas/L, y $LC_{90} = 0,5709$ mg de esporas/L, según programa de análisis Probit. Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Estimado de los valores de concentración letal de biolarvicida para agua destilada según Análisis Probit a las 48 h de exposición

| Puntos | Valor Estimado de Concentración mg/L | 95% Límite de Confianza | |
|-----------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------|
| | | Inferior | Superior |
| LC 1,00 | 0,0125 | 0,0000 | 0,0905 |
| LC 5,00 | 0,0271 | 0,0000 | 0,1376 |
| LC 10,00 | 0,0410 | 0,0000 | 0,1722 |
| LC 15,00 | 0,0541 | 0,0000 | 0,2006 |
| LC 50,00 | 0,1750 | 0,0000 | 0,3880 |
| LC 85,00 | 0,5666 | 0,0341 | 0,8929 |
| LC 90,00 | 0,7481 | 0,2067 | 1,4669 |
| LC 95,00 | 1,1292 | 0,7061 | 12,9543 |
| LC 99,00 | 2,4444 | 1,3267 | 4107,6289 |

$LC_{50} = 0,1750$ mg esporas/L

$LC_{90} = 0,7481$ mg esporas/L

Tabla 5. Estimado de los valores de concentración letal de biolarvicida para agua de criadero según Análisis Probit a las 48 h de exposición

| Puntos | Valor Estimado de Concentración mg/L | 95% Límite de Confianza | |
|----------|--------------------------------------|-------------------------|-----------|
| | | Inferior | Superior |
| LC 1,00 | 0,0053 | 0,0000 | 0,0073 |
| LC 5,00 | 0,0128 | 0,0000 | 0,0908 |
| LC 10,00 | 0,0205 | 0,0000 | 0,1154 |
| LC 15,00 | 0,0281 | 0,0000 | 0,1478 |
| LC 50,00 | 0,1081 | 0,0000 | 0,4780 |
| LC 85,00 | 0,4152 | 0,0000 | 0,6729 |
| LC 90,00 | 0,5709 | 0,0347 | 0,9011 |
| LC 95,00 | 0,9152 | 0,3064 | 1,7995 |
| LC 99,00 | 2,2173 | 1,1134 | 4055.3145 |

LC₅₀ = 0,1081 mg esporas/L

LC₉₅ = 0,5709 mg esporas/L

Tabla 6. Prueba de Significancia para tratamiento en agua destilada usando Única Suma de Cuadrados Análisis de Varianza (ANOVA)

| Fuente de Variación | SS | DF | MS | F | Sig of F |
|---------------------|---------|------|--------|--------|----------|
| Término de error | 34,70 | 15,0 | 2,31 | - | - |
| Bloques | 2570,16 | 5,0 | 514,03 | 222,22 | 0,000 |
| Tratamientos | 27,01 | 3,0 | 9,00 | 3,89 | 0,031 |
| (Total) | 2631,88 | 23,0 | 114,43 | - | - |

Valor crítico (Sig of F) resultado de $p = 0,031 < 0,05$

SS = Suma de Cuadrados
 DF = Grado de Libertad
 MS = Cuadrado Medio
 F = F Estimado
 Sig of F = Prueba de Significancia

Tabla 7. Prueba de Significancia para tratamiento en agua de criadero usando Única Suma de Cuadrados. Análisis de Varianza (ANOVA)

| Fuente de Variación | SS | DF | MS | F | Sig of F |
|---------------------|---------|------|--------|--------|----------|
| Término de error | 8,63 | 15,0 | .58 | - | - |
| Bloques | 2688,67 | 5,0 | 537,73 | 934,15 | 0,000 |
| Tratamientos | 8,97 | 3,0 | 2,99 | 5,19 | 0,012 |
| (Total) | 2706,28 | 23,0 | 117,66 | - | - |

Valor crítico (Sig of F) resultado de $p = 0,012 < 0,05$

SS = Suma de Cuadrados
 DF = Grado de Libertad
 MS = Cuadrado Medio
 F = F Estimado
 Sig of F = Prueba de Significancia

DISCUSIÓN

Los valores máximos de mortalidad que se obtuvieron a las 48 horas de exposición con un promedio de 93% y 95% de reducción larvaria, en agua destilada y agua de criadero respectivamente, a las concentraciones de 1×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, $3,9 \times 10^{11}$ esporas/mL, presentan una mediana $2,2 \times 10^{11}$ ufc/mL. Los altos valores de LC_{50} y LC_{90} hallados para agua destilada y para agua de criadero nos indican mayor presencia de unidades formadoras de colonias (ufc) en las concentraciones utilizadas con respecto al homogenizado, y asimismo pérdida de la capacidad entomocida, debido a que se necesita mayor carga de inóculo en cada concentración para obtener la misma toxicidad. Esto sugiere la existencia de esporas y de células vegetativas en el homogenizado. *Bacillus sphaericus* tiene que estar completamente esporulado para mantener elevada su capacidad entomocida (Davidson E., 1984a).

Aun así, son apenas superiores a los reportados por Nicolas *et al.* (1987), quienes utilizando una solución concentrada que

contiene 2×10^{10} esporas/mL de *B. sphaericus* cepa 2362, en bioensayos de laboratorio, obtuvieron un 98% de mortalidad de *Culex quinquefasciatus* a las 48 horas de exposición. Similares resultados se aprecia en el trabajo de Mulla *et al.* (1991), en ensayos de laboratorio utilizando *Bacillus sphaericus* 2362 (polvo primario) con títulos de 1×10^{11} esporas/mL contra larvas del cuarto estadio de *Culex quinquefasciatus*, obtuvieron un LC_{50} de 0.004 mg/L a las 48 horas postaplicación, que es 22,7 veces mayor al reportado para el homogenizado comercial. La variación en el nivel de actividad puede ser atribuida a diferentes factores tales como la cepa de larva (en las pruebas se usaron cepas silvestres de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles pseudopunctipennis*), edad y vigor de la larva y procedimientos usados en los bioensayos, ya que no todos utilizan los mismos protocolos en el momento de evaluar la toxicidad.

Majori *et al.* (1987) evaluando en bioensayos de laboratorio la cepa *Bacillus sphaericus* 2362 (spray seco) contra larvas de *Culex quinquefasciatus* reportaron un

Tabla 8. Prueba de Significancia Multivariado para los tratamientos entre los dos tipos de agua Análisis Multivariado (MANOVA)

| Nombre de la Prueba | Valores | F | DF | Error DF | Sig of F |
|---------------------|---------|---------|------|----------|----------|
| PILLAIS | 0,19413 | 0,42157 | 4,00 | 7,00 | 0,789 |
| HOTELLINGS | 0,24090 | 0,42157 | 4,00 | 7,00 | 0,789 |
| WLKIS | 0,80587 | 0,42157 | 4,00 | 7,00 | 0,789 |
| ROYS | 0,19413 | - | - | - | - |

Valor crítico (Sig of F) resultado de $p = 0,789 > 0,05$

- F = Estadístico de Prueba
- DF = Grado de Libertad
- Error DF = Grado de Libertad del Error
- Sig of F = Prueba de Significancia

Tabla 9. Prueba de Significancia Univariado entre los dos tipos de agua a un nivel de dosis de biolarvicida utilizados. Análisis Multivariado (MANOVA)

| Variable | Hypoth. SS | Error SS | Hypoth. MS | Error MS | F |
|----------|------------|------------|------------|------------|---------|
| 0.5x | 4,68750 | 1199,74167 | 4,68750 | 119,974167 | 0,03907 |
| 1x | 1,92000 | 1271,22667 | 1,92000 | 127,122667 | 0,01510 |
| 1.5x | 0,52083 | 1358,38833 | 0,552083 | 135,838833 | 0,00383 |
| 2x | 0,00333 | 1472,81333 | 0,00333 | 147,281333 | 0,00002 |

Valor crítico (Sig of F) resultado de:

$p = 0,847 > 0,05$, $p = 0,905 > 0,05$, $p = 0,952 > 0,05$, $p = 0,996 > 0,05$

- Hypoth. SS = Suma de Cuadrados de la Hipótesis
- Error SS = Suma de Cuadrados del Error
- Hypoth. MS = Cuadrado Medio de la Hipótesis
- Error MS = Cuadrado Medio del Error
- F = Estadístico de Prueba
- Sig of F = Prueba de Significancia
- 0,5x = 50ml/L (1×10^{11} esporas/ml)
- 1x = 100ml/L (1.5×10^{11} esporas/ml)
- 1,5x = 150ml/L (2.5×10^{11} esporas/ml)
- 2x = 200ml/L (3.9×10^{11} esporas/ml)

LC₉₀ de 0,031 ppm a las 48 de exposición; asimismo, obtuvieron un LC₅₀ de 0,022 ppm y un LC₉₀ de 0.130 ppm para larvas del tercer y cuarto estadio de *Anopheles gambiae*, a las 48 h de exposición. Consoli *et al.* (1997) evaluaron *Bacillus sphaericus* 2362 (concentrado emulsionable) contra larvas del tercer y cuarto estadio de *Culex quinquefasciatus* reportaron en condiciones de laboratorio un LC₅₀ de $1,3 \pm 0,6$ mg/L y LC₉₀ de $5,5 \pm 1,5$ mg/L, después de 48 h de exposición.

Davidson *et al.* (1984b) en bioensayos de laboratorio y en parcelas pequeñas en California, confirmaron que *Bacillus sphaericus* tiene un restringido rango de hospederos, dependiendo de las condiciones del laboratorio; la mayoría de especies de *Culex* fueron las más susceptibles para este organismo. El comportamiento de *Anopheles sp.*, parece ser variable; aunque pocas especies de Anophelinos han sido usados en los bioensayos. Por ejemplo, *An. albimanus*, *An. stephensi* son completamente sensibles, mientras que *An. quadrimaculatus* es menos sensible.

Según la OMS (1992), las larvas de mosquitos de los géneros *Psorophora* y *Culex* son muy susceptibles a *Bacillus sphaericus*, seguido por los géneros *Mansonia*, *Anopheles* y *Aedes*, en orden decreciente. Las larvas de *Culex* tienen un nivel de susceptibilidad muy elevado, del mismo orden que su susceptibilidad a los larvicidas químicos de uso corriente. Las larvas de *Anopheles*, en general, son 10-20 veces más tolerantes a las toxinas de *Bacillus sphaericus* que las de *Culex*; en cambio, las larvas de *Aedes aegypti* son mil veces más tolerantes. Diferentes autores han observado este perfil larvicidal para *Bacillus sphaericus* 2362 y otras cepas, como los revisados por Lacey y Undeen (1986b), donde preparaciones de esporas y cristales de *Bacillus sphaericus* los aplicaron sobre larvas de *Aedes aegypti* en dosis de 100 a 1000 veces más, que lo requerido por *Culex quinquefasciatus*. Existen diversos trabajos que demuestran diferentes niveles de sensibilidad de larvas de

mosquitos a las diferentes cepas de *Bacillus sphaericus*, que hacen pensar que la eficacia y eficiencia de *Bacillus sphaericus* como controlador biológico efectivo dependen de la especie de mosquito, tipo de agua, cepa bacteriana, formulación del insecticida etc. Los trabajos realizados en Brasil, EE. UU. y Australia han demostrado que *B. sphaericus* 2362, IB y 2297 son igual de efectivos contra *Culex quinquefasciatus* y *Aedes atropalpus*, y que la cepa 1593 es tóxica para *Aedes nicromaculis*. Otros concluyen que *Bacillus sphaericus* es más activo contra *Culex sp.* y *Anopheles sp.* y menos activo contra *Aedes sp.* (Baumann *et al.*, 1991; Berry *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1993).

La calidad, tipo de agua, pH y luz solar son factores importantes en la determinación de la eficacia del *Bacillus sphaericus* 2362 para disminuir la densidad poblacional de larvas de mosquitos. En los bioensayos se utilizó agua destilada y agua de criadero. El agua del criadero de *Culex quinquefasciatus* se caracterizó por ser clara, con bajos niveles de polución, abundante vida animal y vegetal. La presencia de sustancias orgánicas aumentan el proceso de ingestión de partículas alimenticias de las larvas, que actúan como fagoestimulantes en el agua de criadero (Rashed y Mulla, 1989). Los resultados obtenidos en la determinación del LC₅₀ y LC₉₀ en los bioensayos con agua de criadero y agua destilada no indican diferencias significativas.

Bacillus sphaericus provee un elevado nivel de control en aguas claras más que en aguas poluidas (Mian y Mulla, 1983). Estos resultados coinciden con nuestras observaciones. Algunos autores reportan que la actividad de *Bacillus sphaericus* fue adversamente afectada por elevados niveles de polución en el agua. Des Rochers y García (1984) demostraron que *Bacillus sphaericus* 2362 persiste y permanece tóxico en una variedad de tipos de agua, pero el agua de desagüero primario (80 mg/L de sólidos suspendidos) tiene efectos negativos en la persistencia bacteriana en comparación con el agua de desagüero secundaria (12 mg/L

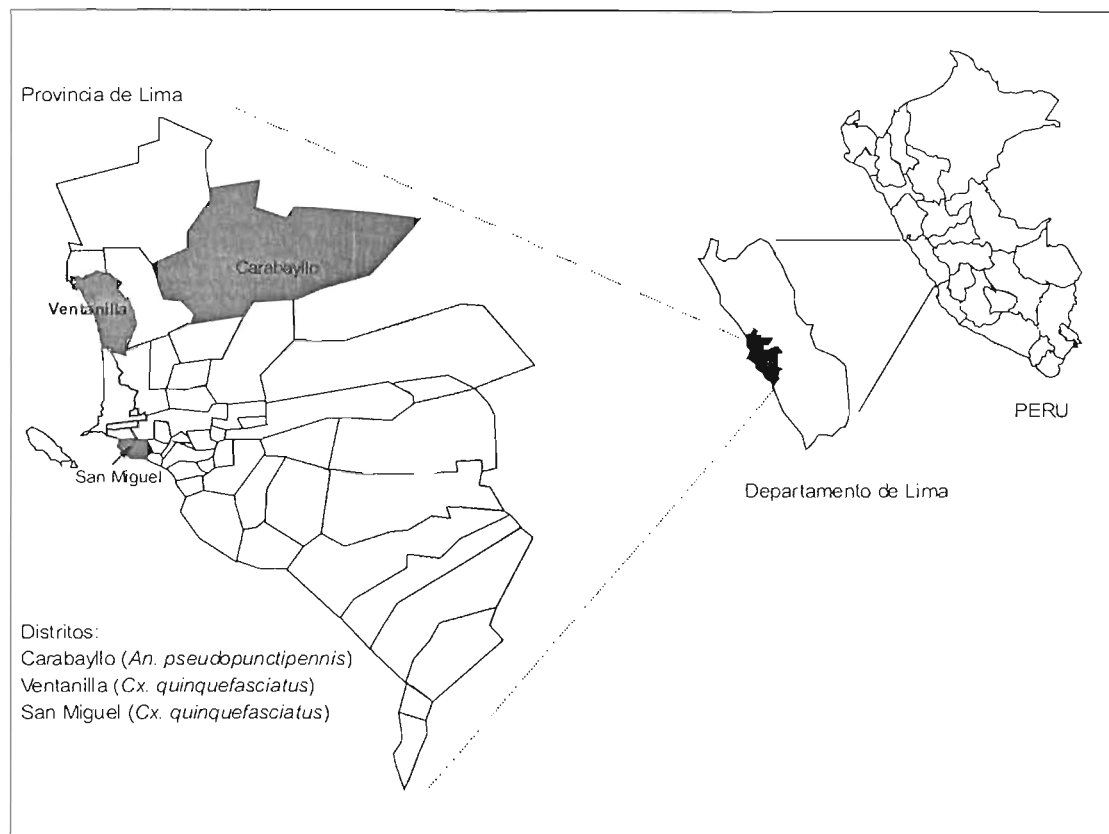


Fig. 2 Ubicación de los criaderos identificados en Lima

de sólidos suspendidos) y agua de lluvia. Jones et al. (1990), en Arkansas, demostraron la eficacia de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 en aguas de acequias de alcantarillado doméstico contra larvas de 2 y 3 estadio de *Culex quinquefasciatus* después de 48 horas postaplicación, lograron una eficacia de 80-93% de poblaciones larvales.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La especie *Culex quinquefasciatus* es susceptible a *Bacillus sphaericus* 2362, mientras que la especie *Anopheles pseudopunctipennis* no evidenció susceptibilidad.
2. Concentraciones mayores de $1,5 \times 10^{11}$ esporas/mL del *Bacillus sphaericus* 2362

provocaron más del 90% de reducción larvaria de *Culex quinquefasciatus* a las 48 horas de exposición.

3. La efectividad de la actividad larvicida de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de mosquitos está en relación con la especie de mosquito y la concentración utilizada.
4. Realizar evaluaciones de campo, en diferentes tipos de criaderos (niveles de polución) y con diferentes especies de anofelinos vectores de malaria.

LITERATURA CITADA

Arredondo, A., T. Lopez, M. Rodríguez and D. Bown. 1990. Small scale field trials of *Bacillus sphaericus* (strain 2362) against anopheline and culi-

- cine mosquito larvae in southern Mexico. Journal American Mosquitoes Control Association. 6(2): 300-305.
- Baumann, P., M. Clark, L. Baumann y A. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a Mosquito Pathogen: Properties of the Organism and its Toxin. Microbiology Reviews. 55: 425-436.
- Berry, C., J. Hindley, A. Ehrhardt, T. Grounds, I. Souza y E. Davidson. 1993. Genetic determinants of the host range of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. Journal Bacteriology. 175: 510-518.
- Calderón, G., R. Fernández y J. Valle. 1995. Especies de la fauna anophelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia, infectividad e importancia en la transmisión de malaria en el Perú. Revista Peruana de Epidemiología. 8(1):5-53.
- Consoli, R., B. De Santos, M. Lamounier, N. Secundino, L. Rabinovitch, C. Silva, R. Alves and N. Carneiro. 1997. Efficacy of a New Formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 92(4): 571-573.
- Castro, J., García, I. y Neyra, D. 1996. Evaluación del tratamiento con *Bacillus sphaericus* 2362 en criaderos naturales en zonas de alto riesgo de malaria. Revista Peruana de Epidemiología. 9(2): 18-23.
- Davidson, E. W. 1984a. Microbiology, Pathology and Genetics of *Bacillus sphaericus*: Biological Aspects which are Important to Field Use. Mosquito News. 44(2): 147-152.
- Davidson, E. W., M. Urbina, J. Payne, M. S. Mulla, H. Darwazeh, H. T. Dulmage and J. A. Correa. 1984b. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as a larvicide in the aquatic environment. Applied and Environmental Microbiology. 47: 125-129.
- Des Rochers, B. and R. García. 1984. Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. Mosquito News. 44(2): 160-165.
- Jones, J., A. Weathersbee, P. Efirid and M. Meisch. 1990. Evaluation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* in septic ditches. Journal American Mosquitoes Control Association. 6(3): 496-499.
- Lacey, L., Heitzman, C. M., Meisch, M. and Biliodeaux, J. 1986a. Becomist Applied *Bacillus sphaericus* for the Control of Riceland mosquitoes. Journal American Mosquitoes Control Association. 2(4): 548-551.
- Lacey, L. and A. Undeen. 1986b. Microbial control of black flies and mosquitoes. Annual Reviews Entomology. 31: 265-296.
- Majori, G., A. Ali and G. Sabatinelli. 1987. Laboratory and Field Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* in Ouagadougou. Burkina Faso. Journal American Mosquitoes Control Association. 3(1): 20-24.

- Ministerio de Salud Perú. 1989. Programa Nacional de Zoonosis. Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de Transmisión. 78-84 pp.
- Mian, L. S. and M. S. Mulla. 1983. Factors influencing activity of de microbial agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae. Bulletin Society Vector Ecology. 8: 128-134.
- Montero, G., M. Diaz, A. Marrero y A. Castillo. 1991. Resultados de las Aplicaciones en Pilotaje del biolarvicida *Bacillus sphaericus* 2362 en criaderos de mosquitos del Municipio Santa Cruz del Norte (Provincia La Habana). Revista Cubana de Medicina Tropical. 43 (1): 39-44.
- Mulla, M. S., N. Singh and H. A. Darwazeh. 1991. Delayed Mortality and Morphogenetic Anomalies Induced in *Culex quinquefasciatus* by the Microbial control Agent *Bacillus sphaericus*. Journal American Mosquitoes Control Association. 7(3): 412-419.
- Nicolas, L. and J. Dossou-Yovo. 1987. Differential effects of *Bacillus sphaericus* strain 2362 on *Culex quinquefasciatus* and its competitor *Culex cinereus* in West Africa. Medical and Veterinary Entomology. 1: 23-27.
- OGE. Oficina General de Epidemiología (MINSA). 1998. Boletín Epidemiológico. Semana Epidemiológica N.º 24.
- OMS. 1976. Resistencia de los vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. 22.º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Insecticidas. Serie de Informes Técnicos N.º 585, 91 pp.
- OMS. 1982. Lucha Biológica Contra los Vectores de Enfermedades. Sexto Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial. Serie de Informes Técnicos N.º 679, 39 pp.
- OMS. 1992. Filariasis Linfática: La enfermedad y los métodos de lucha. Serie de Informes Técnicos N.º 821. 73 pp.
- Porter, A. G., E. W. Davidson and L. Jian-Wei. 1993. Mosquitocidal Toxins of Bacilli and their Genetic Manipulation for effective Biological Control of Mosquitoes. Microbiology Reviews. 57(4): 838-861.
- Rashed, S. and S. Mulla. 1989. Factors Influencing Ingestion of Particulate Materials by Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 26(3): 210-216.
- World Health Organization. 1985. Informal Consultation o the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BCV/Sphaericus/85.3 WHO/VBC/1-24.
- Yousten, A. and E. Davidson. 1982. Ultra structural Analysis of spores and Parasporal Crystal formed by *Bacillus sphaericus* 2297. Applied and Environmental Microbiology. 44:1449-1455.