

## Eficacia del Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) como controlador biológico de larvas de *Anopheles aquasalis* Curry Frances Osborn<sup>1</sup>, Melfran Herrera<sup>2</sup> & Armando Salazar<sup>2</sup>

Actualmente existen diferentes productos a base de *Bacillus* spp. que tienen un efecto larvicida sobre *Anopheles* spp., vectores de la malaria. Sin embargo, su eficacia es variable dependiendo de la especie blanco y las condiciones ambientales. Se evaluó la efectividad del producto Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) como controlador biológico de *Anopheles aquasalis*, principal vector de malaria en el estado Sucre, en dos ocasiones bajo las mismas condiciones de laboratorio, en el año 2002 y luego en el 2006. Se prepararon soluciones del producto a concentraciones de 1, 5, 10, 50 y 100 ppm (año 2002) y 5, 25, 50, 75 y 100 ppm (año 2006), en 600 mL de agua potable. Luego se trasvasaron 100 mL de cada una de las soluciones en envases plásticos de 250 mL y se colocaron 10 larvas de los estadios tercero tardío o cuarto temprano en cada uno de los recipientes. En el 2002, a los 48 horas en 100 ppm el Griselesf® había matado solamente 0,84% de la población aumentando a 25% a las 72 horas. En el 2006, en 100 ppm, hubo mortalidades de 6,67 y 11,67% de las poblaciones de las larvas a las 48 y 72 horas respectivamente. Los resultados sugieren que Griselesf® no es efectivo contra las larvas de *An. aquasalis* del estado Sucre.

**Palabras claves:** *Anopheles*, biolarvicida *Bacillus sphaericus* (2362).

### INTRODUCCIÓN

Actualmente existen diferentes productos comerciales a base de bacterias del género *Bacillus* spp. que tienen un efecto larvicida sobre *Anopheles* spp., vectores de la malaria. Sin embargo, la eficacia de las diferentes formulaciones puede variar dependiendo de la especie blanco y las condiciones ambientales, entre otras (Becker *et al.*, 1989). Por lo tanto, es importante seleccionar la formulación más efectiva para asegurar su eficiencia para controlar las poblaciones de las diferentes plagas de salud pública en las regiones donde se encuentran.

La formulación comercial Griselesf®, a base de *Bacillus sphaericus* 2362, ha sido empleada en varios países de Centro y Suramérica desde el año 1991, con un alto grado de éxito. Montero *et al.*, (1991), aplicaron este producto en 160 criaderos de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes taeniorhynchus* y *Anopheles albimanus* en el municipio Santa Cruz, La Habana, Cuba, donde causó un 100% de reducción larvaria hasta por 5 meses. Estos estudios fueron replicados en el municipio Buenaventura (Colombia) (Villarreal, 1995), Managua (Nicaragua) (Rivera, 1997), Guatemala (Blanco *et al.*, 2000) y Honduras (Blanco *et al.*, 2002). En todos estos reportes se empleó una dosis de 10 mL/m<sup>2</sup> del producto, obteniéndose reducciones larvarias entre 78,12 (Blanco *et al.*, 2002) y 100% durante periodos de tres a cinco meses (Villarreal, 1995; Rivera, 1997; Blanco *et al.*, 2000, 2002). Todas las pruebas se hicieron contra *An. albimanus*, excepto la realizada en Colombia, donde se aplicó el producto en criaderos de *An. albimanus* y *An. nuneztovari*.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Cerro del Medio, Universidad de Oriente, Cumaná, Edo. Sucre. Venezuela

<sup>2</sup> Laboratorio de Entomología "Dr. José V. Scorza", Gerencia de Saneamiento Ambiental, FUNDASALUD. Carúpano, Edo. Sucre. Venezuela.

\*Autor de correspondencia: fosborn2001@yahoo.com

Sin embargo, Delgado *et al.* (2001) compararon Vectolex WDG® (al 51,2%) y Griselesf®, ambos a 0,25 g de ingrediente activo por m<sup>2</sup> (equivalente a 51 mL/m<sup>2</sup>), contra larvas de *Anopheles* sp. en Boca de Nigua, República Dominicana. El Vectolex WDG® tuvo un mejor desempeño hasta el cuarto día con un 100% de reducción comparado con un 58,2% producido por el Griselesf®. No obstante, ambos productos presentaron 0% de reducción para el día once.

Además, Berti *et al.* (2006), realizaron ensayos de efectividad y persistencia de Griselesf®, aplicando 0,25 g/m<sup>2</sup> contra poblaciones larvales de *An. aquasalis* en un pantano arbóreo en el municipio Mariño, estado Sucre, Venezuela, obteniendo como máximo de mortalidad alrededor del 62,8% en los primeros dos días de iniciado el ensayo para luego caer a partir del octavo día, hasta llegar a 48,6% a los 16 días.

En el año 2002, el Ministerio de Salud de Venezuela importó el Griselesf® para el control de las poblaciones de *Anopheles* spp., vectores de la malaria en este país. En el estado Sucre, como parte del programa de control vectorial de anofelinos se realizaron aplicaciones aéreas durante los meses de marzo y abril de 2002 en criaderos inabordables por vía terrestre debido a su gran extensión o dificultad de acceso. Dichos criaderos se encontraban localizados en los municipios Mariño, Cajigal, Libertador y Benítez (Informes Internos de la Gerencia de Saneamiento Ambiental (GSA) de FUNDASALUD, estado Sucre, 2002). Sin embargo, en esta oportunidad no se realizaron evaluaciones previas de laboratorio o de campo sobre la eficacia y persistencia de la formulación contra larvas del vector local, *An. aquasalis*.

Debido a lo anterior, y a que el Griselesf® ha mostrado una eficiencia variable contra diferentes especies de *Anopheles*, se consideró necesario realizar estudios de laboratorio para evaluar el efecto larvicida del Griselesf® sobre *An. aquasalis*, principal vector de la malaria en el estado Sucre.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La formulación de Griselesf® (0.6% IA, 600 ITU/mg) empleada fue importada a Venezuela por el

Ministerio de Salud de la empresa Labiofam, Cuba, y fue enviada a la Gerencia de Saneamiento Ambiental (GSA). Se realizaron dos ensayos, el primero en septiembre de 2002 y el segundo en mayo de 2006. El producto empleado en ambas experiencias provenía de lotes diferentes, recién importados a Venezuela y viables según la etiqueta.

Las larvas fueron obtenidas a partir de hembras adultas de *An. aquasalis* capturadas de un potrero de vacas en el pueblo de Río de Agua, municipio Libertador, Estado Sucre (10° 35' 11,7'' N; 62° 58' 09,8'' O), según la metodología de Delgado (1998) y Gómez & Osborn (2002) e identificadas utilizando las claves de Cova-García & Sutil (1977).

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Entomología Dr. J. V. Scorza (LEJVS) de la GSA, en Carúpano, estado Sucre. En ambos casos, las larvas de *An. aquasalis* se criaron hasta los estadios tercero tardío o cuarto temprano en bandejas plásticas de 24 x 16 x 6 cm con 200 mL de agua potable a una temperatura de 27 ± 0.5°C, % humedad 80 ± 5, y fotoperiodo 12:12, utilizando la metodologías de Delgado (1998) y Gómez & Osborn (2002).

Se prepararon soluciones del producto a concentraciones de 1, 5, 10, 50 y 100 ppm (año 2002) y 5, 25, 50, 75 y 100 ppm (año 2006), en 600 mL de agua potable. Luego se trasvasaron las larvas a envases plásticos con una superficie de 83 cm<sup>2</sup> y profundidad 5 cm, con 100 mL de cada una de las concentraciones a probar y se colocaron 10 larvas en cada uno de los recipientes. En cada ensayo se utilizaron 6 réplicas por concentración de producto más sus respectivos controles, todos montados durante un lapso de no más de dos horas. Se anotó la mortalidad de las larvas 48 y 72 horas después del inicio del experimento y se corrigió utilizando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), en el caso que la mortalidad de los controles excediera el 5%:

$$\% \text{ mortalidad corregida} = (X - Y / X) \times 100$$

donde: X = % de larvas vivas en el control

Y = % de larvas vivas en el tratamiento.

## RESULTADOS

En el ensayo del año 2002, se observó que a las 48 horas luego de la exposición de las larvas

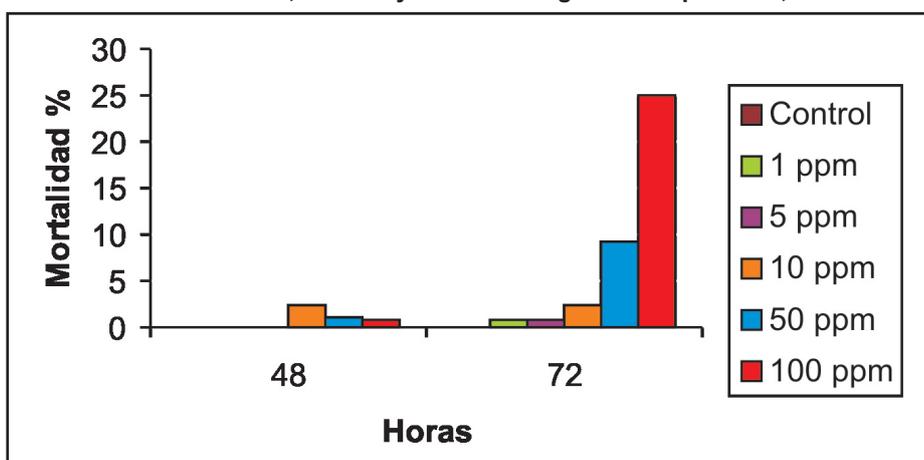
al Griselesf®, hubo mortalidades de 2,5, 1,02 y 0,84% en las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm, respectivamente. Las mortalidades aumentaron luego de las 72 horas en todas las concentraciones, alcanzando un 25% de la población a 100 ppm. No se produjo ninguna mortalidad en los controles (Fig. 1).

En cuanto al bioensayo realizado en el año 2006, a las 48 horas hubo mortalidades de 6,67; 1,67; 0, 3,33 y 6,67% en las concentraciones de 5, 25, 50, 75 y 100 ppm, respectivamente. A las 72 horas, luego de la exposición, la única concentración donde hubo un aumento significativo fue en 100 ppm donde siete larvas murieron, representando solamente 11,67% de la población. No se produjo ninguna mortalidad en los controles (Fig. 2).

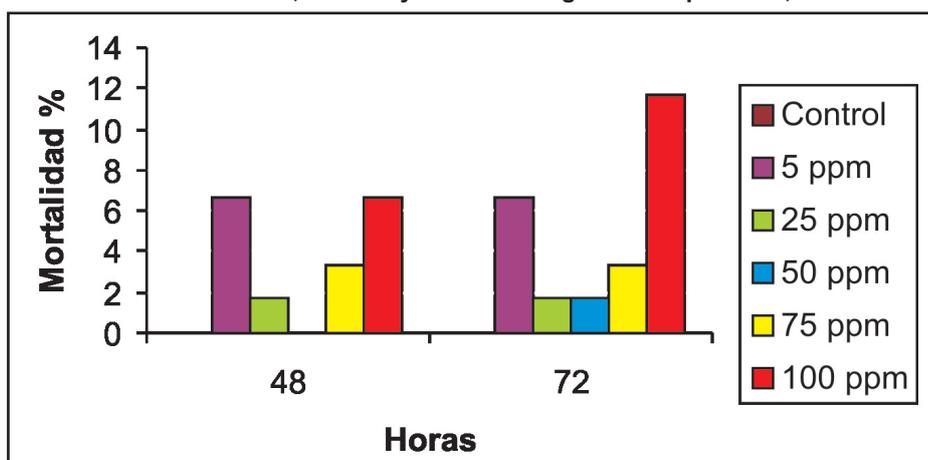
## DISCUSIÓN

En ambos ensayos, el Griselesf® produjo mortalidades muy bajas en todas las concentraciones probadas, por lo cual no fue posible el cálculo de las concentraciones letales CL50 y CL95. Es también necesario resaltar que algunas de las concentraciones menores produjeron mayores mortalidades en las larvas que las concentraciones superiores, destacando especialmente la de 5 ppm en el año 2006, que mató más larvas que las concentraciones de 25, 50 y 75 ppm, tanto a las 48 como a las 72 horas. No sabemos que podría haber causado este hecho, sin embargo, es posible que se deba a las diferentes tasas de alimentación de los individuos. En todo caso, es obvio el bajo efecto del Griselesf® en todas las concentraciones probadas.

**Fig. 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de 3er-4to instar de *Anopheles aquasalis* producido por el producto comercial Griselesf® 2362, a las 48 y 72 horas luego de la exposición, año 2002.**



**Fig. 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de 3er-4to instar de *Anopheles aquasalis* producido por el producto comercial Griselesf® 2362, a las 48 y 72 horas luego de la exposición, año 2006.**



Ensayos realizados por otros autores, con el mismo producto, han producido mortalidades de 50% y 95% a 2,27 y 152,9 ppm, respectivamente, y 67,36 de eficiencia, para larvas de *An. aquasalis* provenientes de mosquitos hembras colectados en la ribera del Lago de Valencia, estado Aragua (Delgado, 2001).

Delgado *et al.* (2001), también realizaron estudios de laboratorio con este producto sobre larvas de *An. albimanus* en Santo Domingo, República Dominicana, donde obtuvieron 73% de mortalidad en 10 ppm (48 horas), lo cual fue comparable con la mortalidad producida por Vectolex WDG® (al 51,2%) para el mismo periodo: 82%.

Esas mortalidades son mucho mayores que las obtenidas en este trabajo, lo cual pudiera deberse a que los individuos de la población de *An. aquasalis* aquí estudiada presenten mayor resistencia al producto que los que se emplearon en los estudios arriba mencionados.

Las larvas de *An. aquasalis* colectadas del estado Sucre han mostrado una mayor resistencia a otros productos bacterianos, específicamente Vectobac®-12AS y Bactivec®, comparadas con larvas de esta misma especie colectadas de otra localidad en Venezuela. Delgado (1996) y Moreno *et al.* (2003), probaron Vectobac®-12AS y Bactivec®, respectivamente, en agua dulce contra las larvas de *An. aquasalis* criadas de adultas colectadas del mismo sitio en el Lago de Valencia, estado Aragua, encontrándose valores de las CL50 y CL95 de 0,013 y 0,10 ppm para Vectobac®-AS12 (Delgado, 1996) y 0,111 y 0,263 ppm para Bactivec® (Moreno *et al.*, 2003), mientras que en un estudio realizado por Osborn *et al.* (2007) con los mismos productos contra *An. aquasalis* del estado Sucre, los valores de las CL50 y CL95 fueron 0,2 y 0,67 ppm respectivamente para Vectobac®-12AS, y 0,89 y 5,05 ppm, respectivamente, para Bactivec®.

Estos resultados sugieren que *An. aquasalis* aparentemente tiene una mayor resistencia natural que *An. albimanus* y que las poblaciones de *An. aquasalis* del estado Sucre son más resistentes que las del Lago de Valencia, al menos a los productos a base de *Bacillus thuringiensis* probados. Sin embargo, es también aparente que *An. aquasalis* es más susceptible a las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* Vectobac®-

AS12 y Bactivec® que al Griselesf®. Otras formulaciones de *B. thuringiensis* también han dado buenos resultados contra esta especie, por ejemplo Vectobac®-G (0,2 %), Vectobac®-AS (0,6%), Teknar® (1,6 %) y una formulación experimental microencapsulada M-Bti® (0,1 %), que dieron CL50 y CL95 de entre 0.006 y 0.05 ppm, respectivamente (M-Bti®) y 0,48 y 4,8 ppm (Vectobac®-G) (Delgado, 2004).

Esto pudiera implicar que *An. aquasalis* es más susceptible a *B. thuringiensis* que a *B. sphaericus*. No obstante, trabajos de laboratorio realizados con otra formulación de *B. sphaericus* han arrojado buenos resultados, como por ejemplo Narváez (2003), quien obtuvo mortalidades de 99% cuando enfrentó larvas de *An. aquasalis* también colectados del estado Sucre, con Vectolex® CG 7,5% a una concentración de 0,75 ppm.

Estudios de campo realizados por Berti *et al.* (2002, 2006) también sugieren la susceptibilidad de *An. aquasalis* a formulaciones de *B. sphaericus*. La aplicación de Vectolex® CG 7,5% a una concentración de 0,2 g/m<sup>2</sup> produjo porcentajes de reducción de 100% hasta los cuatro días, bajando a un 67,5% a los 21 días en una sabana inundada en el municipio Cajigal, estado Sucre (Berti *et al.*, 2002). Vectolex® WDG-51,2%, en un manglar en el municipio Mariño, estado Sucre, produjo porcentajes de reducción de 100% hasta los ocho días y 90,2% hasta los 16 días (Berti *et al.*, 2006).

Lo expuesto anteriormente nos demuestra que existe una variabilidad en la respuesta dosis-mortalidad entre especies, e incluso entre diferentes poblaciones de la misma especie, a un mismo producto, y diferencias de la susceptibilidad de la misma especie o población frente diferentes formulaciones, lo que implica la necesidad de un monitoreo constante en las regiones donde se utilizan. En este caso, los resultados resaltan que *An. aquasalis* del estado Sucre tiende a tener una mayor resistencia natural a los larvicidas biológicos que otros anofelinos y que es más resistente al Griselesf® que otras formulaciones tanto de *B. thuringiensis* como a *B. sphaericus*.

En conclusión, los resultados producidos por esta formulación de *B. sphaericus* 2362 (Griselesf®) demuestran un bajo desempeño contra larvas de *An. aquasalis* del estado Sucre, comparados con los

presentados contra larvas de la misma especie de otras localidades de Venezuela y contra larvas de otras especies de anofelinos.

En base a lo anterior, no recomendamos su uso como controlador biológico de las larvas de esta plaga, al menos en dicho Estado. Además, recomendamos realizar ensayos de este tipo con las otras principales especies vectoras de malaria de nuestro país (*An. darlingi*, *An. nuneztovari* y *An. albimanus*).

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al personal de la Gerencia de Saneamiento Ambiental, Región XI por su ayuda en la colecta de los adultos de *An. aquasalis*. También quisiéramos agradecer las sugerencias de un árbitro anónimo, las cuales mejoraron sustancialmente el manuscrito. Este trabajo fue financiado en parte por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Proyecto No. CI-5-1901-0957/00 y el FONACIT Proyecto No. GI-200000-1541

#### **The effectiveness of Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) as a biological control of larvae of *Anopheles aquasalis* Curry**

#### SUMMARY

There are many different formulations of *Bacillus* spp. used as larvicides against the malaria vectors, *Anopheles* spp. Nevertheless, their effectiveness is variable depending on the target species and environmental conditions. The effectiveness of Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) as a biological control agent for the principal malaria vector in Sucre state, *Anopheles aquasalis*, was evaluated under similar laboratory conditions on two occasions, in 2002 and later in 2006. Solutions of the product were prepared at concentrations of 1, 5, 10, 50 and 100 ppm (2002) and 5, 25, 50, 75 and 100 ppm (2006), in 600 mL of potable water and for each concentration 100 mL was poured into each of six 250 mL plastic recipients. Ten late third or early fourth instar larvae were then placed into each recipient. In 2002, after 48 hours in 100 ppm Griselesf® had only killed 0,84% of the population, rising to 25% after 72 hours. In 2006, in 100 ppm, the mortality rates were 6,67 and 11,67% after 48 and 72 hours respectively. The results suggest that Griselesf® is not effective against *An. aquasalis* from Sucre state.

**Key words:** *Anopheles*, biolarvicide, *Bacillus sphaericus* (2362).

#### REFERENCIAS

- Abbott W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- Becker N., Zgomba M., Ludwig M., Pectric D. & Rettich F. (1989). Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatment. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**: 285-289.
- Berti J., Ramírez X., González J. & Herrera M. (2002). Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en criaderos naturales del estado Sucre, Venezuela. *Entomotropica.* **17**: 1-5.
- Berti J., González J., Herrera M. & Puentes N. (2006). *Field evaluation of efficacy of two formulations of Bacillus sphaericus against Anopheles aquasalis larvae in seasonal brackish mangrove of Sucre state, Venezuela.* 72nd Annual AMCA Meeting and 16th Latin American Symposium, Detroit, EE.UU.
- Blanco S., Martínez A., Rolando O., Velásquez C., Tello R. & Mendoza I. (2000). Introducción del *Bacillus sphaericus* cepa-2362 (Griselesf) para el control biológico de vectores maláricos en Guatemala. *Rev. Cubana Med. Trop.* **52**: 37-43.
- Blanco S., Colombi E., Nery L. & Canales D. (2002). Aplicación del biolarvicide *Bacillus sphaericus*-2362 (Griselesf) para el control de la malaria en un área de salud de la República de Honduras. *Rev. Cubana Med. Trop.* **54**: 134-41
- Cova-García P. & Sutil E. (1977). *Claves gráficas para la clasificación de anofelinos de Venezuela.* Pub. Div. End. Rurales Dir. Malarol. San. Amb. MSDS. Maracay, Venezuela.
- Delgado N. (1996). *Implicaciones ecofisiológicas de la introducción de Bacillus thuringiensis var. israelensis como controlador biológico de Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). Trab.

- Grado Dr. Ciencias Biológicas. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Delgado N. (1998). Parámetros demográficos de las fases inmaduras de *Anopheles aquasalis* Curry 1932 (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Bol Entomol Venezolana*. **13**: 27-43.
- Delgado N. (2001). *Evaluación de la eficacia de un insecticida biológico a base de Bacillus sphaericus contra Anopheles aquasalis*. Informe Técnico. Unidad de Asesoramiento y Evaluación de Plaguicidas, Instituto de Zoología Agrícola, U.C.V., Maracay.
- Delgado N. (2004). *Evaluación de la eficacia y persistencia de dos formulaciones a base de Bacillus thuringiensis var. israelensis y de dos formulaciones a base de B. sphaericus contra tres especies de Culicidae, en condiciones de laboratorio y campo*. Simposio Uso de *Bacillus* spp. para el control biológico de insectos de importancia médica en Venezuela. Maracay, estado Aragua.
- Delgado N., Solis A., Guzmán G., Ventura G., De Los Santos J., Montero D. *et al.* (2001). *Determinación de las concentraciones diagnóstico de cuatro formulaciones comerciales de Bacillus thuringiensis var. israelensis y B. sphaericus, sobre Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus y Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae), en Santo Domingo, República Dominicana*. XVII Congreso Venezolano de Entomología. Maturín, Monagas.
- Gómez C. & Osborn F. (2002).- Efectos de diferentes concentraciones salinas sobre el desarrollo de larvas y pupas de *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Entomotropica*. **17**: 121-127.
- 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 de Santa Cruz del Norte (Provincia La Habana). *Rev Cubana Med Trop*. **43**: 39-44.
- Moreno J., Delgado N. & González J. (2003). *Evaluación de la eficacia de una formulación comercial de Bacillus thuringiensis israelensis en condiciones de laboratorio sobre Anopheles albimanus Wied. y Anopheles aquasalis Curry del lago de Valencia*. XVII Congreso Venezolano de Entomología, Maracay, Venezuela.
- Narváez C. (2003). *Evaluación de una formulación de Bacillus sphaericus Neide 1904 para el control de larvas de Anopheles aquasalis Curry 1932 (Diptera: Culicidae) a diferentes concentraciones de sal en condiciones de laboratorio*. Trab. Grado Lcda. Bioanálisis. Cumaná, Venezuela.
- Osborn F., Herrera M., Gómez C. & Salazar A. (2007). Comparison of two commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis for the control of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) at three salt concentrations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **102**: 69-72
- Rivera P. (1997). Evaluación de la efectividad biolarvicida y residualidad de *Bacillus sphaericus* (cepa-2362) para el control de *Anopheles albimanus* en la costa del lago Xolotlan, Managua, Nicaragua, 1995. *Rev. Nicar. Ent.* **42**: 7-14.
- Villareal L. (1995). *Bacillus sphaericus*: para el control de vectores de enfermedades tropicales. *Rev. Latinoam. Salud San. Amb.* **1**: 12-14.

Recibido el 29/05/2006  
Aceptado el 11/03/2007