

Evaluación del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de mosquitos en Loreto, Perú¹

Julia Castro² Diana Nongrados² Carlos Mariños²

RESUMEN

CASTRO J, NONGRADOS D, MARIÑOS C. 1999. Evaluación del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de mosquitos en Loreto, Perú. Rev. per. Ent. 41.- Se reporta la evaluación de *Bacillus sphaericus* cepa 2362, para controlar larvas de mosquitos en las localidades de Padrecocha, Santa Clara, Manacamiri y Santo Tomás de la ciudad de Iquitos, Loreto, Perú. Se usó la dosis de 10 ml/m² de suspensión del biolarvicida, que fue aplicado por aspersión con una bomba Hudson sobre la superficie de los criaderos. La actividad larvicida se evaluó a las 48, 72, 96 y 168 hs en el campo, verificándose el 90 % de efectividad sobre larvas de *Anopheles* a las 96 hs post-aplicación. Asimismo, se comprobó la actividad residual a los 7 y 30 días, confirmándose la presencia de la bacteria entomopatógena en muestras de agua y barro. La identificación entomológica previa a la aplicación reportó la presencia de *Anopheles darlingi*, *A. triannulatus*, *A. oswaldoi*, y *A. mattogrossensis*.

Por los resultados obtenidos, se recomienda incrementar el control de vectores mediante el uso de biolarvicidas, por su alta efectividad, especificidad, fácil aplicación y no presentar toxicidad contra los hidrobiontes acompañantes.

Palabras clave: *Anopheles*, *Bacillus sphaericus*, control biológico, criaderos, larvicida, mosquitos, Perú.

SUMMARY

CASTRO J, NONGRADOS D, MARIÑOS C. 1999. Evaluation of *Bacillus sphaericus* 2362 for control of mosquito larvae in Loreto, Peru. Rev. per. Ent. 41.- An evaluation of the use of *Bacillus sphaericus* strain 2362 against mosquito larvae, was performed at the localities of Padrecocha, Santa Clara, Manacamiri and Santo Tomás, in Iquitos, Loreto, Peru. The dosage employed was 10 ml/m² of biolarvicide suspension, applied by sprinkling with a Hudson pump over the surface of breeding sites. The larvicide activity was evaluated after 48, 72, 96 and 168 hr in the field. Under these conditions, 90 % effectiveness was found over *Anopheles* larvae 96 hr after application. Residual activity was measured after 7 and 30 days, confirming the presence of entomopathogenous bacteria in water and mud samples. Identification of larvae before larvicide application showed the presence of *Anopheles darlingi*, *A. triannulatus*, *A. oswaldoi*, and *A. mattogrossensis*.

According to these results, we recommend to increase biological control by using biolarvicides, due to their high effectiveness, specificity, easy application and non-toxic effect against other hidrobionts.

Key words: *Anopheles*, *Bacillus sphaericus*, biological control, breeding sites, larvicide, mosquitoes, Peru.

Introducción

El descubrimiento de los insecticidas de acción residual revolucionó las estrategias de lucha antivectorial, y contribuyó en gran medida a la organización de programas eficaces y

económicos para combatir los mosquitos vectores de enfermedades metaxénicas. Sin embargo, problemas como la aparición de resistencia a los insecticidas químicos (OMS 1980), contaminación ambiental causada por uso indiscriminado de insecticidas, y encarecimiento de los nuevos tipos de insecticidas químicos, han puesto de manifiesto que la lucha antivectorial ya no puede basarse exclusivamente en el uso de productos químicos. En tal sentido, el control biológico utilizando agentes microbianos constituye una mejor alternativa (OMS 1982, PORTER *et al.* 1993; DAVIDSON *et al.* 1984).

¹ Proyecto financiado por la Sub Región de Salud de Loreto, Perú. Programa de Control de la Malaria y OEM.

² Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela s/n, Lima, Perú. E-mail: d190007@unmsm.edu.pe.

El uso de bacterias entomopatógenas ofrece ventajas por su actividad específicamente larvívica. Los biolarvívicos se caracterizan por ser biodegradables, por lo que no contaminan el ambiente, son de fácil almacenamiento y aplicación, e inocuos para la flora, fauna e hibobiontes acompañantes de los cuerpos de agua. *Bacillus sphaericus* produce al menos dos toxinas durante la esporulación, y las evidencias demuestran que ambas proteínas actúan juntas como una toxina binaria, siendo la presencia de ambas requerida para desarrollar la actividad insecticida contra larvas de mosquitos susceptibles. La toxina binaria está conformada por proteínas de 51,4 y 41,9 kDa, ambas expresadas como proteína única, 3,5-kb *Hind III* (BAUMANN *et al.* 1991, PORTER *et al.* 1993) que, al ser ingeridas en forma de cristales, se solubilizan en el intestino medio, debido al pH alcalino del intestino de la larva. Luego ocurre un procesamiento proteolítico de la protoxina 51 y 42 kDa a proteínas de 49 kDa, que se ligan a las células epiteliales del ciego gástrico y parte posterior del intestino medio, internalizándose ambas toxinas por un mecanismo mediado por proteasas, involucrando la aparición de áreas de baja densidad electrónica, vacuolización e hinchamiento de las mitocondrias y, finalmente, lisis de las células intestinales, provocando se desencade la muerte de las larvas (DAVIDSON 1995).

Bacillus sphaericus cepa 2362 presenta como ingredientes activos esporas, cristales tóxicos y otros elementos esenciales, siendo efectivo para el control de larvas de mosquitos de los géneros *Culex* y *Anopheles*, y menos activo contra *Aedes*, *Mansonia* y *Psorophora*; además, tiene ventajas sobre *Bacillus thuringiensis* debido a que posee el atributo adicional de mantenerse viable en ambientes acuáticos poluidos y tener alta capacidad de reciclaje en cadáveres de larvas de mosquitos (DAVIDSON *et al.* 1984, BERRY *et al.* 1993).

El control de las principales especies de mosquitos vectores de enfermedades ha cobrado importancia a nivel nacional, ya que la malaria, fiebre amarilla, dengue, encefalitis de San Luis, fiebre oropuche, fiebre mayaro, etc. se han venido incrementando desde 1985, habiéndose presentado como brotes epidémicos en los departamentos de Loreto, Tumbes, Piura, San Martín, Amazonas y Ucayali. Sólo aplicando un control integrado se podrá disminuir la densidad y longevidad de las principales especies de mosquitos vectores de enfermedades. Por ello, se dió inicio al tratamiento con *Bacillus sphaericus* cepa 2362 en 38 criaderos naturales ubicados en zonas de alto riesgo de malaria, alcanzando 90 % de efectividad para todos los estadios larvarios y 94 % de eficiencia (CASTRO *et al.* 1996).

La seguridad del *Bacillus sphaericus* contra una vasta gama de insectos no causantes de enfermedades, invertebrados, y vertebrados, ha sido bien documentada, habiéndose comprobado que la actividad larvívica del *B. sphaericus* no constituye un peligro para otras especies. Su estabilidad genética y tolerancia a las condiciones de estancamiento, aumentan considerablemente el uso de las bacterias esporógenas (MOHAMED & HABIB 1989, BATISTA 1986).

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar en pruebas de campo la susceptibilidad del *Bacillus sphaericus* 2362, validando la efectividad del biolarvívico contra larvas de *Anopheles*, en localidades afectadas por malaria en la ciudad de Iquitos, Loreto, así como comprobar su baja toxicidad y permanencia en el medio.

Materiales y métodos

Lugares de estudio

El presente trabajo se realizó en las cuatro localidades siguientes de la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, departamento de Loreto, entre junio y julio de 1996, en época de vaciante de los ríos, y con temperaturas ambientales entre 28 y 38 °C:

- **Padrecocha**, a 45 min por río de la ciudad de Iquitos y a 20 min del puerto de Bellavista-Nanay, margen izquierda del Río Momón.
- **Manacamiri**, a 25 min del Lago Moronacocha, margen derecha del Río Nanay.
- **Santo Tomás**, a 50 min de Iquitos, en la orilla derecha del Caño de Mapacocha, Río Nanay.
- **Santa Clara**, a 40 min al oeste de Iquitos, en la margen izquierda del Lago Moronacocha, Río Nanay.

Criaderos seleccionados

Fueron seis, de los cuales tres eran lagunas permanentes, un pozo, y dos charcos temporales. Se caracterizó en cada uno de ellos la permanencia del espejo de agua, presencia de vegetación, y calidad del agua, determinándose los parámetros físico-químicos de pH, temperatura, concentración de nitritos, oxígeno disuelto, amoníaco, y conductividad (datos proporcionados por la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos) (tabla I).

La flora en los criaderos estuvo caracterizada por algas filamentosas, plantas flotantes, emergentes, y plantas semileñosas. La fauna

TABLA 1.- Parámetros físico-químicos de los criaderos de la ciudad de Iquitos.

Caseríos	Nº	Criaderos	Area	Tª	pH	Amoniaco*	TDS*	Conductividad**
Padrecocha	1	Lag. Permanente	352	28,4	5,8	3	15	30,1
	2	Lag. Permanente	600	23,3	5,6	2,9	14	29,2
Manacamiri	3	Pozo Temporal	6	36	5,5	3	14,5	29
	4	Charc. Temporal	20	31	5,7	3,2	14,8	28,2
Santo Tomás	5	Charc. Temporal	200	19	5,7	3,8	13,2	26,3
Santa Clara	6	Lag. Permanente	4.464	32,1	5,8	3,2	11,5	23,2

* mg/l

** us/c

asociada estuvo representada por invertebrados como arácnidos e insectos diversos, entre los que destacan chinches belostómidos, coleópteros acuáticos, ninfas de odonatos, larvas de hemípteros y otros.

Densidad poblacional de larvas de mosquitos

Las densidades poblacionales y estadios larvales se determinaron antes y después del tratamiento, empleando el método del cucharón, recomendado por la OMS, tratando en lo posible de cubrir la mayor extensión del criadero. Las muestras se recogieron con un cucharón en cada punto del criadero. En criaderos menores de 1 ha se aplicó 20 cucharonadas cada 5 m², cubriendo un espacio de 1 m², contabilizando los estadios larvales y devolviéndolos a los criaderos; en criaderos de mayor área el muestreo se realizó cada 10 m². Se seleccionó una zona del criadero como control o testigo, donde no se aplicó el biolarvicida.

Densidad poblacional de mosquitos adultos

En horas nocturnas se efectuó capturas de mosquitos adultos en las orillas de los criaderos, así como muestras intradomiciliarias y peridomiciliarias, utilizando atrayente humano y tubo aspirador de vidrio. Se identificó las especies de mosquitos a través de los estadios larvales y adultos, utilizando las claves de CONSOLI & OLIVEIRA (1994), CALDERÓN (1995), y GORJAM *et al.* (1973).

Biolarvicida

El biolarvicida utilizado fue *Bacillus sphaericus* cepa 2362, de formulación líquida, con títulos de 8-9 x 10⁹ esporas/ml, conocido comercialmente como GRÍSELESF 2362, proporcionado por los laboratorios LABIOFAM de La Habana, Cuba.

Aplicaciones

La dosis de aplicación empleada fue de 10 ml de la solución del biolarvicida, diluida en 90 ml de agua del mismo criadero, previamente filtrada, por cada m², de acuerdo a la dosis recomendada por la casa comercial, teniendo en cuenta la calidad del agua y los estadios larvales existentes. Se utilizó en total 57,04 l del biolarvicida para un área total de 5.642 m² (Tabla 2). La aplicación se llevó a cabo con aspersores manuales marca Hudson de 10 l de capacidad con 55 lbs de presión, previa agitación antes de su uso, aplicándose en forma horizontal sobre la superficie acuática, con la finalidad de obtener una cobertura total.

TABLA 2.- Volumen de biolarvicida *Bacillus sphaericus* 2362 y diluyente aplicado por método de aspersión con bomba Hudson.

Caseríos	Criaderos	Biolarvicida	Agua	Volumen total
Padrecocha	1	3,5	31,68	35,18
Manacamiri	2	6	54	60
Manacamiri	3	0,06	0,54	0,6
Manacamiri	4	0,84	7,5	8,4
Santo Tomás	5	2	18	20
Santa Clara	6	44,64	401,76	446,4

Teniendo en cuenta los factores que influyen en la actividad biológica del *Bacillus sphaericus*, como son los rayos solares, calidad y temperatura del agua, etc., se procedió a efectuar la aplicación en las primeras horas de la mañana.

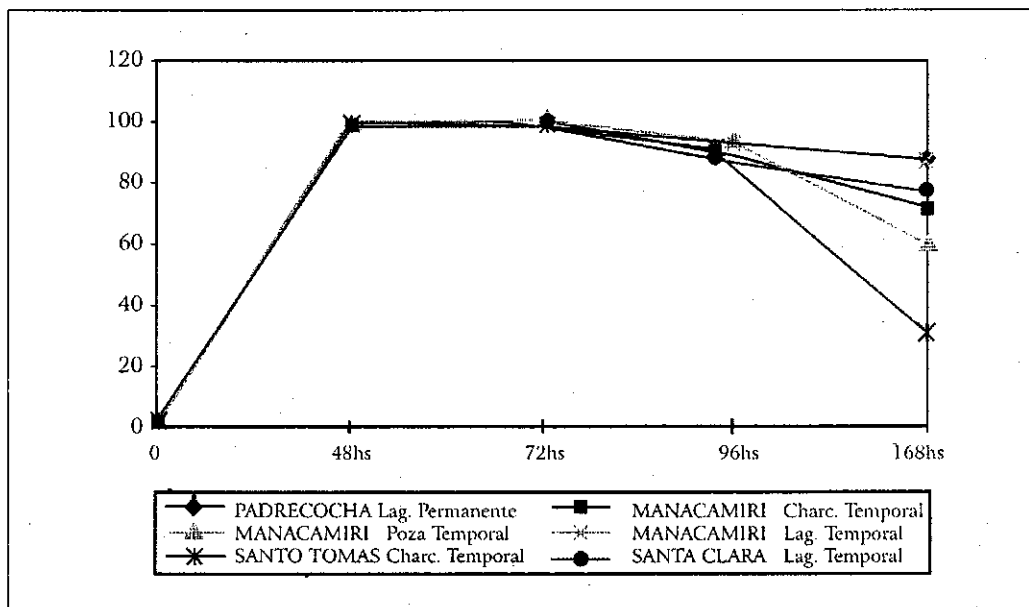


FIGURA 1.- Curva de mortalidad de larvas de *Anopheles* spp.

Efectividad de la aplicación

Para determinar la efectividad del tratamiento, se realizó muestreos larvales después de 48, 72, 96 y 168 hs de la aplicación, obteniéndose el porcentaje de reducción larvaria por la confrontación del número de larvas de mosquitos de los estadios I al IV, antes y después del tratamiento.

Para comprobar la permanencia del *Bacillus sphaericus* en el ambiente, se tomó muestras de agua y barro del fondo del criadero, 7 y 30 días después de la aplicación. Las muestras fueron sembradas en cultivos bacteriológicos.

Resultados y discusión

Se trató seis criaderos de anofelinos. Las densidades larvales oscilaron entre 8 y 174

larvas por m² de *Anopheles* de I, II, III y IV estadio de las siguientes especies: *A. triannulatus*, *A. darlingi*, *A. mattogrossensis* y *A. oswaldoi*.

Se determinó, mediante evaluaciones continuas, que el efecto larvicida se inicia 48 hs después de la aplicación del producto, manteniéndose la efectividad hasta las 72 hs, con un porcentaje de mortalidad del 100 % para larvas del I al IV estadio. Se verificó el incremento de densidad larval a las 96 hs de la aplicación, obteniéndose un 90 % de reducción larval debido al efecto residual del *Bacillus sphaericus* (tabla 3). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por KARSCH *et al.* (1992), con un 98 % de efectividad contra *A. gambiae* a las 48 hs en campos de arroz; asimismo, LACEY *et al.* (1986) reportan un 82 % de efectividad a las 48 hs de aplicación, para larvas de *A. quadrimaculatus*.

TABLA 3.- Efectividad del tratamiento con *Bacillus sphaericus* 2362 en criaderos de la ciudad de Iquitos.

Caseríos	Padrecocha	Manacamiri			Santo Tomás	Santa Clara
	Lag. Permanente	Charc. Temporal	Poza Temporal	Lag. Temporal	Charc. Temporal	Lag. Temporal
48hs	100	100	100	100	100	100
72hs	100	100	100	99,4	100	100
96hs	89	88	93	92,5	87,5	86
168hs	88	70,6	60	87	12,5	76

El efecto residual se mantuvo hasta la semana posterior al tratamiento. La curva del porcentaje de reducción larval en los criaderos disminuyó en relación al tiempo, incrementándose la población de larvas del primer estadio debido a la oviposición de adultos que repoblaron la zona, ya que las esporas, por efecto de la gravedad, se hundieron en el agua, quedando fuera del alcance de la zona donde habitualmente se alimentan los mosquitos, por lo que podría deducirse que el control adulticida no es eficaz o tiene bajo efecto residual (fig. 1).

Las aplicaciones demostraron la alta efectividad de la formulación aplicada, en la dosis recomendada de 10 ml/m² entre las 48 y 96 hs de aplicación. Similares resultados obtuvieron MONTERO *et al.* (1991), con igual dosis entre las 24 y 72 hs, reportando una reducción del 100 % de larvas de *A. albimanus*.

La efectividad del control inicial de larvas de mosquitos se debe principalmente a las características alimenticias que poseen los anofelinos. Estas larvas obtienen las partículas alimenticias de la superficie de los cuerpos de agua, donde ingieren las esporas entomopatógenas que, debido a su baja densidad, pueden flotar (GOLDBERG *et al.* 1977).

La inocuidad del *Bacillus sphaericus* se comprobó en relación a una gran cantidad de especies de insectos, arácnidos, peces, anfibios, aves, etc., así como en la fauna nativa del cuerpo de agua. No se registró reacciones alérgicas en el personal de trabajo por exposición a, o manipuleo del, producto. Estas observaciones concuerdan con las de MONTALVÁN (1989), al aplicar *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, que es otra bacteria análoga usada en el control biológico de mosquitos vectores, y también con las de PORTER *et al.* (1993).

La permanencia del *Bacillus sphaericus* 2362 en el criadero se comprobó a los 30 días después de la aplicación en muestras de barro obtenidas del fondo del criadero, lo que sugiere la capacidad que posee la bacteria de reciclamiento y persistencia en el ambiente por largos períodos (DAVIDSON *et al.* 1984, PORTER *et al.* 1993).

Por los resultados obtenidos, recomendamos el control biológico como una buena alternativa de control vectorial a través del uso de biolarvicidas, por ser efectivos, específicos, de fácil aplicación y no presentar toxicidad contra la flora y fauna acompañantes.

Literatura

Batista S. 1986. Contrôle microbiano de insetos. Brasília, Editora Manole. 330 pp.

Baumann P, Clark M, Baumann L, Broadwell A. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxin. Microbiol. Rev. 55: 425-436.

Berry C, Hindley J, Ehrhardt A, Grounds T, Souza I, Davidson E. 1993. Genetic determinants of the host range of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. J. Bacteriol. 175: 510-518.

Calderón G. 1994. Clave para identificar especies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae, Anophelinae) del Perú (adultos hembras). Rev. per. Ent. 37: 31-40.

Castro J, García I, Neyra D. 1996. Evaluación del tratamiento con *Bacillus sphaericus* en criaderos naturales en zonas de alto riesgo de malaria. Rev. per. Epidemiol. 9(2): 18-23.

Consoli R, Oliveira R de. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil. Rio de Janeiro, Editora FioCruz. 225 pp.

Davidson E. 1995. Biochemistry and mode of action of the *Bacillus sphaericus* toxins. Mem. Inst. O. Cruz 90(1): 81-86.

Davidson E, Urbina M, Payne J, Mulla M, Darwazeh H, Dulmage H, Corra J. 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. Appl. environ. Microbiol. 47: 125-129.

Goldberg L, Margolit J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News 37: 355-358.

Gorham J, Stojanovich C, Scott H. 1973. Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica Occidental. Mosquito Syst. 5(2): 97-154.

Karsch S, Asidi N, Manzambi Z, Salaun J. 1992. Efficacy of *Bacillus sphaericus* against the malaria vector *Anopheles gambiae* and other mosquitoes in swamps and rice fields in Zaire. J. amer. Mosquito Control Assoc. 8(4): 376-380.

Lacey L, Heitzman C, Meisch M, Billodeaux J. 1986. Beecomist applied to *Bacillus sphaericus* for the control of riceland mosquitoes. J. amer. Mosquito Control Assoc. 2(4): 548-551.

Mohamed E, Habib M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. Mem. Inst. O. Cruz 84(3): 31-34.

Montalván SE. 1989. *Bacillus thuringiensis* para controlar larvas de mosquitos culicidos en Sullana, Piura, 1987. Rev. per. Ent. 32: 103-109.

Montero G, Díaz M, Marrero A, Castillo F. 1991. Resultados de las aplicaciones en pilotaje del biolarvicida *Bacillus sphaericus* 2362 en criaderos de mosquitos del municipio Santa Cruz del Norte (Prov. La Habana). Rev. cub. Med. trop. 43(1): 39-44.

OMS. 1982. Lucha Biológica contra los vectores de enfermedades. Sexto Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de Vectores y Lucha Antivectorial. Serie de Informes Técnicos 679: 1-39.

Porter A, Davidson E, Liu J-W. 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. Microbiol. Rev. 57(4): 838-861.