

# PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* UTILIZANDO ESPÁRRAGO (*Asparagus officinalis*) Y SU USO POTENCIAL PARA EL CONTROL DE LA MALARIA EN LA LIBERTAD - PERÚ\*

Franklin Vargas V<sup>1</sup>, Judith Roldán R<sup>1</sup>, Gina Zavaleta E<sup>1</sup>, Miriam Gil F<sup>1</sup>, Cynthia Ampuero R<sup>1</sup>, Ana Burga<sup>2</sup>, Bertha Moreno<sup>2</sup>, Carlos Vergara D<sup>3</sup>, Palmira Ventosilla L<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Nacional Trujillo.

<sup>2</sup> Dirección Regional de Salud La Libertad.

<sup>3</sup> Sanidad Policial III, Región La Libertad.

<sup>4</sup> Universidad Peruana Cayetano Heredia.

\* Este estudio contó con el apoyo técnico - financiero del Proyecto Vigía "Enfrentando las Amenazas de las Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes". MINSA-USAID.

## RESUMEN

**Objetivo:** Estandarizar un medio de cultivo utilizando la infusión de espárrago (*Asparagus officinalis*) para la producción masiva de *Bacillus thuringiensis* (Bti) H-14 var. *israelensis* y determinar el efecto biolarvívica del Bti sobre *Anopheles* sp en criaderos naturales del distrito Laredo durante los meses de Enero a Diciembre del 2000. **Materiales y métodos:** Se ensayaron 3 medios a base de infusión de espárrago blanco: M<sub>1</sub>: 100 mL de la infusión, pH 9; M<sub>2</sub>: 50 mL de la infusión con 50 mL de buffer fosfato, pH 7; y M<sub>3</sub>: 25 mL de la infusión con 75 mL de agua destilada, pH 9. Como control se utilizó el medio estándar TPH. La producción de Bti en los medios de cultivo fueron evaluadas para determinar la efectividad biolarvívica a través del LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>. El medio de cultivo óptimo (menor LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>) sirvió para la producción masiva del Bti, el cual se sometió a bioensayos de laboratorio y aplicaciones en criaderos naturales. La efectividad fue determinada mediante la densidad larvaria pre y post aplicación del Bti. **Resultados:** El medio de cultivo óptimo para la producción de Bti fue M<sub>1</sub>, mostrando alta efectividad, con 100% de mortalidad en condiciones de laboratorio y 71-97% de mortalidad en el campo a las 24 horas de exposición con 3 aplicaciones realizadas semanalmente. **Conclusiones:** M<sub>1</sub> es el medio óptimo para cultivar Bti, con alta efectividad para controlar larvas de *Anopheles* en el laboratorio y en el campo.

**Palabras claves:** *Bacillus thuringiensis*; *Asparagus officinalis*; Malaria/prevención & control; Control vectorial (fuente: BIREME).

## ABSTRACT

**Objective:** To standardize a culture medium using asparagus infusion (*Asparagus officinalis*) for the massive production of *Bacillus thuringiensis* (Bti) H-14 var. *israelensis* and to determine Bti bio-larvicide effect upon *Anopheles* sp. in natural breeding sites in Laredo district from January to December, 2000. **Materials and methods:** Three media based on white asparagus infusion were tested: M<sub>1</sub>: 100-mL infusion, pH: 9; M<sub>2</sub>: 50-mL infusion plus 50-mL buffer phosphate, pH: 7, and M<sub>3</sub>: 25-mL infusion plus 75-mL distilled water, pH: 9. The standard TPH medium was used as a control. Bti production in the different culture media was assessed in order to determine the bio-larvicide effectiveness using LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>. The optimum culture medium (lower values for LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>) served for Bti production, and it was evaluated in laboratory and natural breeding sites. Effectiveness was determined measuring larval density prior and after Bti application. **Results:** The optimum medium for Bti production was M<sub>1</sub>. It showed high effectiveness, with 100% mortality under laboratory conditions, and 71-97% mortality in the field after 24 hours of exposition with three weekly applications. **Conclusions:** M<sub>1</sub> is the optimum medium for culturing Bti, with high effectiveness for controlling *Anopheles* larvae both under laboratory and field conditions.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; *Asparagus officinalis*; Malaria/prevention & control; Vector control (source: BIREME).

## INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), de 85 especies de *Anopheles* que transmiten malaria, 56 pre-

sentan resistencia a los insecticidas: 54 al DDT, 28 a los organofosforados, y 19 a carbamatos y piretroides. El uso irracional y excesivo de estos insecticidas químicos responsables de la resistencia generada por los vectores maláricos, ha traído como resultado alta toxicidad para los humanos y su persistencia en el ambiente, con acumulación en grasas de animales y humanos<sup>1,2</sup>.

**Correspondencia:** Franklin Vargas Vásquez. Universidad Nacional de Trujillo. Calle Las Esmeraldas 403-Urb. Santa Inés, Trujillo. Telf.: (044) 222201 E-mail: frvv@usa.net

Cada año la malaria causa enfermedad en más de 100 millones de personas y ocasiona la muerte a más de 1 millón. En el Perú constituye uno de los más graves problemas de salud pública: los casos notificados en 1998 sobrepasaron los 200 000 casos; además, ocasiona un gran impacto sobre la economía de las poblaciones afectadas<sup>3</sup>. La malaria es ocasionada por hemoparásitos del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Debido a la variedad geográfica del país, esto determina la presencia de numerosas especies anophelinas, de las cuáles siete han sido señaladas como responsables de la transmisión<sup>4</sup>. Estos insectos pasan por cuatro fases bien definidas en su ciclo vital: huevo, larva, pupa y adulto, las tres primeras fases son acuáticas y el adulto aéreo; la larva es muy voraz y obtiene su alimento del agua, adaptándose a cualquier superficie de agua estancada dulce o salubre<sup>5,6</sup>.

El control de los vectores es el componente más importante de los programas de las enfermedades metaxénicas. La notable eficacia de los insecticidas hizo posible combatir durante muchos años a los vectores de malaria. Inicialmente, el insecticida más usado fue el DDT<sup>7,8</sup>. Es conocido que apareció resistencia a este compuesto químico y además se limitó su uso por producir alto grado de contaminación y desequilibrio ecológico, al no ser biodegradable y acumularse en la naturaleza. Actualmente, en nuestro medio se están usando los carbamatos y cipermetrinas, los cuáles también afectan el ecosistema debido a su falta de selectividad, causando daño a otras formas de vida<sup>9,10</sup>. El uso del larvicida Temephos (abate) ha tenido buenos resultados, sin embargo, en otros países de América Latina ya se han informado casos de resistencia.

Una de las acciones dirigidas a disminuir el riesgo de infección y el número de casos, es a través de la disminución de la población de vectores, sean en su estadio adulto o larvario. El control vectorial ha mejorado mucho por el uso de plaguicidas químicos y la manipulación del medio ambiente; no obstante, la OMS ha continuado buscando nuevos métodos de control, destacando el control biológico que utiliza directamente enemigos naturales. También existen otros métodos, como el control genético y el manejo del medio ambiente, que requieren utilización de tecnologías sofisticadas y de mayor costo<sup>11</sup>.

El control biológico puede definirse como el control de plagas por el uso directo o indirecto de enemigos naturales, depredadores y patógenos; es el uso de poblaciones de un organismo para controlar a otro. Se ha demostrado que el uso de bacterias esporógenas es muy importante en el control de mosquitos vectores debido al alto grado de actividad letal que presentan; una de ellas es el *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria gram positiva produce toxinas altamente específicas contra insectos<sup>12,13</sup>. Al esporular produce cristales paraesporales formados por la glicoproteína delta-endotoxina y que causa parálisis del epitelio intestinal, ruptura de las microvellosidades, cambios en los organelos citoplasmáticos y, finalmente, la muerte de la larva<sup>14,15</sup>. Los productos que contienen *B. thuringiensis* (Bti) son notablemente seguros, hasta ahora no se han registrado efectos dañinos en ensayos de seguridad con abejas, vertebrados y humanos; Bti es un larvicida eficaz y muy seguro para los trabajadores de salud, así como para los moradores y animales domésticos<sup>10,16,17</sup>. A fin de disminuir los costos en la producción masiva del Bti H-14 se han realizado trabajos con buenos resultados en el desarrollo de esporas y acti-

vidad tóxica usando como medios de cultivo agua de coco y extracto de endospermo, coco entero y yuca con resultados semejantes a los medios de cultivo comerciales<sup>17-19</sup>.

La ejecución del proyecto de irrigación Chavimochic en el departamento de La Libertad, ha propiciado un cambio regional en las condiciones ambientales y socioeconómicas. El incremento de las actividades agroindustriales ha permitido la migración y permanencia del hombre a estas zonas. Asimismo, la mayor disponibilidad de agua para el riego ha generado cuerpos de agua estancada, tanto en acequias como en pequeñas lagunas, que se han constituido en criaderos de larvas de zancudos, permitiendo un comportamiento endémico-epidémico de la malaria. Según el reporte de nuestro programa de control, *Anopheles pseudopunctipennis* y *An. calderoni* son los principales vectores de malaria registrados en este departamento, notificándose que hasta la semana epidemiológica 51, el número de casos de malaria se incrementó en algunos distritos, considerándose a Laredo como un distrito de mediano riesgo<sup>20</sup>.

Decidimos producir Bti en un medio de cultivo óptimo, con la utilización de productos naturales como el espárrago (*Asparagus officinalis*), debido a que en la zona norte del Perú este vegetal constituye uno de los cultivos más importantes y de bajo costo. Su exportación es muy elevada, dado que a nivel mundial es considerado un gran alimento nutritivo, con aporte calórico muy bajo pero rico en carbohidratos y fibra, conteniendo cantidades significativas de vitamina A, riboflavina y vitamina C, necesarios para el crecimiento bacteriano.

El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar un medio de cultivo utilizando infusión de *Asparagus officinalis* para la producción de *B. thuringiensis* H-14 variedad *israelensis* y determinar el efecto sobre formas larvarias de *Anopheles* sp. en criaderos naturales del distrito de Laredo de enero a diciembre del 2000.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa *Bacillus thuringiensis*, serotipo H-14, variedad *israelensis*, lote 91509. Las hembras de *Anopheles* sp. fueron colectadas en el campo y trasladadas al laboratorio donde se aislaron individualmente, a temperatura ambiental (24°C-28°C) y humedad entre 78-82%, para la oviposición<sup>21</sup>. Se colocaron los huevos obtenidos en pequeños recipientes de plástico con agua destilada para la eclosión. Las larvas fueron incubadas hasta que alcanzaron el III estadio de desarrollo para ser usadas en los bioensayos.

### MEDIOS DE CULTIVO

Se seleccionaron plantas de espárrago blanco procedentes del sector El Rosario, Chao, departamento de La Libertad. En un litro de agua destilada se colocó 400 g de espárrago, poniendo en ebullición por 5 minutos, posteriormente se filtró y distribuyó 100 mL del filtrado en frascos de 250 mL para ser autoclavados. Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

1. Medio 1 (M<sub>1</sub>): 100 mL del infuso, pH 9
2. Medio 2 (M<sub>2</sub>): 50 mL del infuso suplementado con 50 mL de buffer fosfato, pH 7.
3. Medio 3 (M<sub>3</sub>): 25 mL del infuso suplementado con 75 mL de agua destilada, pH 9.
4. Medio control (TPH): 100 mL de medio comercial, pH 7

Se sembró y realsló 10 mg del liófilo del *B. thuringiensis* H-14 var. *israelensis*, según las recomendaciones estándares para su producción<sup>22</sup>. Se utilizaron 4 botellas de vidrio estériles con capacidad de 1 L; a 3 de ellas se les colocó 100 mL de infusión de espárrago del M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub>, respectivamente, y a la cuarta botella, 100 mL del medio TPH. Los cuatro medios fueron esterilizados nuevamente y sembrados con una colonia típica de *B. thuringiensis* del reaislamiento anterior. Los medios fueron homogenizados por 3 minutos e incubados en un agitador mecánico (shaker), a 6 rpm por 96 horas<sup>18</sup>. Para la estandarización del medio de cultivo, se realizaron 3 repeticiones. Se realizó el control microbiológico cada 24 horas (coloración Gram y verde de Malaquita modificado).

A las 96 horas de incubación se realizó la cosecha, colocando el contenido de cada botella en tubos de centrifuga estériles, donde se realizaron los lavados con solución salina estéril y agua destilada por tres veces. Los productos de los lavados se inactivaron a 75°C por 15 minutos y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Se colocaron 10 larvas del III estadio de *Anopheles* sp. en vasos de plástico de 5 cm de diámetro, conteniendo 5 mL de agua destilada. Se escogió aleatoriamente un control y a los vasos restantes se añadió 100 mL de los lavados del Bti, evaluándolos cada 15 minutos hasta observar mortalidad al 100%.

Los lavados obtenidos de las cosechas en los medios M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> y control (TPH) se sometieron a 70°C por 10 minutos, se homogenizaron y se diluyeron decimalmente de 100 mL hasta 10<sup>-8</sup>. Se tomó 100 mL de las últimas diluciones para ser sembradas e incubadas en agar por duplicado. Se leyó el número de colonias en cada placa y se calculó el número de esporas viables por mL<sup>23</sup>.

#### BIOENSAYOS EN LABORATORIO

Para los bioensayos se utilizaron 7 grupos: 6 experimentales y 1 control. Cada grupo estuvo formado por 3 vasos conteniendo 20 larvas de *Anopheles* sp. del III estadio, y 100 mL de agua destilada, adicionándole volúmenes corres-

pondientes a las concentraciones de 6700 esp/mL, 16829 esp/mL, 42274 esp/mL, 106187 esp/mL, 266731 esp/mL y 670000 esp/mL, respectivamente. Las concentraciones fueron tomadas de tablas estandarizadas DDT<sup>17</sup>. Al grupo control se le agregó 1 mL de agua destilada estéril. Los 7 grupos se mantuvieron a las mismas condiciones ambientales y las lecturas del número de larvas muertas fueron realizadas después de 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas de aplicación del Bti.

Se determinó la concentración necesaria para matar el 50 y 90% de la población expuesta (infectividad o LC<sub>50-90</sub>) y el tiempo necesario para matar el 50 y 90% de la población de cada producción en los medios (virulencia o LT<sub>50-90</sub>). Este cálculo se realizó con la ayuda del programa Probit versión 1,4<sup>24</sup>, con un nivel de confianza del 95%. Una vez conocido el medio óptimo para la producción del Bti, se procedió a reactivar, aislar y reaislar la cepa de Bti, como se indicó anteriormente.

Reaislada la cepa de Bti, se realizaron las siembras en el medio estandarizado (M<sub>1</sub>) para su producción masiva. Se utilizaron 6 botellas de vidrio estériles con capacidad de 1 L. Se agregó 100 mL de infusión de espárrago y se esterilizaron y sembraron con una colonia típica de *Bti* del reaislamiento previo. Las cosechas y el control microbiológico se realizaron siguiendo los pasos indicados anteriormente.

#### TRABAJO DE CAMPO EN CRIADEROS NATURALES

Se seleccionaron 7 criaderos naturales de las localidades de Menocucho y Santa Victoria (distrito de Laredo, Trujillo, La Libertad) (Tabla N°1), 5 fueron tratados con Bti y 2 controles. Durante un mes se determinó la producción larvaria del criadero natural con la ayuda de cucharones de plástico, determinándose algunas características físicas y químicas del criadero, depredadores y densidad larvaria por estadios. Para la determinación de la densidad larvaria se marcaron áreas de muestreo de 1 m<sup>2</sup> cada uno; el número total de áreas evaluadas por criadero varió de acuerdo al tamaño de éste (16, 18 y 28 áreas), siguiendo la secuencia sugerida por Montalván<sup>25</sup>.

**Tabla N°1. Características físicas, químicas y biológicas de los criaderos de *Anopheles* sp. en las localidades de Menocucho y Santa Victoria, distrito de Laredo, provincia de Trujillo**

Nº del Criadero	Localidad	Características biológicas de los criaderos	Características físico-químicas			pH
			Temperatura del agua (°C)	Temperatura Ambiental (°C)	Humedad (%)	
1	Menocucho	Permanente con agua de río y abundante vegetación (algas).	22-27	20-25	46-87	6,5 -7
2	Menocucho	Permanente con agua de río y regular vegetación.	22-27	21-25	46-87	6,5 -7
3	Menocucho	Permanente con agua de río y escasa vegetación.	22-27	19-25	46-88	6,5 -7
4	Menocucho	Temporal con agua de río y regular vegetación.	22-27	22-25	47-87	6,5 -7
5 y 7	Santa Victoria	Permanente con agua de río y abundante vegetación (verdolaga).	23-27	19-25	46-88	6,5 -7
6	Menocucho	Permanente con agua de río y regular vegetación.	22-27	20-25	47-87	6,5 -7

La flora presente dentro de los criaderos estuvo conformada por algas del género *Genphosfaeria* sp., *Pediastrum* sp., *Cladophora* sp., *Lyngbya* sp., *Gomphonomo* sp., *Cosmarium* sp. y *Ormotocercus* sp., así como flora acuática de la especie *Portulaca oleracea*. En tanto que la flora alrededor de los criaderos fue: *Convolvulus avuensis*, *Verbena littoralis*, *Conmelina fasciculata*, *Tessaria integrifolia*, *Arundo donax* y *Cyperus corymbosus*. La fauna asociada en los criaderos y testigos estuvo dado por invertebrados acuáticos como moluscos, malacostráceos, copépodos (*Eucyclos* sp.), *Belastoma* sp., *Hidrometra* sp., *Notonecta* sp., *Gerris* sp., *Libelula* sp., *Brachionus* sp., *Euchlanis* sp. y peces del los géneros *Lebiasina* sp. y *Poecilia* sp.

Se aplicó una dosis de 1 mL/m<sup>2</sup> del Bti producido en el M<sub>1</sub>, a una concentración de 1,0x10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> esp/mL (concentración determinada en los bioensayos realizados en el laboratorio). Se realizó la aplicación de Bti en los criaderos centinelas cada 7 días durante tres semanas consecutivas. Las aplicaciones se realizaron a las primeras horas del día, considerando las especificaciones técnicas de los factores que influyen en la actividad biológica del Bti, tales como rayos solares (ultravioleta), calidad, temperatura y agua, vientos y el desplazamiento del aplicador en el criadero, el cual fue mantenido con la boquilla en posición horizontal a la superficie acuática.

Después de la aplicación de Bti, los criaderos tratados y controles fueron evaluados para determinar la densidad larvaria después de 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas de exposición. Asimismo, se determinó la recuperación de la densidad, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación larvaria} = \text{TL post aplic.} / \text{TL pre aplic.} \times 100$$

TL post-aplic.: N° total de larvas vivas después de la aplicación.  
TL pre-aplic.: N° total de larvas vivas antes de la aplicación.

**ANÁLISIS DE DATOS**

Se utilizó el test chi cuadrado o el test exacto de Fischer, según correspondiera, para la comparación de los porcentajes, y el análisis de varianza para la comparación de los promedios. Se consideró estadísticamente significativo un p<0,05. Se utilizó el programa estadístico SPSS 9,0 para la elaboración de la base y el procesamiento de los datos.

**RESULTADOS**

Se encontró que el medio de cultivo M<sub>1</sub> presentó en promedio la menor LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> (Tabla N°2). El M<sub>1</sub> empleó menos tiempo que M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> para ejercer efecto larvicida. No se encontraron diferencias significativas entre el M<sub>1</sub> y el TPH (medio estándar) en cuanto a LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>, LT<sub>50</sub> y LT<sub>90</sub> (Tabla N°3).

**Tabla N°2. Valores de la infectividad (LC<sub>50</sub>) y virulencia (LT<sub>50</sub>) del Bti producido en tres medios de infusión de *Asparagus officinalis* «espárrago» y medio estándar (TPH)**

Medio	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (esp/mL)	LC <sub>90</sub> <sup>b</sup> (esp/mL)	LT <sub>50</sub> <sup>c</sup> (horas)	LT <sub>90</sub> <sup>d</sup> (horas)
I	24913	178562	5	7
II	1062845	3188535	12	20
III	138843	667934	6	9
TPH	20923	48717	2	4

- a: Concentración letal que produce la mortalidad del 50% de la población en estudio
- b: Concentración letal que produce la mortalidad del 90% de la población en estudio
- c: Tiempo que produce la mortalidad del 50% de la población en estudio
- d: Tiempo que produce la mortalidad del 90% de la población en estudio

**Tabla N°3. Prueba de comparación de medias para determinar las diferencias entre los valores de la infectividad (LC<sub>50</sub>) y virulencia (LT<sub>50</sub>) del Bti producido en tres medios de infusión de *Asparagus officinalis* «espárrago» y medio estándar (TPH)**

Medio	II	III	I	TPH
Lc <sub>50</sub>	1062845	138843	24913	20923
Lc <sub>90</sub>	3188535	667934	178562	48717
LT <sub>50</sub>	12	6	5	2
LT <sub>90</sub>	20	9	7	4

La concentración óptima en los bioensayos del larvicida Bti fue  $6,7 \times 10^5$  esp/mL, producido en el  $M_1$  a las 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas (Tabla N°4). Se observó que después de la primera aplicación, el porcentaje de mortalidad fue mayor al 55% a las 2 horas post-aplicación en los criaderos 1-4, pero el efecto disminuyó considerablemente después de las 24 h en los criaderos 2, 3 y 4, siendo entre 20% y 60% a las 72 horas y manteniéndose durante 72 horas en el criadero 1 mayor al 80% (Figura N°1). Luego de la segunda aplicación, la mortalidad fue mayor al 50% en los criaderos 1-4 a las 4 horas, y el efecto disminuyó luego de las 24 horas en los criaderos 3 y 4 hasta menos del 50% a las 72 horas, manteniéndose constante en los criaderos 1 y 2

durante las 72 horas, con un valor mayor al 65% (Figura N°2). Después de la tercera aplicación, la mortalidad fue mayor al 55% a las 2 horas, superando el 90% a las 24 horas y disminuyendo a menos del 70% en los criaderos 3 y 4, y persistiendo en los criaderos 1 y 2 con un valor mayor al 80% a las 72 horas (Figura N°3). El criadero 5 luego de 8 horas de la primera, segunda y tercera aplicación presentó una mortalidad mayor al 80% (Figuras N°4-6). En los criaderos donde disminuyó la mortalidad antes de las 72 horas (criaderos 2, 3 y 4), el efecto del Bti disminuyó luego de las 24 horas de la aplicación (Figuras N°1-3). Es en estos criaderos que la recuperación larvaria se manifestó después de las 48 horas de aplicación (Tabla N°5).

**Tabla N°4. Porcentaje de mortalidad de larvas del III estadio de *Anopheles* sp. en los bioensayos, utilizando *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis*, producido en infusión de espárrago ( $M_1$ ).**

Concentración Biolarvicida esp/mL	Porcentaje de mortalidad					
	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
6700,00	0	8	0	88	96	100
16829,63	0	12	76	92	92	100
42274,14	0	32	88	100	0	0
106187,84	0	36	92	100	0	0
266731,80	0	84	100	0	0	0
670000,00	32	100	0	0	0	0
Testigo	0	0	0	0	0	0

h: horas

**Tabla N°5. Porcentaje de recuperación larvaria de *Anopheles* sp. frente a *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis* producido en *Asparagus officinalis* durante tres aplicaciones en el distrito de Laredo, Trujillo-La Libertad, Diciembre 2000.**

Aplicación	Criadero	Densidad inicial	Recuperación larval <sup>a</sup> (%)	
			48 horas	72 horas
1 era	1	468	0	0
	2	239	14	35
	3	670	26,9	47,6
	4	502	56,9	77,3
	5	459	6,8	7,4
	6	216		
	7	381		
2 da	1	371	0	0
	2	295	22,4	30,8
	3	223	65	93
	4	1012	47	50
	5	108	0	0
	6	303		
	7	450		
3 era	1	128	30,2	32,5
	2	274	15,7	18,3
	3	244	37,7	40,6
	4	774	13,3	14,3
	5	106	0	0
	6	461		
	7	610		

a: antes de la aplicación del Bti  
6 y 7: criaderos controles de cada localidad

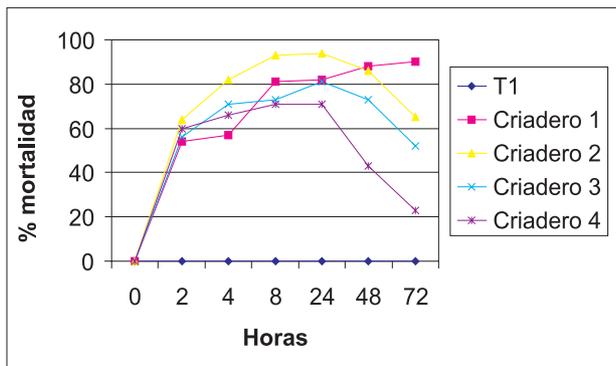


Figura N°1. Porcentaje de mortalidad larvica de *Anopheles sp.* en cuatro criaderos tratados con Bti cultivado en *Asparagus officinalis* vs. criadero testigo (T1). Primera aplicación.

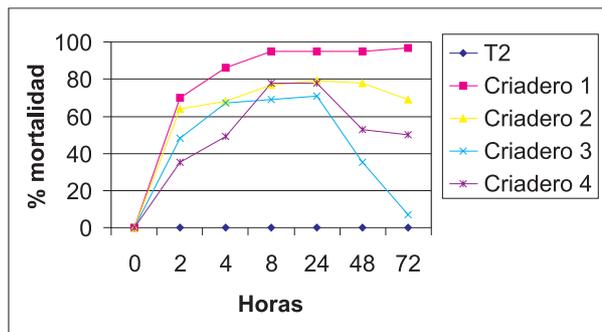


Figura N°2. Porcentaje de mortalidad larvica de *Anopheles sp.* en cuatro criaderos tratados con Bti cultivado en *Asparagus officinalis* vs. criadero testigo (T2). Segunda aplicación.

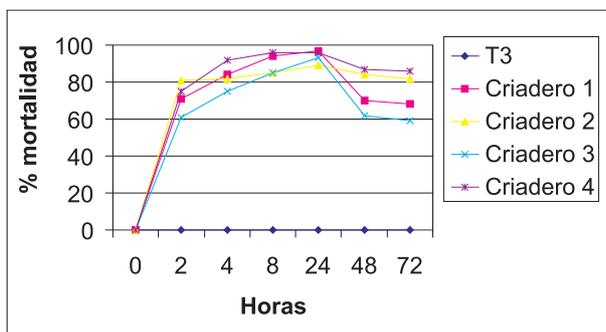


Figura N°3. Porcentaje de mortalidad larvica de *Anopheles sp.* en cuatro criaderos tratados con Bti cultivado en *Asparagus officinalis* vs. criadero testigo (T3). Tercera aplicación.

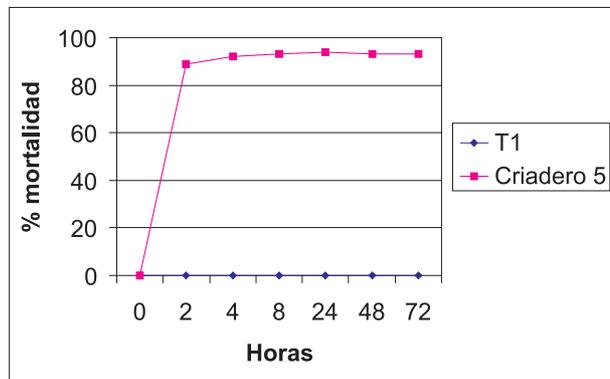


Figura N°4. Porcentaje de mortalidad larvica de *Anopheles sp.* en un criadero tratado con Bti cultivado en *Asparagus officinalis* vs. criadero testigo (T1). Primera aplicación.

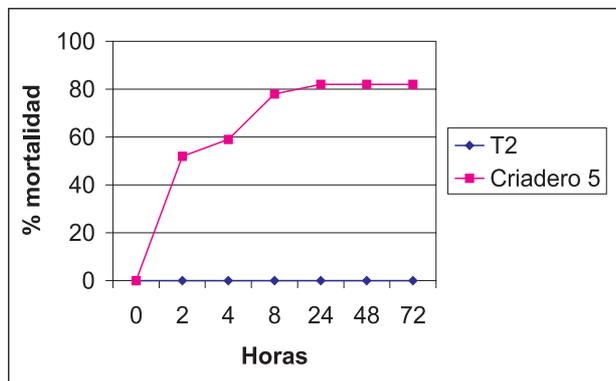


Figura N°5. Porcentaje de mortalidad larvica de *Anopheles sp.* en un criadero tratado con Bti cultivado en *Asparagus officinalis* vs. criadero testigo (T2). Segunda aplicación.

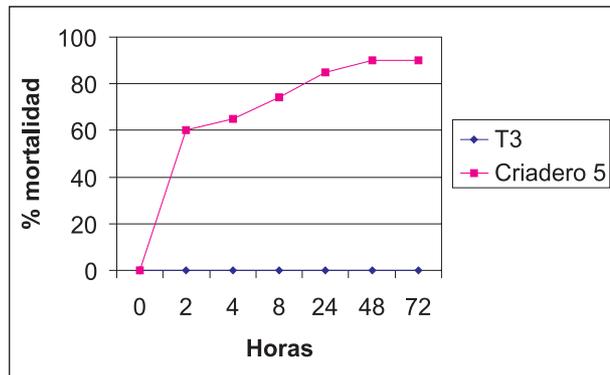


Figura N°6. Porcentaje de mortalidad larvica de *Anopheles sp.* en un criadero tratado con Bti cultivado en *Asparagus officinalis* vs. criadero testigo (T3). Tercera aplicación.

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el medio de cultivo M<sub>1</sub> es óptimo para el desarrollo y producción masiva de *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis* (Tabla N°1). Su acción tóxica sobre las larvas de *Anopheles* sp. y su efecto larvicida es muy similar al medio comercial TPH, demostrado por la similitud de los valores de LC<sub>50</sub> y LT<sub>50</sub>, indicando que el medio con espárrago presenta los requerimientos nutricionales y sales minerales necesarios para el desarrollo de esta bacteria.

Estudios previos demostraron buenos resultados en el cultivo y acción tóxica del Bti, utilizando como medios de cultivo agua de coco y extracto de endospermo<sup>18</sup>. Igualmente, utilizando coco entero e infusión de yuca para la producción de la bacteria, se obtuvieron resultados similares a los de Barjac, considerado un medio estándar<sup>19,21</sup>.

La aplicación de Bti H-14 var *israelensis* puede reducir la población de larvas de *Anopheles* sp en criaderos naturales. El medio de cultivo utilizado en nuestro estudio puede abaratar los costos para su producción y, por lo tanto, desempeñar un papel significativo en los programas de control de malaria en distintas regiones productoras de espárragos. La efectividad del Bti sobre la mortalidad de larvas de III estadio de *Anopheles* sp ejercida a concentración de 6,7x10<sup>5</sup> fue 100% a las cuatro horas de exposición (en las tres repeticiones realizadas). Este hallazgo demuestra que la concentración del Bti obtenido en el M<sub>1</sub> es óptima para la producción del Bti en condiciones de laboratorio.

Concordando con los resultados obtenidos por otros investigadores<sup>26</sup>, quienes demostraron un alto efecto larvicida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis* en criaderos de *Anopheles albimanus*, con efectividad del 100% a las 48 horas de exposición al Bti, nuestros resultados demuestran un alto porcentaje de mortalidad de larvas de *Anopheles* sp a las 24 horas de exposición a aplicaciones del Bti en los criaderos naturales.

La variación del porcentaje de mortalidad de larvas de *Anopheles* sp entre la primera, segunda y tercera aplicación, podría deberse a la existencia de factores que influyen sobre la actividad del Bti y la fisiología de las larvas, tales como la temperatura (a mayor temperatura, mayor actividad metabólica). Esto nos podría sugerir que las larvas se alimentaron con el cristal y esporas del Bti antes de ser afectado por los rayos solares. Estudios realizados con esta bacteria demuestran que se desactivan después de 24 horas de exposición solar, mostrando que las radiaciones ultravioleta podrían tener un efecto perjudicial<sup>14</sup>. Debido a que las larvas de *Anopheles* sp. se alimentan exclusivamente de partículas que se encuentran en la superficie de los criaderos<sup>27</sup>, es posible que la sedimentación haya jugado un papel importante en la variación del efecto larvicida, ya que puede impedir que el compuesto activo se encuentre disponible. Según estudios realizados en cuatro formulaciones del Bti, se encontró que el ingrediente activo sedimenta rápidamente en un periodo de 48 horas<sup>14</sup>.

Al evaluar la efectividad de la producción de Bti cultivado en espárrago sobre las larvas de *Anopheles* sp. en con-

diciones de campo, se pudo observar que en las primeras horas de evaluación se presentó una elevada mortalidad y que esta empezó dentro de las dos horas de la aplicación del biolarvicida, en relación directa con el tiempo de exposición del Bti. Esto implica una mayor probabilidad que las larvas se alimenten con el cristal y esporas del Bti antes de ser afectado por los rayos solares o sedimentado. Otros factores que podrían intervenir en la disponibilidad de los cristales del Bti en condiciones de campo, son la presencia de animales menores dentro de los criaderos y el factor climático (lluvias).

Luego de las aplicaciones se observó una mayor mortalidad de los primeros estadios larvales, debido a una mayor susceptibilidad a la acción tóxica del Bti. Por el contrario, las larvas del IV estadio, que disminuyen su alimentación por estar próximas a empupar, necesitan mayor tiempo para ingerir la cantidad suficiente que les ocasione la muerte.

La recuperación de la densidad larvaria se observó a las 48 horas después de la aplicación en los criaderos 2, 3 y 4, no así en los criaderos 1 y 5. En estos dos últimos, se pudo observar que el Bti permanece hasta las 72 horas, es decir, en estos criaderos el efecto residual es mayor que en los anteriores. Este hallazgo es probablemente debido al tipo de flora existente. El criadero 1 presentó una abundante cantidad de algas que cubría la mayor parte del área del criadero y que pudieron servir como soporte para la permanencia del Bti. De manera similar, el criadero 5 presentó abundante vegetación flotante, representada por verdolaga<sup>14</sup>. Por otro lado, la recuperación larvaria ocurrida a las 48 horas en los criaderos 2, 3 y 4, podría deberse a la abundante materia orgánica existente en ellos, que pudo haber inactivado la acción tóxica del Bti<sup>14</sup>. Asimismo, la presencia de depredadores y competencia biológica de los organismos en estos criaderos, pudieron haber afectado la disponibilidad del biolarvicida.

Durante muchos años, el temephos (organofosforado) demostró ser un excelente larvicida, de bajo costo y con acción rápida para controlar la malaria. La aparición de casos de resistencia<sup>28</sup>, la contaminación del ambiente, la muerte de algunos insectos benéficos para la agricultura y la potencial toxicidad en seres humanos, obligó a buscar otros productos. Referente a la seguridad del ecosistema, nuestro estudio sugiere que el Bti cultivado en medio espárrago constituye una alternativa segura, efectiva y de bajo costo para el control de la malaria, que puede reemplazar el uso de organofosforados o disminuir su uso, al combinar ambos métodos. Al realizar las tres aplicaciones semanales de Bti en los criaderos centinelas, caracterizados por ser charcos grandes con agua permanente tipo laguna, típicos para la aplicación de Bti en las localidades de Menocuho y Santa Victoria, se observó que no existió efecto dañino sobre peces, anfibios, flora y demás fauna.

En conclusión, el *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis*, cultivado en medio infusión de espárrago, produce una alta concentración de esporas y cristales con actividad larvicida frente a *Anopheles* sp., tanto en

condiciones de laboratorio como en criaderos naturales de Laredo, La Libertad - Perú, reduciendo significativamente la población de *Anopheles*, por lo que se constituye en una alternativa razonable para el control de vectores de malaria en áreas donde se cultiva espárrago. Sin embargo, hay que considerar el efecto de las variables físico-químicas y ambientales en el trabajo de campo, debido a que influyen sobre su actividad larvívora.

## REFERENCIAS

- Priest FG.** Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 357-69.
- Organización Mundial de la Salud.** Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. 15vo Informe del Comité de Expertos de la OMS en biología de vectores y lucha antivectorial. Ginebra: OMS; 1992. 784 (Serie Informes Técnicos N°818).
- Ministerio de Salud.** Bases para el análisis de la situación del salud, Perú - 1999. Boletín de la Oficina General de Epidemiología. Lima: MINSA; 1999.
- Calderón G.** Densidad y distribución de los anofelinos del Perú. (Tesis doctoral). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 1976.
- Botero D.** Parasitosis humana. 2ª ed. Bogotá: Edit. Bogotá. Corporación para investigaciones biológicas; 1992.
- Fleming G.** Biología y ecología de los vectores de malaria de las Américas. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1986.
- Jian L, Wal Y, Thirumaran T, Porter A.** Efficient synthesis of mosquitocidal toxins in *asticcacaulis excentricus* demonstrates potential of gram negative bacteria in mosquito control. *Nature Biotechnology* 1996; 14: 343-7.
- Koldenkova L, García L, Garcés J, Gonzáles R.** Capacidad depredadora del pez larvívoro *Poecilia reticulata* (Peters, 1985). *Cyprinodontiformis: Poeciliidae* en un criadero natural de *Culex quinquefasciatus* say, 1923. *Rev Cub Med Trop* 1988; 40(1): 21-6.
- Davinson E.** A review of the pathology of bacilli infecting mosquitoes including an ultraestructural study of larvae for *Bacillus sphaericus*, 1593. *Dev Ind Microbiol* 1981; 22: 69-81.
- Mulla M, Federice A, Darwazen A.** Larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against stagnant water mosquitoes and its effects on nontarget, organisms. *Environ Entomol* 1982; 11: 788-95.
- Ministerio de Salud.** Informe ejecutivo proyectado al 31-12-98. Trujillo: MINSA, 1998.
- Ortiz A, Braso A, Quintero R.** Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de Morelos. *Revista de la Universidad Ciencia y Tecnología* 1992; 3: 45-9.
- Robles E.** Optimización de la producción de bioinsecticida por *Bacillus thuringiensis* (Tesis para optar el Grado de Maestro). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 1996.
- Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud.** Información técnica sobre el agente de control biológico *Bacillus thuringiensis* SH-14 de Barjac. México; 1984.
- Restrepo N, Gutiérrez D, Patirio M, They I, Delechuse A, Orduz S.** Cloning expression and toxicity of a mosquitocidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* sub sp. Medellín. Instituto Oswaldo Cruz 1997; 92(2): 125-8.
- Federici A.** Site of action of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in mosquito and blackfly larvae. In: Basic biology of microbial larvicides of vector of human diseases. Special program for research and training in tropical diseases. Geneva, Switzerland: UNDP/WORLD BANK/WHO; 1982. p. 37-47.
- Ventosilla P, Ruiz C, Guerra H, Marín D, Columbus I.** Producción piloto usando cocos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para el control biológico de *Anopheles* en áreas endémicas de malaria en el Perú. *Rev Med Exp (2da época)* 1997; XIV(2): 61.
- Chilcott C, Pillai BS.** The use of coconut wastes for the production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Department of Microbiology, University of Otago; 1985.
- Merello J, Ventosilla P, Chauca J, Guerra H, Infante B, Pérez E.** Coconut and yuca agars to produce *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. 65 Annual Meeting of the AMCA and the 87 Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Control Association, Inc. March 12-16. Atlantic City NJ; 2000.
- Oficina General de Epidemiología.** Vigilancia Epidemiológica. Boletín informativo semana epidemiológica 51. (Fecha de acceso: noviembre 2000). URL disponible en: [www.oge.sld.pe/bol/boletines/index.htm](http://www.oge.sld.pe/bol/boletines/index.htm); 2000.
- Zerpa N, Moreno J, González J, Novoa O.** Colonization and laboratory maintenance of *Anopheles albimanus*. Wiedemann in Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998; 40(3): 173-6.
- Vandekar M, Dulmage H.** Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Edit. UNDP/WORLD BANK/WHO. Special programme for research and training in tropical diseases 1982. Geneva: WHO. p. 51-9.
- Roberts EA, Coote GG.** Estimation of concentration from dilution counts. *Biometrics* 1965; 21: 600-15.
- Hadad M.** Análise de probites. En: Controle microbiano de insetos. Edit. Manole; 1986.
- Montalván-Santillán E.** *Bacillus thuringiensis* para controlar mosquitos culícidos en Sullana, Piura - 1987. *Rev Per Entomol* 1990; 32: 103-9.
- Montero G, Espino R, García I, Díaz M.** Efectividad del *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* SH-14 en criaderos de *Anopheles albimanus* en las condiciones naturales de Cuba. *Rev Cub Hig Epidemiol* 1986; 24(2): 165-71.
- Klowden M, Held G, Bulla L.** Toxicity of *Bacillus thuringiensis* sub sp. *israelensis* to adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiol* 1983; 46 (2): 312-5.
- Moquillaza J.** Tratamiento focal con larvicidas en los criaderos de *Aedes aegypti*. En: Curso macro-regional: entomología básica: uso de plaguicidas en salud pública y control vectorial integrado en malaria y OEM. Convenio MINSA-Comunidad Europea. Lima: MINSA; 1998.