

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Mortalidad producida por cepas de *Bacillus spp.* y
Bacillus sphaericus 2362 en larvas de *Anopheles
pseudopunctipennis*. Huanta – Huamanga.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Presentado por:
Bach. CUNDIA ALARCÓN, ORLANDO EDWIN

Ayacucho - Perú

2009

A ti Dios; a Marinita, mi mamá; Kelly y
Edwin por ser la razón de mi superación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por acogerme en su seno en donde aprendí e instruí para mi desenvolvimiento profesional.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de quienes aprendí a ver que la biología es más que una profesión. Es el arte de hacer ciencia e investigación.

Al glorioso colegio nacional de Ciencias del Cusco, en cuyas aulas me eduqué.

A mis asesores, Biólogos: Sonia Palomino Felices, Yuri Ayala Sulca y Hernán Vargas Cuba por ser tan pacientes y ayudarme a culminar mi trabajo.

A los Biólogos Fidel Mujica, Carlos Carrasco, Paula García Godos, Gilmar Peña, José Alarcón, Luis Vargas, Eduardo García Godos, Teresa Naveros y Silvia Berrospi especialmente por sus conocimientos, consejos y apoyo en mi trabajo.

A la Blga. Dra. Elizabeth Nuñez Sacarías y Blgo Dr. Abad Flores Paucarima por su apoyo bibliográfico, consejos y apoyo desinteresado a mi trabajo.

A mis abuelitos Agustín y Encarnación y a mis tíos Carlos, Flora, Ruth, Wilfredo y Edwin, por ayudarme a acabar mi carrera profesional. Y a toda mi familia materna Alarcón y Laura, por quien siento mucho orgullo.

ÍNDICE	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	04
2.1. Generalidades	04
2.2. Antecedentes generales	05
2.2.1. El vector principal de malaria en el Perú	05
2.2.1.1. Generalidades	05
2.2.1.2.- Taxonomía	06
2.2.1.3. Biología	06
2.2.1.4. Distribución e importancia de la especie	07
2.2.1.5. Principales formas de control	09
a. Control químico	09
b. Control biológico	11
b.1. Insecticidas biológicos	11
2.2.2. El biolarvicida específico <i>Bacillus sphaericus</i>	12
2.2.2.1. Taxonomía de <i>Bacillus sphaericus</i>	13
2.2.2.2. Patogenicidad de la bacteria	14
2.2.2.3. Efectos de <i>Bacillus sphaericus</i> sobre mosquitos	16
2.2.2.4. Efectos de GRISELESF® sobre larvas de mosquitos	16
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Toma de muestras	18
3.2. Aislamiento e identificación microscópica	18
3.3. Identificación bioquímica y tipificación	19
3.4. Identificación de criaderos y obtención de la población larvaria	20
3.5. Mantenimiento de larvas en laboratorio	21
3.6. Obtención de las especies vectoras	21
3.7. Preparación y cuantificación del inóculo	21
3.8. Bioensayos de patogenicidad en laboratorio	22
3.9. Análisis de entomotoxicidad	23
3.10. Análisis estadístico	23
3.11. Recuperación de entomopatógenos	23
IV.- RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	44
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
Anexos	66

Mortalidad producida por cepas de *Bacillus spp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 en larvas de *Anopheles pseudopunctipennis*. Huanta – Huamanga.

Autor : Bach. Cundia Alarcón, Orlando Edwin

Asesores : Bigo. Ayala, Yuri; Biga. Palomino, Sonia; Bigo. Vargas, F. Hernán

RESUMEN.

El presente trabajo básico-experimental, tubo por objetivos: Aislar *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 a partir de muestras de suelo, agua y un producto comercial; y evaluar el efecto patógeno de la cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de anofelinos. Por ello se obtuvo 03 cepas provenientes de muestras de suelo, tipificándolas para el trabajo como: *Bacillus sp.* Ayacucho 1, 2 y 3 (Bsp A1, Bsp A2 y Bsp A3) y 01 cepa patrón de *Bacillus sphaericus* 2362 (Bs(+)), aislado del producto biológico GRISILESF. Por ello se probó la actividad patogénica de las bacterias con soluciones de 10 mL, tituladas con $1,5 \times 10^{11}$ y $3,5 \times 10^{11}$ esporas/mL sobre larvas II y III de *Anopheles pseudopunctipennis*, en vasos con agua destilada y agua de criadero. La población larvaria recolectada de criaderos de las localidades de Viru Viru (Huanta-Ayacucho) y Silco (Angaraes-Huancavelica)-orillas del Río Cachi, se mantuvieron entre 26° a 30°C con 87% de humedad relativa. Se Comprobó que las larvas II y III de *Anopheles pseudopunctipennis* son susceptibles al efecto biocida de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 horas post aplicación. En agua destilada con $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bs(+) produjo 99% de mortalidad de larvas II y con $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bsp A2 produjo el 99% de larvas II muertas seguida por Bsp A1 con 88%; Bsp A3 con 84% y Bs(+) con 71% de larvas II muertas. Pero en agua de criadero, a una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bsp A1 produjo el 99% de muertes de larvas II, Bsp A2 93% y Bsp A3 80%. Pero a $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL Bsp A1 produce 87% de muertes de larvas II y Bs(+) 76%. Los resultados obtenidos indican que las cepas ayacuchanas actuaron mejor que la cepa patrón y presentan un gran potencial de aplicación, bioinsecticida y de persistencia en el ambiente. Además de ello reportamos oficialmente que se encontró insectos himenopteros y coleopteros que actuaron como predadores de larvas de anofelinos tanto en el campo como en laboratorio.

Palabras clave: Mortalidad, *Anopheles pseudopunctipennis*, larva muerta, *Bacillus spp.*, *Bacillus sphaericus* 2362, agua de criadero.

Mortality produced for strains of *Bacillus spp.* and *Bacillus sphaericus* 2362 on larvae *Anopheles pseudopunctipennis*. Huanta – Huamanga.

ABSTRACT

The present basic - experimental work pipe for aims: To isolate *Bacillus sp.* and *Bacillus sphaericus* 2362 from samples of soil, water and a commercial product; and to evaluate the pathogenic effect of the bacterial strains of *Bacillus sp.* and *Bacillus sphaericus* 2362 in the control of larvae of anopheles. By it were obtained 03 strain from samples of ground, typifying them for the work as: *Bacillus sp.* Ayacucho 1, 2 and 3 (Bsp A1, Bsp A2 and Bsp A3) and 01 strain control of *Bacillus sphaericus* 2362 (Bs (+)), isolated of the biological product GRISILESF. The pathogenic activity of the bacteria was tried by solutions of 10 ml, tested with 1.5×10^{11} and 3.5×10^{11} espores/ml on larva the 2nd and 3rd instar of *Anopheles pseudopunctipennis*, in glasses by distilled water and water of hatchery. The larval population gathered of hatchery of Viru Viru's localities (Huanta-Ayacucho) and Sillco (Angaraes-Huancavelica) –bank of Cachi river, they supported among 26 ° C to 30 ° C with 87 % of relative humidity. There was verified that the larva 2nd and 3rd instar of *Anopheles pseudopunctipennis* are touchy to the effect pathogenic of *Bacillus sp.* and *Bacillus sphaericus* 2362 at 48 hours post application. And, in distilled water with 1.5×10^{11} esp/ml the strain Bs (+) that produced 99 % of mortality of larva the 2nd instar. To a concentration of 3.5×10^{11} esp/ml the strain Bsp A2 produced 99 % of larva the 2nd dead the followed by the strain Bsp A1 with 88 %; Bsp A3 with 84 % and Bs (+) with 71 % of larvae the dead 2nd. Whereas in water of hatchery to the concentration of 3.5×10^{11} esp/ml the strain Bsp A1 was obtained 99 % of deaths of larva the 2nd, Bsp A2 93 % and Bsp A3 80 %. But to 1.5×10^{11} esp/ml Bsp A1 produces 87 % of deaths of larva the 2nd and Bs(+) 76 %.The obtained results indicate that the strain of Ayacucho acted better than the control strain and present a great potential of application, bioinsecide and of persistence in the environment. Besides it we report officially that was been instar's of himenoptera and coleopterous that acted as predators of larva of *Anopheles* both in the field and in laboratory.

Key words: Mortality, *Anopheles pseudopunctipennis*, dead larvae, *Bacillus spp.*, *Bacillus sphaericus* 2362, water of hatchery.

I. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de nuevos formulados químicos supuso un cambio importante en el control de plagas por tratarse de un método rápido y drástico de eliminación, lo que en un principio fue considerado como positivo, ha dado como resultado la dependencia total de estos plaguicidas por el hombre, afectando distintas especies animales que ocupan el entorno de aplicación e incluso al ser humano (López, 2000).

En los últimos 40 años, el uso inadecuado y la resistencia a plaguicidas ha sido, y sigue siendo, el problema técnico más importante que afrontan los programas de lucha contra plagas y vectores en la agricultura, medicina veterinaria y la salud pública (Georghiu, 1986). Además, el encarecimiento de los nuevos tipos de insecticidas químicos, ponen de manifiesto que la lucha antivectorial ya no puede basarse exclusivamente en productos químicos (OMS, 1976).

Para resolver problemas de la lucha antivectorial, un comité de expertos en biología de vectores y lucha antivectorial de la OMS, propuso técnicas, referidas a la lucha biológica, utilizando peces larvívoros y organismos patógenos como: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* y otros. Esto involucra la manipulación del sistema de regulación natural, en beneficio del hombre (OMS, 1982).

Por otro lado el mosquito *Anopheles sp.*, es responsable en el mundo de transmitir la malaria producida por *Plasmodium sp.*, causando problemas de

salud pública en muchas naciones (Harwood, 1993). *Anopheles pseudopunctipennis* por su parte tiene mayor presencia en casi todos los departamentos del Perú y es responsable de la transmisión de la malaria por *Plasmodium vivax*, impidiendo el desempeño socio-económico de la población peruana (Calderón y colaboradores, 1995).

Este vector ha sufrido constantemente intervención mediante programas de erradicación de malaria, llegando a presentar menos del 95% de mortalidad de mosquitos adultos, frente a los insecticidas piretroides utilizados (INS, 2002).

Frente a esto, el control microbiano ha despertado un creciente interés como método alternativo para el control de insectos plaga. Pero el gran problema es sin duda "educar" al consumidor final de estos bioproductos comerciales para su adquisición. *Bacillus sphaericus*, una especie bacteriana que es específicamente patógena del género *Anopheles* es utilizada para el control de larvas y adultos (Lecuona, 1995); además de ser importante junto a *Bacillus thuringiensis* en el control de vectores de enfermedades (OMS, 1982). *Bacillus sphaericus* puede reciclarse en ambientes acuáticos, lo que prolonga su efecto larvicida (Lecuona, 1995); se le encuentra en aguas estancadas y contaminadas, reproduciéndose en cadáveres de insectos muertos, manteniéndose viable y tóxico, hasta por 3 años (Weinzierl y colaboradores, 1981).

En el Perú existen pocos bioensayos con bacterias entomopatógenas, especialmente con *Bacillus sphaericus* y son escasos los datos sobre ensayos realizados con cepas nativas; esto sumado a las pocas publicaciones realizadas sobre el tema.

Flores y colaboradores (1998), probó cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* frente a larvas de *Anopheles sp.*, obteniendo resultados alentadores.

El presente trabajo se espera que sea de utilidad para futuros trabajos relacionados al control de vectores biológicos y el control biológico en general y

II MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES

El hombre ha transformado progresivamente el medio ambiente y los ecosistemas primitivos, representados por amplias superficies boscosas; para esto ha utilizado técnicas y métodos de explotación buscando la uniformidad y simplificación de las mismas. Esta evolución planteó importantes modificaciones del entorno, con trascendencia sobre la dinámica de las especies de animales que viven cerca del hombre, produciendo una ruptura del equilibrio ecológico primitivo en el que el sistema presa-depredador era capaz de mantener situaciones de estabilidad respecto a las especies indeseables para el hombre (Frutos, 1994), planteándose así el término "plaga" que es cualquier especie animal que el hombre considera perjudicial a su persona, a su propiedad o al medio ambiente (Cisneros, 1995).

La Organización Mundial de la Salud en 1988, planteo que "plagas urbanas" son aquellas especies implicadas en la transferencia de enfermedades infecciosas y el daño o deterioro a las políticas de salud pública, higiene y saneamiento medio ambiental. Este efecto se combate con tareas de identificación y actuación sobre aquellas especies que pueden desencadenar enfermedades y molestias a las personas, y deterioro de instalaciones de uso colectivo (Frutos, 1994).

La malaria es una enfermedad infecciosa re-emergente en el mundo y el Perú no ha sido ajeno a este fenómeno. Según la OMS, hubo un incremento sostenido de los casos, llegando a sumar 240 000 en 1998 (INS, 2002).

Esta es una enfermedad mundial que sucede en nichos ecológicos desde casi el nivel del mar hasta los 2750 m.s.n.m. ocasionando estragos en la salud de colonizadores de nuevas tierras de cultivo, en los trópicos (Vargas, 2001).

La malaria causada por *Plasmodium vivax*, es reportada en Ayacucho desde los años 60 en el valle del río Apurímac, y en los valles interandinos del sur de San Miguel y Huanta. Entre los años 1999 y 2000 se determinó áreas de riesgo de transmisión en 29 localidades infestadas por *Anopheles pseudopunctipennis* desde 2 200– 2 400 m.s.n.m. (Vargas, 2001).

La enfermedad sigue existiendo principalmente en zonas rurales de difícil acceso donde el mosquito vector y el parásito muestran resistencia (INS, 2002) (Miranda y Casta 1997), esto indica la necesidad de comprender la ecología del vector y las interrelaciones que son particularmente complejas entre el vector, el patógeno, la víctima humana y los posibles reservorios animales para lo cual ha sido necesario diseñar métodos alternativos de control como genéticos, biológicos y ambientales (Metcalf y Luckmann 1994)

2.2. ANTECEDENTES GENERALES

2.2.1. El vector principal de malaria en el Perú

2.2.1.1 Generalidades

Anopheles pseudopunctipennis Theobald 1901, conocido también como zancudo por tener patas (zancas) largas y delgadas, es un artrópodo de importancia en la medicina (Botero y Restrepo, 1992); y de distribución cosmopolita (Batista, 1998) (Botero y Restrepo, 1992).

Este insecto es considerado como el principal transmisor de malaria que produce *Plasmodium spp.*

Las investigaciones han permitido identificar muchas especies que son especialmente activas al anochecer y al amanecer, adaptándose, algunas, a la vida en las ciudades (Entomo web, 2000).

2.2.1.2 Taxonomía de *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald 1901

Reino	: Animal
Phylum	: Arthropoda
Clase	: Insecta
Orden	: Diptera
Sub orden	: Nematocera
Familia	: Culicidae
Subfamilia	: Anophelinae
Género	: Anopheles
Especie	: pseudopunctipennis.
Nombre científico	: <i>Anopheles pseudopunctipennis</i> , Theobald, 1901
Nombre vulgar	: “zancudo”, “mosquito”, “wanwa”

Fuente: (Harwood, 1992) (Botero y Restrepo, 1992) (Metcalf y Luckmann, 1994) (Vargas, 2003) (Calderon, 1995).

2.2.1.3 Biología

Durante su ciclo biológico, estos mosquitos sufren metamorfosis completa que consiste de los siguientes estados:

Huevos Son colocados individualmente en las orillas de los estanques de agua tranquila y se sostienen gracias a flotadores laterales. Su período de incubación es de 2 a 3 días (Botero y Restrepo, 1992).

Larvas Se desarrollan en dos semanas o más, mudando 4 veces y la última muda resulta en pupa. Estas permanecen horizontalmente suspendidas justo por debajo de la superficie del agua, llevando el alimento a la boca por medio de corrientes producidas por las largas sedas curvadas de la maxila, fluyendo

luego a la faringe por medio de la succión y aquí ocurre el filtrado de sólidos suspendidos. Dependiendo de las condiciones el desarrollo dura entre 8 a 12 días (Botero y Restrepo, 1992) (Vargas, 2003).

Pupas Estas no se alimentan y generalmente duran de 2 a 3 días; son muy sensitivas y activas a molestias en la superficie del agua (Botero y Restrepo, 1992).

Adultos y reproducción El adulto (macho y hembra) se alimenta a base de néctar y fluidos vegetales para el vuelo y funciones metabólicas ordinarias. Las hembras pican y chupan la sangre de mamíferos o aves, utilizando la proteína que contiene para el desarrollo de los ovarios y huevecillos, iniciándose la oviposición después de una semana de la ingestión de la sangre. La copulación se reproduce cuando se forma enjambres crepusculares de machos que emergen primero y esperan la emergencia de las hembras para ser copuladas (Botero y Restrepo, 1992).

Longevidad Los machos permanecen vivos durante no más de una semana y las hembras con abundante alimento pueden vivir de 4 a 5 meses, particularmente bajo condiciones de hibernación (Harwood, 1993).

2.2.1.4 Distribución e importancia de la especie

Se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo Asia y Africa (Batista, 1998) y sus ataques no están limitados a animales homeotermos, ya que también se alimentan de peces, reptiles y anfibios, transmitiendo patógenos a los dos últimos grupos de vertebrados silvestres y domésticos (Harwood, 1993).

En el Perú, gracias a investigaciones realizadas en diferentes zonas de influencia, de la cultura Inka, se sabe que algunas especies de animales fueron conocidas por los antiguos habitantes, debido a las cualidades y enfermedades que producían es por eso que mediante representaciones geomorfos y fitomorfos

se plasmó en una figura estilizada perteneciente a la cultura Inka, lo que demuestra la presencia del género *Anopheles*, desde épocas pre-colombinas (Vargas, 1995) (anexo 39).

Anopheles pseudopunctipennis fue reportado por vez primera en la costa peruana, por Shannon en 1930, hacia la vertiente occidental del valle del rimac y en la vertiente oriental de los Andes en el Río Perené (Junín) (Calderón y colaboradores, 1995).

Entre los años 1953 y 1957 se encontró a esta especie de mosquito en los valles interandinos de la yunga fluvial entre 1500 a 2500 m.s.n.m. comprendiendo su distribución desde el Río Alto Marañón y sus afluentes hasta el Valle del Mantaro, Pampas y Pachachaca (entre Ayacucho y Apurímac) y también distribuido en el área de Rupa Rupa o Selva Alta entre los 300 a 1 500 m.s.n.m. (Calderón y colaboradores, 1995).

En las localidades de Rosario (distrito de Ayna, provincia de La Mar-Ayacucho) que se ubica a 800 m.s.n.m. y en la localidad de Omayá (distrito de Pichari, provincia de la Convención-Cusco) ubicado a 400 m.s.n.m. se determinó la presencia de varios vectores maláricos, entre los que se encuentran especies de mosquitos como: *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles rangeli*, *Anopheles mediopunctatus* y *Anopheles fluminensis*. Estos mosquitos al ser encontrados demostraron que tienen una gran actividad hematofágica, comenzando su actividad, entre las 18:00 y 24:00 horas, hasta las 6:00 horas del día siguiente (Vargas, 1996).

En una investigación realizada en dos zonas del departamento de Ayacucho: la primera en la cuenca del río Apurímac y la segunda en los valles interandinos de Ayacucho; se encontraron distribuidos muchas comunidades y anexos que son susceptibles a la presencia de estos mosquitos vectores de malaria, incluso algunos de estos lugares son habitats naturales, ya que presentan criaderos

permanetes de los estados larvales. Es así que entre 1999 y 2000, se han determinado un total de 6 especies de Anopheles. Por ello se sabe que de los 109 distritos de Ayacucho, se hallan infestados 5, ubicados en el valle del río Apurímac (ceja de selva) y 7 en los valles interandinos de la serranía con el 11% de índice de infestación distrital llegando a la conclusión que *Anopheles pseudopunctipennis* es el principal vector malárico de Ayacucho; a saber (Vargas, 2001):

Tabla N° 01: Principales distritos y valles donde se localiza la especie *Anopheles pseudopunctipennis* reportados en el departamento de Ayacucho en los años 1999 y 2000

PROVINCIA	DISTRITO	VALLE	VECTOR	
			1999	2000
Lucanas	Llauta	Río Llauta	No se investigo	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>
Vilcashuamán	Ayrabamba	Río Pampas	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>
Huamanga	Ocos	Río Pampas	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>
Huanta	Iguain	Río Chihua	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	Sin vigilancia
	Luricocha	Río Cachi	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>
	Huanta	Río Cachi	<i>Anopheles Pseudopunctipennis</i>	Sin vigilancia
La Mar	San Miguel	Río Torobamba	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>
	Anco	Río Apurímac	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>
	Chungui	Río Pampas	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	Sin reporte
		Río Pampas	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>

Fuente: Vargas, 2001

2.2.1.5 Principales formas de control

a) Control químico

La forma de ataque más confiable para combatir los vectores en América sigue siendo el rociamiento intradomiciliario con insecticidas de acción residual. Así, la OPS clasificó al Perú dentro del grupo IV de los países con graves problemas socioeconómicos, políticos, técnicos, administrativos y económicos, lo que le hace propenso a problemas sanitarios (Boletín de la oficina sanitaria

panamericana, 1986). Cabe mencionar que las campañas para erradicar la malaria se iniciaron en 1955 a nivel mundial; pero la resistencia del mosquito vector a insecticidas y del parásito causal de la enfermedad a los antimaláricos; problemas administrativos y logísticos obstaculizaron la campaña que se suspendió a fines de los años setenta (Miranda y Casta, 1997).

El uso continuo de agentes químicos por más de 40 años en contra de los vectores de la malaria ha originado en la naturaleza una elevada contaminación ambiental (Berrocal y colaboradores, 1998) agravando el problema de su utilización. Gran parte de estos insecticidas no son suficientemente selectivos, eliminando junto con la plaga otros insectos útiles que pueden ser sus propios enemigos naturales. Por ello el insecto plaga se ve libre de sus enemigos, multiplicándose sin problemas y con mayor intensidad (López, 2000).

De las pruebas realizadas con insecticidas sobre mosquitos anopheles, aedes y culex se obtuvo un 56.9% de resistencia a dieldrina, seguido del DDT con 48.4%, clorofoxin (38.1%), deltametrina (30.7%), ácido cianhídrico (HCN) (26.5%), propoxur (20%), malatión (18.5%), permetrina (9.7%) y el fenitrolin (8.1%) (Shidrawi, 1992).

En nuestro país se inició el programa de erradicación de malaria con DDT y dieldrin entre 1957 y 1958 concluyéndose que los anofelinos presentaban gran susceptibilidad y con esto, se garantizaba, la erradicación de la malaria (Acosta, 1958).

En 1999, se evaluó 5 insecticidas piretroides en 13 direcciones de salud de la parte norte y oriental del Perú, determinándose que los mosquitos adultos de *Anopheles pseudopunctipennis* son sensibles a la alfacipermetrina en Cajamarca, Lambayeque, Lima (Cañete) y Trujillo; en este último también se registró como sensible a la ciflutrina y lambdacialotrina; para vigilancia con la alfacipermetrina en Cajamarca y Lambayeque; y también con la ciflutrina en

Lima (Cañete); considerándose: sensible 98-100% de muertes, vigilancia 80-97% de muertes y resistencia menos del 80% de muertes (INS, 2002).

En Ayacucho gracias a la intervención periódica del Programa de control de malaria y otras enfermedades metaxénicas (O.E.M.) de la Dirección Regional de Salud – Ayacucho (DIRESA) se realiza periódicamente encuestas de densidad larval en criaderos de larvas y rociamientos con el insecticida químico (Alfar 10 PM) de los laboratorios BAYER, que es un piretroide cuyo ingrediente activo es la alfacipermetrina que actúa por contacto sobre mosquitos adultos de *Anopheles pseudopunctipennis* (Vargas, 2003).

En la actualidad no hay investigaciones sobre la actividad residual del insecticida y mucho menos sobre el desarrollo de resistencia del vector a los insecticidas usados en el departamento de Ayacucho. Además el control de larvas se está efectuando con el larvicida químico Temefhar al 1% que pertenece al grupo de los órgano fosforados (Vargas, 2003).

b) Control biológico por medio de bioinsecticidas

El departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) define al control biológico como “el uso o manejo de enemigos naturales nativos, introducidos o genéticamente modificados (predadores, parásitos, parasitoides y patógenos de plagas) y otros organismos benéficos seleccionados (antagonistas, competidores y alelopáticos) y sus productos para reducir las poblaciones y los efectos de las plagas” (Lecuona, 1995).

b.1. Insecticidas biológicos

Denominados también plaguicidas microbianos están compuestos por bacterias, hongos, virus, protozoarios y nemátodos que presentan mayores posibilidades para emplearlos en el control biológico de plagas (Frutos, 1994) (Lecuona, 1995). La mayor parte de los microorganismos capaces de provocar enfermedades en los insectos no daña a otros animales o a las plantas. Han sido

encontrados más de 1 165 microorganismos relacionados con el control biológico siendo casi todos patógenos. Esto comprende 90 especies y variedades de bacterias, 260 de virus y rickettsias, 460 de hongos, 255 especies de protozoarios y 100 de nemátodos (Rodríguez, 1989).

El control microbiano presenta ventajas por tener especificidad y selectividad para sus respectivos hospederos; posee la capacidad de multiplicación, dispersión y reproducción sobre la población en la que actúa; no tiene efectos secundarios y posee un control más duradero; permite un control asociado y la aplicación de la ingeniería genética; no contamina ni es tóxico y no crea resistencia sobre insectos; además su costo de producción es económico y se puede aplicar de forma artesanal y/o sofisticada (Batista, 1998). Las bacterias y los virus son de fácil manejo por su relativa facilidad de reproducción y por ser menos dependientes de las condiciones ambientales como la humedad, que hacen susceptibles a los hongos (Cisneros, 1995). Las bacterias esporulantes son las más estudiadas, incluyendo bacterias patógenas obligatorias (Lecuona, 1995) (Batista, 1998). Por su capacidad de formar esporas, posee alta persistencia en el ambiente, siendo altamente virulentas, con gran capacidad invasiva y de producción de toxinas. En 1984 los investigadores Kriey y Holt, mencionaron 5 especies de *Bacillus* como patógenos de insectos: *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *Bacillus sphaericus* y *B. thurigiensis* con acción sobre insectos dípteros, lepidópteros y coleópteros (Lecuona, 1995).

En la actualidad, en muchos países, la industria de los bioinsecticidas incluye en sus presentaciones agentes entomopatógenos, agentes entomófagos y compuestos con actividad insecticida derivados de plantas (aceite de neem, *Chrysantemus sp.*, *Tajetes sp.*), metabolitos de actinomicetos (spinosid), al mismo tiempo podemos encontrar proteínas tóxicas e incluso algunos

organismos y plantas transgénicas, que controlan plagas urbanas y agrícolas (Tamez y colaboradores, 2001).

2.2.2. El biolarvicida específico *Bacillus sphaericus*

Bacillus sphaericus (Neide) es una especie aeróbica obligatoria que cuenta con una espora terminal esférica, que le da el nombre específico, y a su vez le produce distensión del esporangio que se sitúa terminalmente y es nítidamente detectada (Batista, 1998) (Lecuona, 1995).

Kellen en 1965 mencionó que ésta es una bacteria capaz de controlar mosquitos; ya había sido descrita en 1904 por Neide, pero su potencial biológico recién fue conocido en 1965. Yousten en 1989 indica que si bien sus propiedades fueron dadas a conocer mucho antes del aislamiento de *Bacillus thuringiensis*, la baja toxicidad de las primeras cepas aisladas desanimó a la comunidad interesada en el control biológico (Lecuona, 1995).

2.2.2.1. Taxonomía de *Bacillus sphaericus* (Neide)

Dominio	: Archaea
Phylum	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Bacillales
Familia	: Bacillaceae
Género	: Bacillus
Especie	: <i>sphaericus</i> .

Fuente: Garrity y colaboradores, 2001

Bacillus sphaericus tiene distribución mundial en ambientes típicamente terrestres y acuáticos, siendo también aislado de larvas muertas que son sus hospederos naturales. Tiene reacción variable a la coloración Gram, siendo inconstante para cada linaje; pero generalmente es Gram positiva, las células vegetativas miden entre 0.6 a 1 μm ., por 1,5 a 5 μm (Batista, 1998).

Esta bacteria presenta serotipos flagelares H1, H2a2b, H3, H5a5b, H6, H25 y H48, gracias a los cuales puede ser factible el análisis más profundo de la misma (Wei-Liu y colaboradores, 1993) (Batista 1998).

En Senegal se aislaron 9 cepas de *Bacillus sphaericus* de varios lugares y muestras de insectos, la caracterización de las cepas se realizó de acuerdo al serotipo "H", composición de cristal y su toxicidad contra *Culex pipens*, *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* (Aidara - Kane y colaboradores, 1998).

El primer microorganismo patogénico fue aislado por Kellen en 1965 (cepa K), de larvas de *Culiseta incidens* en California (USA). Luego en 1973 Singer aisló la estirpe SSII-1 en mosquitos muertos procedentes de la India, designada como 1 000 veces más tóxico que la cepa K (Aidara -Kane y colaboradores, 1998).

El primer microorganismo aislado y luego utilizado en campo fue la estirpe 1593 de Indonesia, luego Wickremesinghe y Mendis en 1980 obtuvieron la cepa 2297 de larvas de mosquitos de Sri Lanka y el microorganismo denominado 2362 obtenido por Weiser en 1984 a partir de adultos de *Simulium sp.*, de Nigeria, fue descrito como de toxicidad elevada (Batista, 1998)

En 1990 De Barjac indicó que el Instituto Pasteur disponía de una colección con 300 estirpes de *Bacillus sphaericus*, de ellos 150 con actividad larvicida; y el Banco de germoplasma microbiano (BGM) del Centro nacional de investigación de recursos genéticos y biotecnología de Brasil en 1995 contaba con 252 cepas de *Bacillus sphaericus*, de éstos, 76 demostraron patogenicidad (Batista, 1998).

En el Perú, se realizó una recolección de muestras de suelo, aguas estancadas, ríos y larvas de insectos, de los departamentos de Ancash, Lima, Trujillo, Junín, Ayacucho, Arequipa, Moquegua y Tacna lográndose aislar 8 presuntas cepas de *Bacillus sphaericus* (Flores y colaboradores, 2000).

En Ayacucho, en el año de 1995, se registró el aislamiento de 2 cepas de *Bacillus sphaericus*, procedentes de muestras de suelo y 1 cepa de muestra de

agua (Prado, 1995). Así mismo, se sabe que *Bacillus sphaericus* tiene muchas ventajas sobre la cepa *Bacillus thuringiensis* por que se mantiene viable en ambientes acuáticos contaminados y se ha comprobado que su actividad larvicida no constituye un peligro para otras especies. Además su gran estabilidad genética y tolerancia a las condiciones de estancamiento aumentan considerablemente el uso de esta bacteria esporógena (Castro y colaboradores, 1999).

2.2.2.2. Patogenicidad de la bacteria

Estudios histopatológicos muestran que las larvas de *Culex pipiens* son infectadas por células bacterianas a nivel del intestino medio. La patogenicidad de *Bacillus sphaericus* se debe a la producción de un cristal tóxico (Batista, 1998), que tiene una estructura enrejada con estriaciones de alrededor de 6.3 nm, también se conoce que el cristal tóxico se forma con más rapidez que el de *Bacillus thuringiensis*. Var. Kurstaki. Los principales componentes del cristal son proteínas de 51 y 42 KDa; y se requiere de ambas para ser tóxicas (Bauman y colaboradores, 1991).

Cuando el complejo espora-cristal es ingerido por la larva, las proteínas son solubilizadas e hidrolizadas por la acción de una peptidasa que convierte la proteína de 42 KDa a una de 39 KDa y la proteína de 51 KDa a una de 43 KDa, sin afectar la toxicidad. Por otro lado, estudios de Oei en 1992 revelan que el extremo amino terminal de la proteína de 51 KDa es responsable del ligamiento al intestino medio, y su extremo carboxi terminal interactúa con la proteína de 42 KDa formando una toxina binaria (Lecuona, 1995). Estas proteínas se unen a un receptor en el intestino medio de *Culex pipiens* mediante la acción de una alfa-amilasa producida por la larva (Darboux y colaboradores, 2001) (Nielsen-Leroux y colaboradores 2002).

Las toxinas binarias y componentes individuales permeabilizan un receptor libre

de vesículas unilaminares fosfolipídicas largas (VUL) y una bicapa lipídica planar (BLP), por un mecanismo de formación de poros con grandes aberturas y largos canales; esta permeabilidad se logra con un pH alcalino y la presencia de ácidos grasos (Schwartz y colaboradores, 2001) que rompen las membranas de las células epiteliales del mesenterón hacia la hemolinfa, subiendo el pH y paralizando a las larvas (Bauman y colaboradores, 1991). Luego de 2 a 5 horas después de la ingestión del cristal o protoxina las células presentan vacuolas y mitocondrias agrandadas y finalmente se desprenden de la membrana de apoyo; cesan su alimentación y la muerte se produce entre los 2 a 7 días posteriores, dependiendo de la susceptibilidad a la bacteria y de la edad de la larva (Lecuona, 1995).

La bibliografía consultada, nos permite saber de otra forma de efecto patógeno de esta bacteria, es otra toxina relacionada al efecto de *Bacillus sphaericus* llamada toxina MTx y MTx2 de 100 y 39 KDa descritos más recientemente por Thanuhalu en 1991 – 1993, a pesar de producir cristales altamente tóxicos, al entrar en contacto con las larvas, estos cristales disminuyen el efecto tóxico de algunas cepas. La producción de toxinas MTx ocurre durante el crecimiento vegetativo (Batista, 1998).

2.2.2.3. Efectos de *Bacillus sphaericus* sobre larvas de mosquitos

Bacillus sphaericus presenta distintos grados de patogenicidad en larvas de mosquitos en laboratorio y campo. Las formulaciones más comercializadas son: líquidas, secas, primarias, técnica o polvo humedecido; gránulos, briquetas y formas encapsuladas. El polvo tiene una larga vida en los estanques, pero los líquidos concentrados, si bien son voluminosos, son fáciles de preparar (Porter y colaboradores, 1993).

Los primeros ensayos en Perú utilizando bacterias fueron realizados por Sarmiento y Razuri en 1978 contra el “cogollero”, dando resultados regulares,

siendo base como para aplicarlo sobre barrenadores y orugas quienes debían ingerir la bacteria para causar efecto (Cisneros, 1995).

La información bibliográfica hasta el momento indica que las únicas pruebas patogénicas realizadas con bacterias nativas en el Perú fueron hechas con 12 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* frente a larvas de anopheles (Flores y colaboradores, 1998).

2.2.2.4. Efectos de GRISELESF® sobre larvas de mosquitos

El biolarvicida GRISELESF® es una formulación de tipo suspensión acuosa que presenta en su composición un ingrediente activo que son las esporas y cristales endotóxicos de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 a una concentración de 0.5%; este ingrediente activo. Es un agente patógeno específico formado por esporas esféricas y cristales endotóxicos de la bacteria *Bacillus sphaericus* cepa 2362 serotipo H5a5b, de tipo Gram variable, estrictamente aeróbica. Su acción se produce a las 48-72 horas de su ingestión, produciendo en las larvas parálisis intestinal y envenenamiento por la acción de los cristales endotóxicos que producen las esporas, siendo altamente específica contra las larvas de mosquitos. Es inocuo, por que no causa daño alguno a los vertebrados de sangre caliente, los anfibios u otros animales que viven en el agua (hidrobiontes) (IDEASS, 2007). En el anexo N° 01 (tabla N° 10) se puede ver la ficha técnica del producto comercial GRISELESF®.

No habiendo más publicaciones, sobre el control microbiano de vectores, usando bacterias entomopatógenas en Perú debido al inadecuado uso de insecticidas químicos y resistencia y sobre todo la poca reducción en casos de malaria, se ve la necesidad de buscar métodos alternativos para el control vectorial, como estudiar la actividad larvicida de *Bacillus sphaericus* para controlar la población larvaria de *Anopheles pseudopunctipennis* y demostrar la susceptibilidad de estos vectores para con las bacterias utilizadas en el presente trabajo.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de aproximadamente 1 kg de suelo en bolsas de polietileno, procedentes de diferentes localidades como: Huatatas, Alameda y Totorilla en la provincia de Huamanga y Viru Viru, Cangari, Chihua, Canaire, Matará y Soccoscocha de la provincia de Huanta, y muestras de agua en frascos de 800 mL, anotándose los datos de muestreo y trasladándolas luego al laboratorio de biotecnología microbiana.

Las muestras de agua se guardaron en refrigeradora a 4° C de temperatura.

3.2. Aislamiento e identificación microscópica

- Se pesaron 25 g de suelo y se diluyeron en 225 mL de solución salina fisiológica, homogenizándola bien. Para las muestras de agua se midió 25 mL de muestra diluyéndose en 225 mL de solución salina fisiológica, esto constituyó la dilución 10^{-1} .
- Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} y 10^{-3} . Se separó 0.1 mL de cada dilución y se colocó sobre placas de Petri, conteniendo agar nutritivo; la siembra se realizó por diseminación con espátula de Drigalsky. Luego se incubó por 24 horas a 37°C realizando luego la coloración Gram y observando al microscopio la localización de esporas y cristales típicos. Se efectuaron comparaciones con la cepa patrón GRISELESF-2362 de *Bacillus*

sphaericus, sembrándose en agar nutritivo las cepas con las características descritas:

- a. Se aislaron 69 muestras (anexo N° 31). de las cuales 54 muestras fueron de suelo y 15 muestras fueron de agua; de estas muestras se aislaron 302 cepas de *Bacillus*, confirmados por observación microscópica y coloración Gram positiva.
- b. De las 302 cepas obtenidas se separaron 10 cepas, que presentaban las características morfológicas de *Bacillus sphaericus* como son: forma alargada y base ensanchada, con forma de una "raqueta". Luego se les realizó las pruebas bioquímicas.
- c. Por otro lado se aisló la cepa *Bacillus sphaericus* 2362 a partir de la formulación líquida del producto comercial "GRISELESF-2362" (anexo N° 01) de los laboratorios biológicos farmacéuticos (LABIOFAM) de La Habana-Cuba la cual se usó como cepa patrón. Luego se realizaron las pruebas bioquímicas tabla N° 02 y se tipificaron de acuerdo a lo señalado en el anexo N° 02

3.3. Identificación bioquímica y tipificación de las bacterias

Para la diferenciación de los microorganismos seleccionados se efectuaron las siguientes pruebas bioquímicas, como lo refiere Sneath y colaboradores en el *Bergey's Manual*® (1986), Mac Faddin (1975) y Horna y colaboradores (1983).

- Prueba de la oxidasa
- Prueba de la catalasa
- Fermentación de glucosa
- Prueba de indol
- Reacción de voges proskaver
- Prueba de fenil alanina

- Fermentación de xilosa, lactosa y manitol
- Hidrólisis de la Caseína
- Hidrólisis de la gelatina
- Hidrólisis del almidón
- Prueba de la lecitinasa
- Reducción de nitratos a nitritos

Luego de las pruebas bioquímicas se aislaron las cepas con características bioquímicas de *Bacillus sphaericus*. También se aisló la cepa de *Bacillus sphaericus* a partir del producto comercial "GRISELESF-2362" (Bs (+))

3.4. Identificación de criaderos y obtención de la población larvaria

Los criaderos permanentes identificados fueron dos: ubicados geográficamente hacia el noroeste de la capital de Ayacucho a más de 1:30 horas por vía carrozable y 40 minutos por camino de herradura, localizadas a orillas del cause del "río cachi" a 2 250 m.s.n.m. en la que se ubica a las localidades de Viru Viru provincia de Huanta departamento de Ayacucho y por su cercanía a 15 minutos por camino de Herradura y cruzando el río la localidad de Sillco provincia de Angaráes departamento de Huancavelica.

Los criaderos se identificaron y censaron a través de una ficha control (anexo N° 28 y 29) donde se anotaron las características bioecológicas del criadero y la densidad larvaria por el método del cucharón, para determinar el tamaño de la población de anofelinos por estadio larval. Luego se realizó análisis físico-químicos de muestras de agua de los criaderos en la Dirección Regional de Salud (DGS-OSABAR) Ayacucho.

La colección de todos los estados larvales fue entre las 9 a.m. y 4 p.m. en bandejas de plástico mediante el método del cucharón: 5 cucharones/m² de criadero (anexo N° 14), luego de recolectar las muestras de larvas, se

trasladaron con cuidado de no maltratarlas con el manipuleo y transporte; a la ciudad de Ayacucho, en baldes plásticos con agua del mismo criadero, entre 7 pm a 9 pm, para su acondicionamiento y uso en los bioensayos de laboratorio (anexo N° 15 y 16).

3.5. Mantenimiento de larvas en laboratorio

Las larvas colectadas fueron separadas por estadios: Larva I, II, III, IV y pupas. Todas fueron colocadas en bandejas plásticas de 26 x 16 x 5 cm. conteniendo 1,5 L. de agua de criadero y puestas dentro de jaulas incubadoras donde se controló la temperatura y la humedad relativa entre 28° y 30° C de día y 26° a 27° C de noche y 87 % de humedad relativa (HR). Para su alimentación se agregó 0.1 g. de extracto de levadura por cada 100 mL de agua que contenía la bandeja (anexo N° 17, 18 y 19).

3.6. Obtención de las especies vectoras

Las larvas IV y pupas se colocaron en jaulas incubadoras especiales para esperar la emergencia de los adultos (anexo N° 20). Incubados a temperatura controlada (28° y 30° C de día y 26° a 28° C de noche y 87 % de HR). La alimentación de los adultos fue a base de solución de azúcar al 10% empapada en algodón.

Los mosquitos adultos obtenidos fueron colectados para confeccionar un insectario de la especie.

3.7. Preparación y cuantificación del inóculo

Para la cuantificación del inóculo del biolarvicida se procedió a evaluar la curva de crecimiento de cada una de las cepas bacterianas de la siguiente forma:

- Se reactivó las cepas inoculando 3 asadas en aro, de cultivo bacteriano en 100 mL de caldo nutritivo, se incubó por 18 h a 37°C; luego se transfirió 1 mL de cultivo incubado a una batería de tubos conteniendo 9 mL de caldo nutritivo. Estos tubos se incubaron luego a 37°C para evaluar la absorbancia en el

espectrofotómetro a 520 nm en los siguientes tiempos: 0, 4, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 26, 30 y 36 horas, para determinar la curva de crecimiento. Este proceso se repitió con cada una de las cepas aisladas.

- Luego de determinar la curva de crecimiento de cada una de las cepas se procedió a inocular 3 asadas de cada cepa, en 100 mL de caldo nutritivo. Cuando cada cultivo llegó a su fase logarítmica se midió la absorbancia de la biomasa que previamente se diluyó hasta 10^{-11} y 10^{-12} , luego se sembró 1 mL de la dilución, por incorporación, en agar nutritivo, incubándolo a 37°C por 24 h para determinar las UFC/mL de los cultivos.

- El inóculo, para la prueba de patogenicidad, se preparó en 100 mL de caldo nutritivo inoculando con 3 asadas de cultivo y se incubó a 37°C por 14, 16, 20 y 26 h, respectivamente para cada cepa aislada. Luego se procedió a leer la absorbancia a 520 nm de las diluciones 10^{-11} y 10^{-12} , para llegar a los datos obtenidos en el paso anterior con un margen de error de ± 0.01 , ver anexo N° 21 y 23.

- Luego se prepararon las concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL de biolarvicida para la realización de los bioensayos en laboratorio. Este mismo procedimiento se aplicó con cada una de las cepas aisladas (anexo N° 22),

3.8. Bioensayos de patogenicidad en laboratorio

Para los bioensayos de laboratorio se realizaron 3 bloques de repeticiones por tratamiento, en ellos se usó: dos estadios larvales de *Anopheles pseudopunctipennis* (L II y L III) y dos concentraciones de biopreparados de cada una de las 4 cepas de *Bacillus* aisladas. Disponiendo 60 vasos plásticos lavados, desinfectados y codificados con capacidad para 200 mL; a estos se les agregó 100 mL de agua de criadero o agua destilada más 0.01 g de extracto de levadura para la alimentación de las larvas. Luego se colocó en cada vaso 25 larvas II ó

larvas III, adicionando 10 mL de inóculo de bacterias a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL. (anexo N° 24, 25 y 26)

La evaluación de la respuesta larval se dio a las 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas (Anexo 27) y anotando los resultados en una ficha control (anexo N° 30).

3.9. Análisis de entomotoxicidad

Para hallar los porcentajes de mortalidad correspondientes a cada dosis, se obtuvo la cifra total de larvas muertas y moribundas. Los datos del testigo que estuvieron entre 10% de muertes sirvieron para corregir el porcentaje de muertes larvales. Esta corrección de datos se realizó mediante la formula de Abbott

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ mortalidad (tratamiento)} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \times 100$$

Fuente: Lecuona, 1995

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó de acuerdo al diseño de bloques completos randomizados con arreglo factorial $2A \times 5B \times 2C$ donde $A = 2$ (a1: estado larval II; a2: estado larval III), $B = 5$ (b1: testigo; b2: cepa Bsp A1; b3: cepa Bsp A2; b4: cepa Bsp A3; b5: cepa Bs(+) "Bs 2362") y $C = 2$ (c1: $1,5 \times 10^{11}$ esporas por mililitro (esp/mL); c2: $3,5 \times 10^{11}$ esporas por mililitro (esp/mL)) y $r = 3$ repeticiones.

3.11. Recuperación de entomopatógenos

- Para la recuperación de los entomopatógenos a partir de las larvas, se tuvo que separar cada una de las larvas muertas de los vasos de prueba hacia un recipiente que contenía agua destilada.
- Estas larvas se limpiaron utilizando un embudo que contenía un papel filtro humedecido en agua destilada estéril, al cual se introdujo las larvas con máximo

cuidado, luego se agregó gota a gota por espacio de 30 segundos hipoclorito de sodio al 5% para hacer que las larvas floten y se desinfecten exteriormente, en el espacio logrado; después se procedió a enjuagar en 4 oportunidades con agua destilada estéril y el último enjuague se realizó con solución salina fisiológica (SSF) para trasladar las larvas, a viales esteriles, para su conservación a medio ambiente.

- Los viales conteniendo las larvas fueron homogenizados para tomar una alícuota de 1 mL y realizar diluciones seriadas hasta 10^{-3} ; de esta última dilución se colocó 1 mL en una placa de Petri estéril al cual se incorporó agar nutritivo, incubándose a 37°C x 24 h para comprobar el crecimiento positivo de la bacteria luego se realizó las pruebas de coloración Gram y pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria.

IV. RESULTADOS

Tabla N° 02: Identificación por pruebas bioquímicas de las tres cepas aisladas y la cepa patrón. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

CEPAS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS													
	Oxidasa	Catalasa	OF Glucosa	Indol	V.P. pH<6	Fenilalanina	Xilosa	Lactosa	H. Caseína	H. Gelatina	H. Almidón	Lectina	R. Nitratos	Manitol
BspA1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
BspA2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
BspA3	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Bs 2362	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
** B.s	+ ^s	+	-	-	-	+	-	- ^s	d	d	-	-	- ^f	-

Fuente: ** Bergey's Manual® 1986

B. s** : *Bacillus sphaericus*
 Bsp A1 : *Bacillus sp.* Ayacucho 1
 Bsp A2 : *Bacillus sp.* Ayacucho 2
 Bsp A3 : *Bacillus sp.* Ayacucho 3
 Bs 2362 : *Bacillus sphaericus* 2362 control positivo(+)

d: 11-89% de las cepas son(+)
 s: Krych 1980
 f: Larkin and Stokes (1967)

Tabla N° 03: Valores de absorbancia de la curva de crecimiento de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Cepas Horas	Bs (+)	BspA1	BspA2	BspA3
0	0,029	0,032	0,037	0,026
4	0,086	0,036	0,147	0,106
8	0,163	0,105	0,211	0,156
12	0,231	0,168	0,235	0,260
14	0,249	0,206**	0,260	0,310
16	0,259	0,187	0,287**	0,404
18	0,260	0,170	0,280	0,446
20	0,340	0,152	0,275	0,512**
24	0,388	0,139	0,273	0,510
26	0,444**	0,132	0,253	0,509
30	0,430	0,128	0,165	0,487
36	0,287	0,120	0,148	0,442

** Valores que representan el punto máximo de reproducción celular

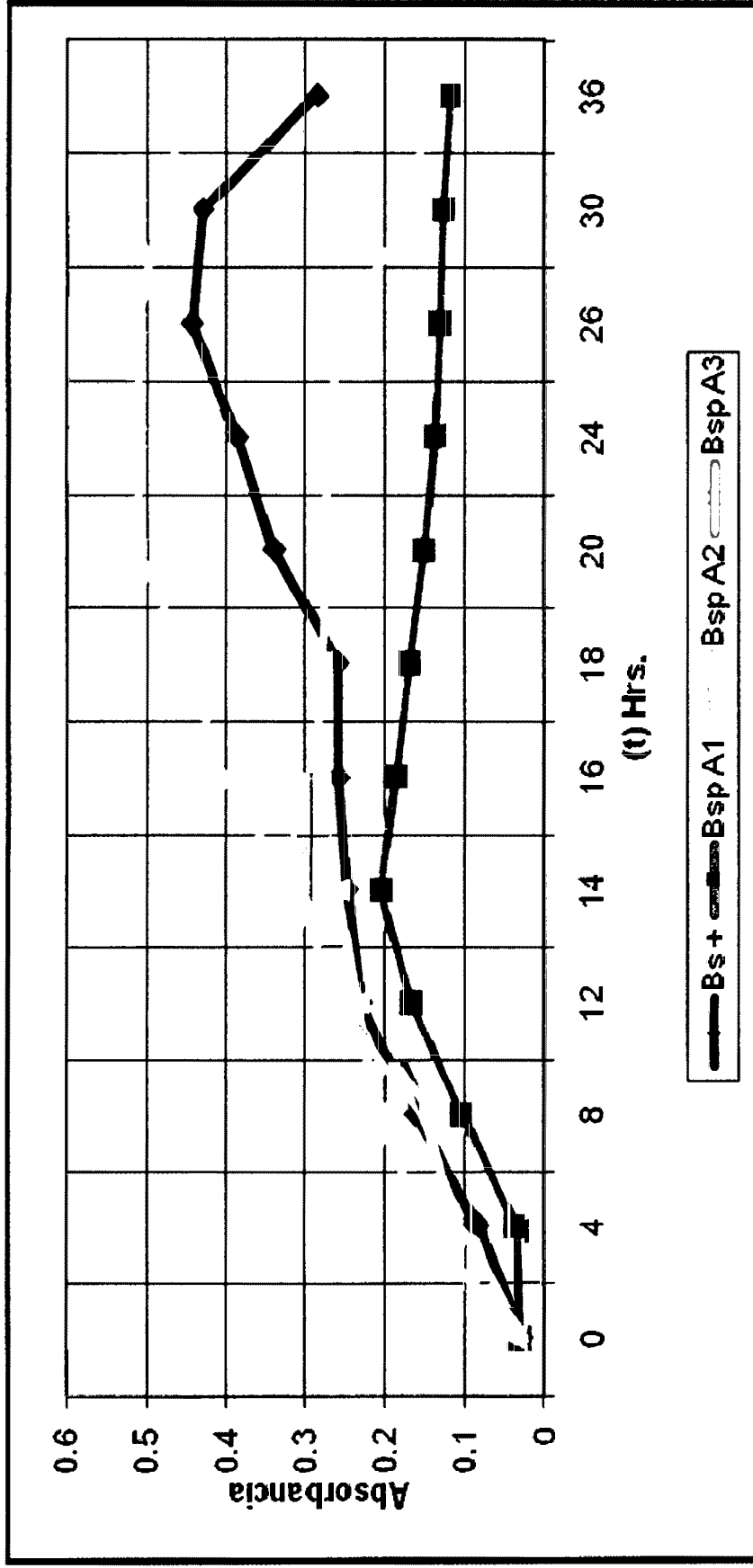


Figura N° 01: Gráfico de la curva de crecimiento de las cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus sphaericus* 2362. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Tabla N° 04: Número de muertes de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en agua de criadero a las 48 horas post aplicación, 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Est. Larval	Larva II										SUMA DE BLOQUES		
	Cepas Bacterianas		TEST		BspA1		BspA2		BspA3			Bs(+)	
	Concentraciones		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2		C1	C2
Bloque I	1	2	25	24	14	22	19	23	19	18	18	167	
Bloque II	2	2	17	25	20	23	22	18	18	16	16	163	
Bloque III	0	1	24	25	22	25	19	23	21	22	22	182	
Promedio muertes/estd Larval	17												
Promedio muertes/Cepas	1		23		21		21		19				
Promedio muertes/Conct.	16					18							
Est. Larval	Llarva III										SUMA DE BLOQUES		
	Cepas Bacterianas		TEST		BspA1		BspA2		BspA3			Bs(+)	
	Concentraciones		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2		C1	C2
Bloque I	1	1	15	15	13	18	17	15	8	18	18	121	
Bloque II	0	2	5	12	9	14	15	7	25	8	8	97	
Bloque III	1	0	9	8	9	10	16	12	14	4	4	83	
Promedio muertes/estd Larval	10												
Promedio muertes/Cepas	1		11		12		14		13				
Promedio muertes/Conct.	10					10							

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LOS BIOENSAYOS:

(Cepas bacterianas y testigo):

Testigo : Tes
Bacillus sp. Ayacucho 1 : BspA1
Bacillus sp. Ayacucho 2 : BspA2
Bacillus sp. Ayacucho 3 : BspA3
Bacillus sphaericus 2362 : Bs (+)

(Concentración de biopreparado): en esporas por mililitro (esp/ml)

C1: $1,5 \times 10^{11}$ esp/ml C2: $3,5 \times 10^{11}$ esp/ml

Tabla N° 05: Mortalidad de larvas II de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a 4 cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en agua de criadero. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Concentración de esp/mL	Cepas Bacterianas	Promedio de larvas II muertas por tiempo de exposición					
		4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
$1,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	9,33	22,78	35,39	58,05	76,19	80,78
	BspA1	6,67	14,72	28,61	56,13	87,07	87,56
	BspA2	5,33	22,94	36,83	63,57	73,48	79,33
	BspA3	9,33	24,33	31,39	56,95	79,32	80,83
$3,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	6,72	18,06	31,94	56,28	72,64	74,09
	BspA1	34,67	47,22	61,11	81,40	98,55	100,00
	BspA2	9,44	19,44	30,56	80,07	92,75	92,75
	BspA3	8,11	18,06	30,56	60,63	79,89	81,34

Bsp A1 : *Bacillus sp.* Ayacucho 1
 Bsp A3 : *Bacillus sp.* Ayacucho 3

Bs A2 : *Bacillus sp.* Ayacucho 2
 Bs (+) : *Bacillus sphaericus* 2362 control positivo

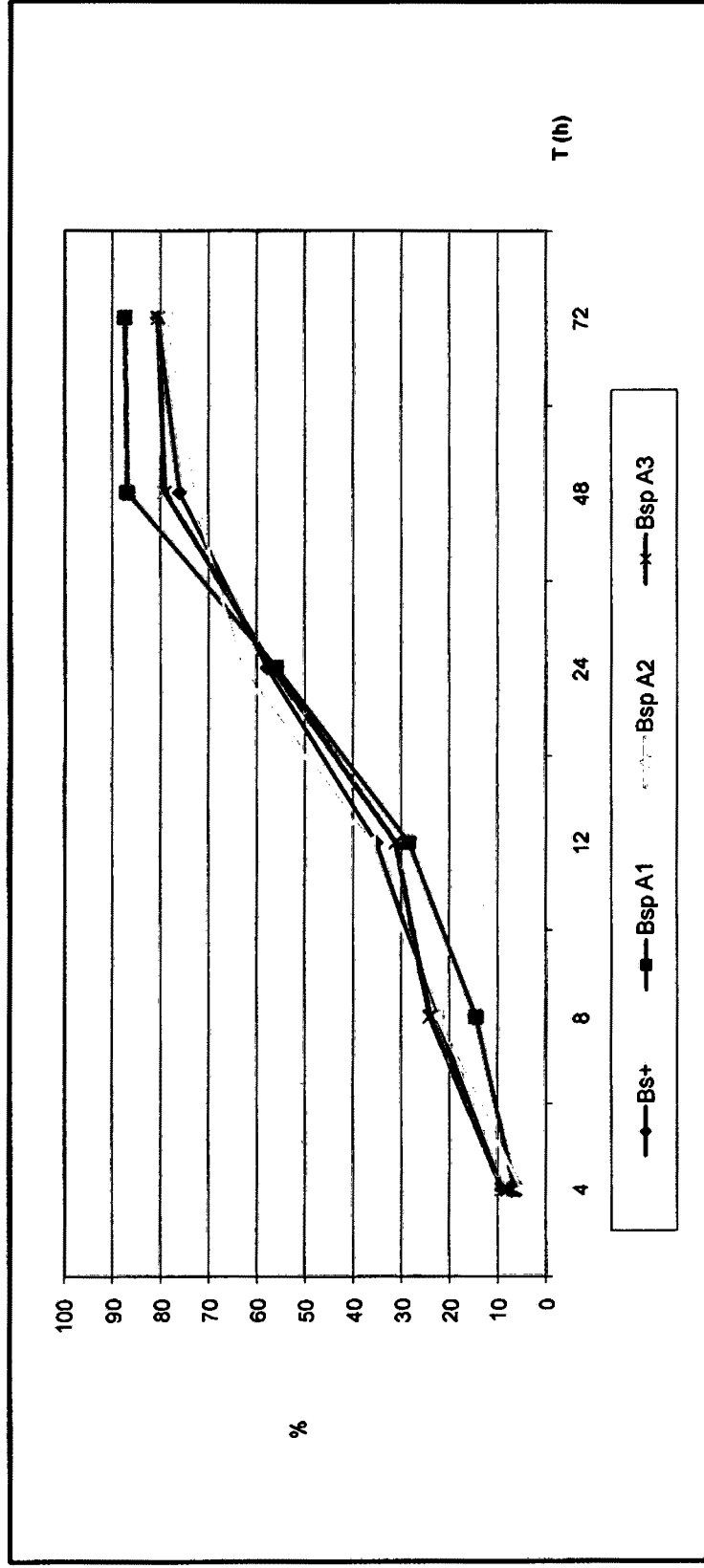


Figura N° 02: Mortalidad de larva II de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua de criadero frente a cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 en concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL en función al tiempo de exposición. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

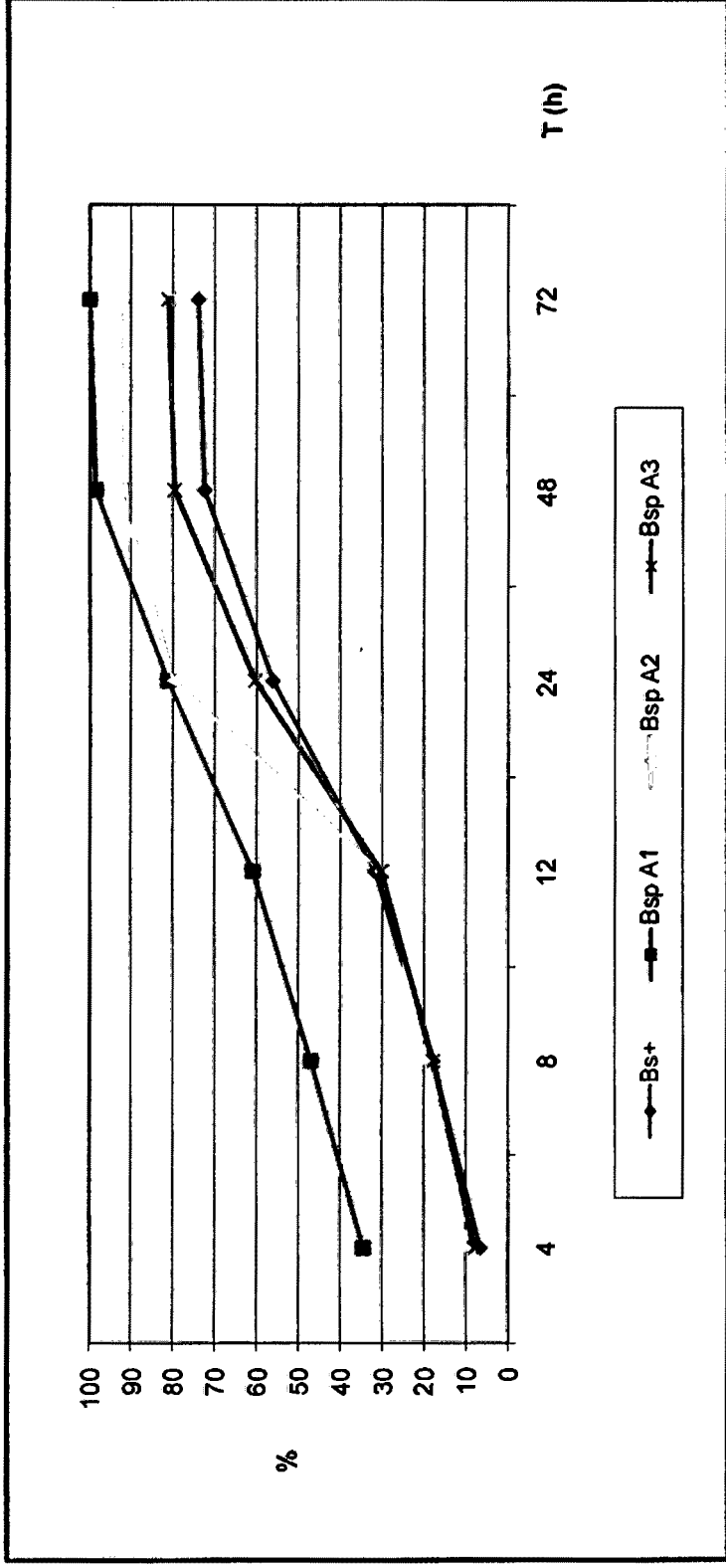


Figura N° 03: Mortalidad de larva II de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua de criadero frente a cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus sphaericus* 2362 en concentraciones de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en función al tiempo de exposición. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Tabla N° 06: Mortalidad de larvas III de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a 4 cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en agua de criadero. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Concentración de esp/mL	Cepas Bacterianas	Promedio de larvas III muertas por tiempo de exposición					
		4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
$1,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	13,33	16,00	16,22	25,61	61,11	69,44
	BspA1	14,67	21,33	20,39	36,72	70,83	73,61
	BspA2	6,67	9,33	8,33	26,00	39,78	47,94
	BspA3	6,67	12,00	13,89	27,67	63,06	67,06
$3,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	9,56	13,83	16,61	27,67	32,44	48,31
	BspA1	6,89	8,28	8,28	12,39	44,60	55,97
	BspA2	13,78	17,94	23,44	28,94	54,34	68,24
	BspA3	12,33	16,61	19,39	29,06	33,47	49,70

Bsp A1 : *Bacillus sp.* Ayacucho 1
 Bsp A3 : *Bacillus sp.* Ayacucho 3

Bsp A2 : *Bacillus sp.* Ayacucho 2
 Bs (+) : *Bacillus sphaericus* 2362 control positivo

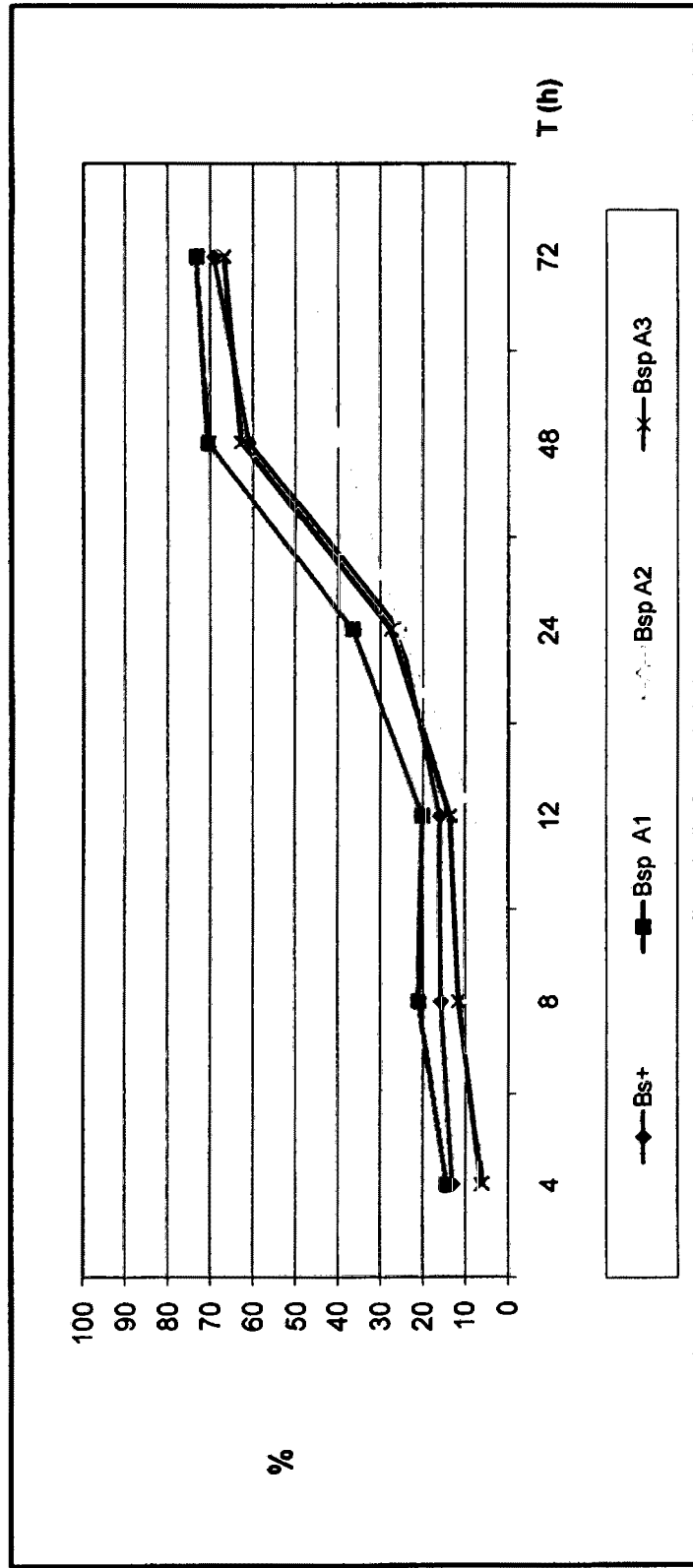


Figura N° 04: Mortalidad de larva III de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua de criadero frente a cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus sphaericus* 2362 en concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL en función al tiempo de exposición. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

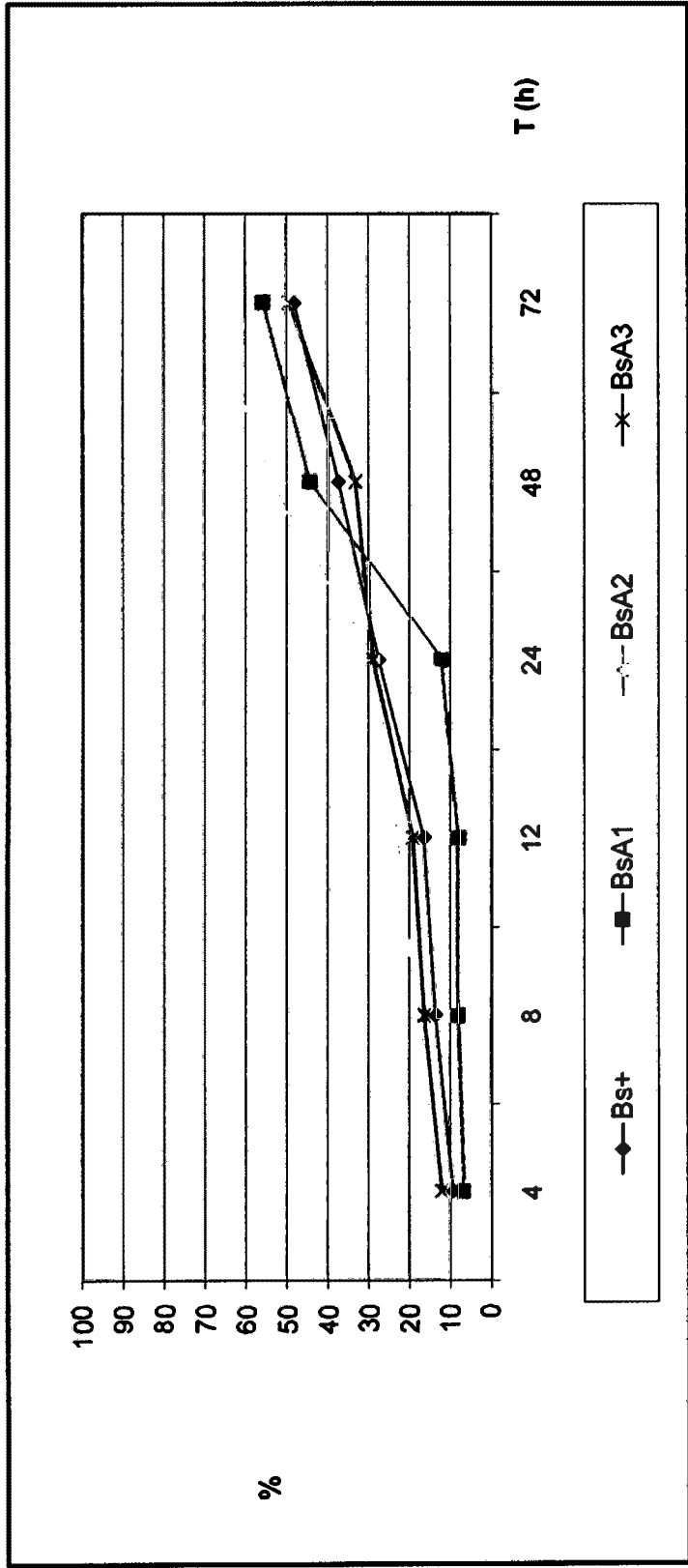


Figura N° 05: Mortalidad de larva III de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua de criadero frente a cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 en concentraciones de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en función al tiempo de exposición. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000

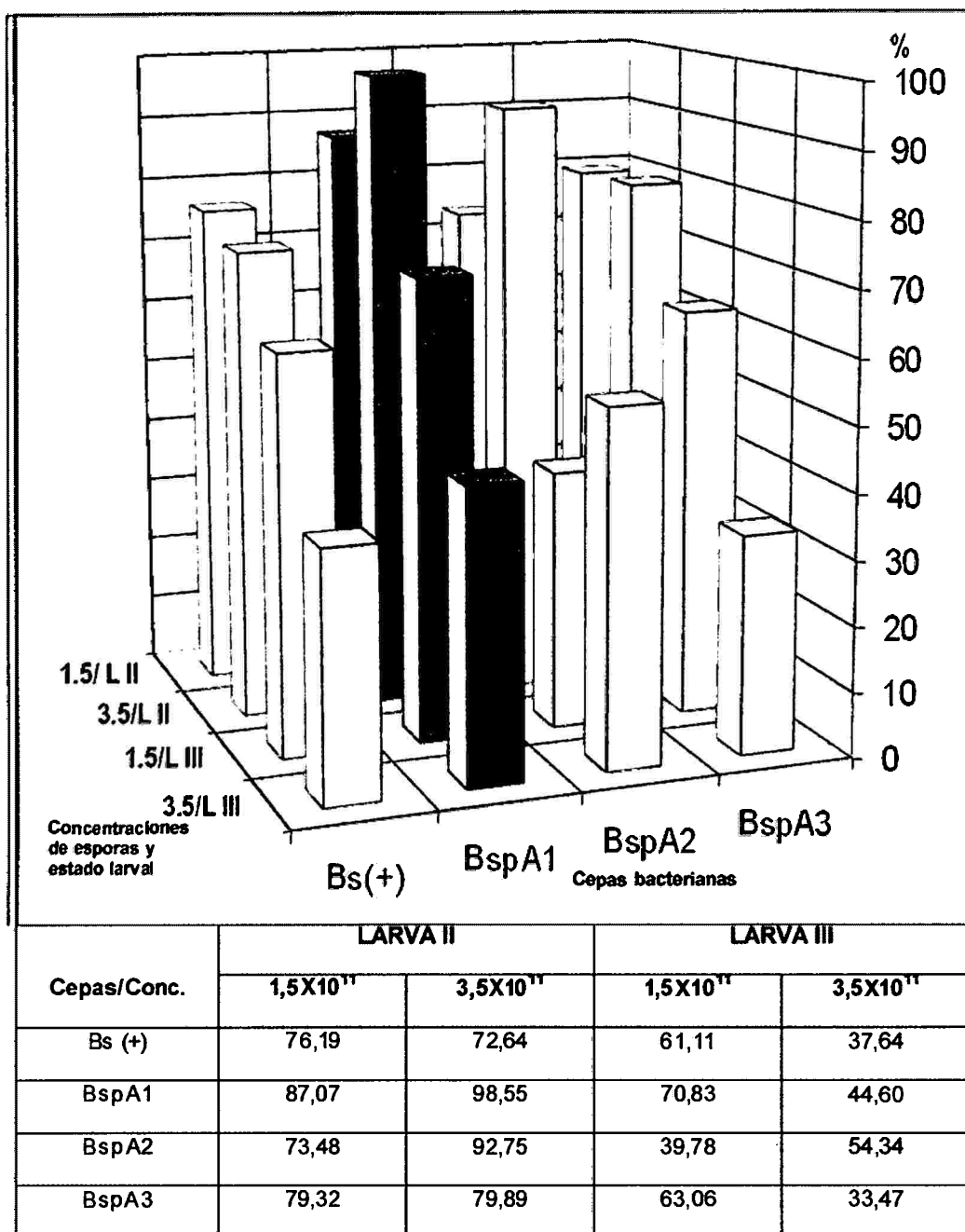


Figura N° 06: Comparacion del porcentaje de mortalidad de larva II y Larva III en agua de criadero a las 48 horas a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362. 28 °C Y 87%. H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Tabla N° 07: Número de muertes de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en agua destilada a las 48 horas post aplicación, 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Est. Larval	Larva II										SUMA
Cepas Bacterianas	TEST		BspA1		BspA2		BspA3		Bs(+)		DE
Concentraciones	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	BLOQUES
Bloque I	2	2	25	17	20	25	23	20	25	25	184
Bloque II	3	2	16	25	22	24	25	21	25	24	187
Bloque III	1	1	22	25	22	25	25	23	24	23	191
Promedio muertes/estd Larval	19										
Promedio muertes/Cepas	2		22		23		23		24		
Promedio muertes/Conct.	19					19					
Est. Larval	Llarva III										SUMA
Cepas Bacterianas	TEST		Bsp A1		BspA2		BspA3		Bs(+)		DE
Concentraciones	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	BLOQUES
Bloque I	3	1	9	18	20	12	21	20	22	19	145
Bloque II	2	1	16	19	16	16	22	18	10	16	136
Bloque III	0	1	10	10	10	16	14	12	12	10	95
Promedio muertes/estd Larval	13										
Promedio muertes/Cepas	1		14		15		18		15		
Promedio muertes/Conct.	12					13					

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LOS BIOENSAYOS:

(Cepas bacterianas y testigo):

Testigo : Tes
Bacillus sp. Ayacucho 1 : BspA1
Bacillus sp. Ayacucho 2 : BspA2
Bacillus sp. Ayacucho 3 : BspA3
Bacillus sphaericus 2362 : Bs (+)

(Concentración de biopreparado): en esporas por mililitro (esp/ml)

C1: $1,5 \times 10^{11}$ esp/ml C2: $3,5 \times 10^{11}$ esp/ml

Tabla N° 08: Mortalidad de larvas II de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a 4 cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en agua destilada. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Concentración de esp/mL	Cepas Bacterianas	Promedio de larvas II muertas por tiempo de exposición					
		4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
$1,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	0,00	9,50	25,00	82,67	98,61	98,61
	BspA1	2,67	6,83	20,83	55,56	82,20	95,83
	BspA2	9,33	12,28	26,39	82,79	84,04	86,94
	BspA3	5,33	15,00	27,78	92,75	97,10	100,00
$3,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	6,17	9,38	19,79	56,02	71,83	72,92
	BspA1	0,00	4,17	19,44	63,29	88,41	100,00
	BspA2	6,67	16,67	31,94	87,38	98,55	100,00
	BspA3	4,00	12,50	26,39	73,31	84,18	91,43

Bsp A1 : *Bacillus sp.* Ayacucho 1
 Bsp A3 : *Bacillus sp.* Ayacucho 3

Bsp A2 : *Bacillus sp.* Ayacucho 2
 Bs (+) : *Bacillus sphaericus* 2362 control positivo

Tabla N° 09: Mortalidad de larvas III de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a 4 cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en agua destilada. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Concentración de esp/mL	Cepas Bacterianas	Promedio de larvas III muertas por tiempo de exposición					
		4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
$1,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	1,33	10,78	15,06	48,12	56,38	70,18
	Bsp A1	1,33	4,06	11,06	34,20	42,71	49,93
	BspA2	6,67	9,39	16,39	43,88	59,38	70,64
	BspA3	2,67	6,72	16,44	67,94	74,92	83,65
$3,5 \times 10^{11}$	Bs (+)	0,00	4,17	10,42	33,33	45,83	53,13
	BspA1	6,67	6,94	12,50	37,50	56,94	63,89
	BspA2	1,33	1,39	13,89	36,11	65,28	77,78
	BspA3	0,00	4,17	11,11	31,94	58,33	65,28

Bsp A1 : *Bacillus sp.* Ayacucho 1
 Bsp A3 : *Bacillus sp.* Ayacucho 3

Bsp A2 : *Bacillus sp.* Ayacucho 2
 Bs (+) : *Bacillus sphaericus* 2362 control positivo

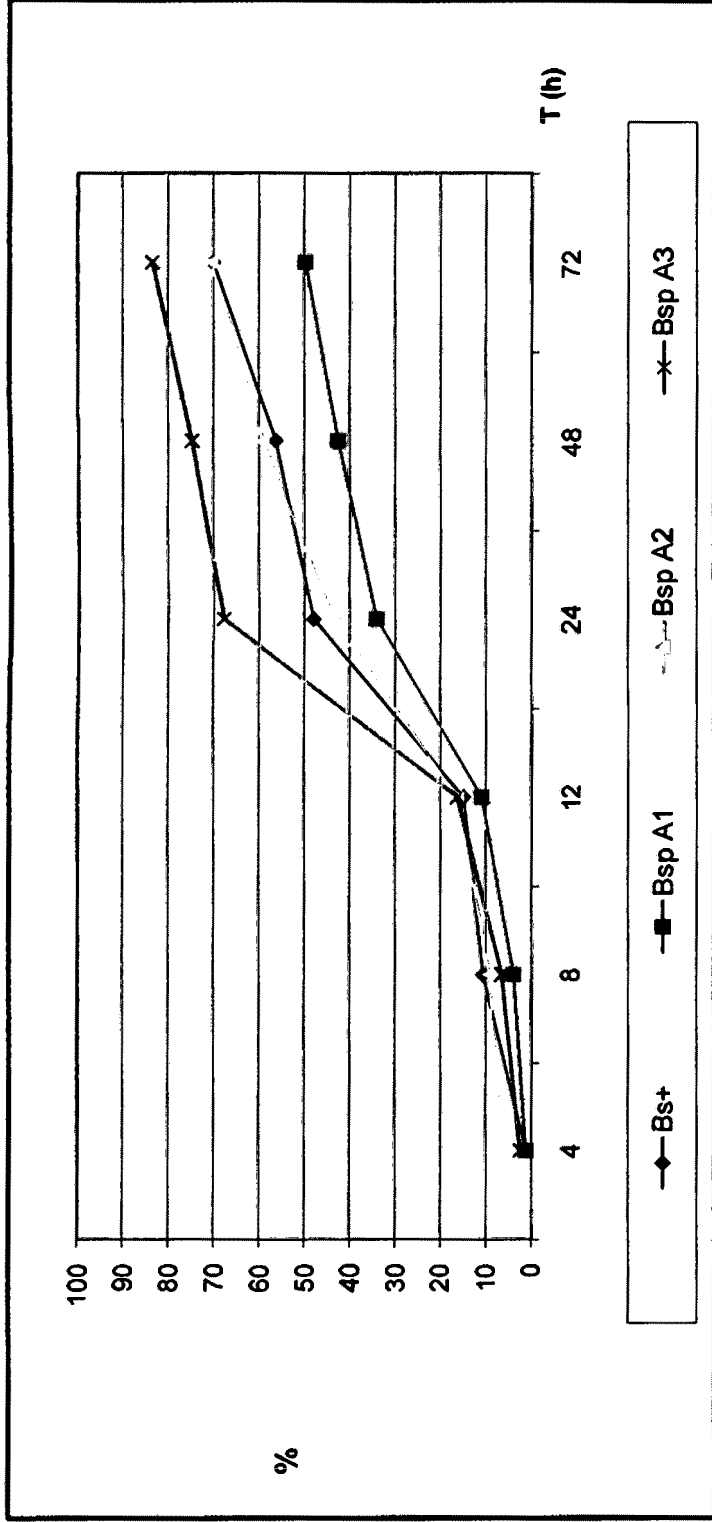


Figura N° 09 Mortalidad de larva III de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua destilada frente a cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus sphaericus* 2362 en concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL en función al tiempo de exposición. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

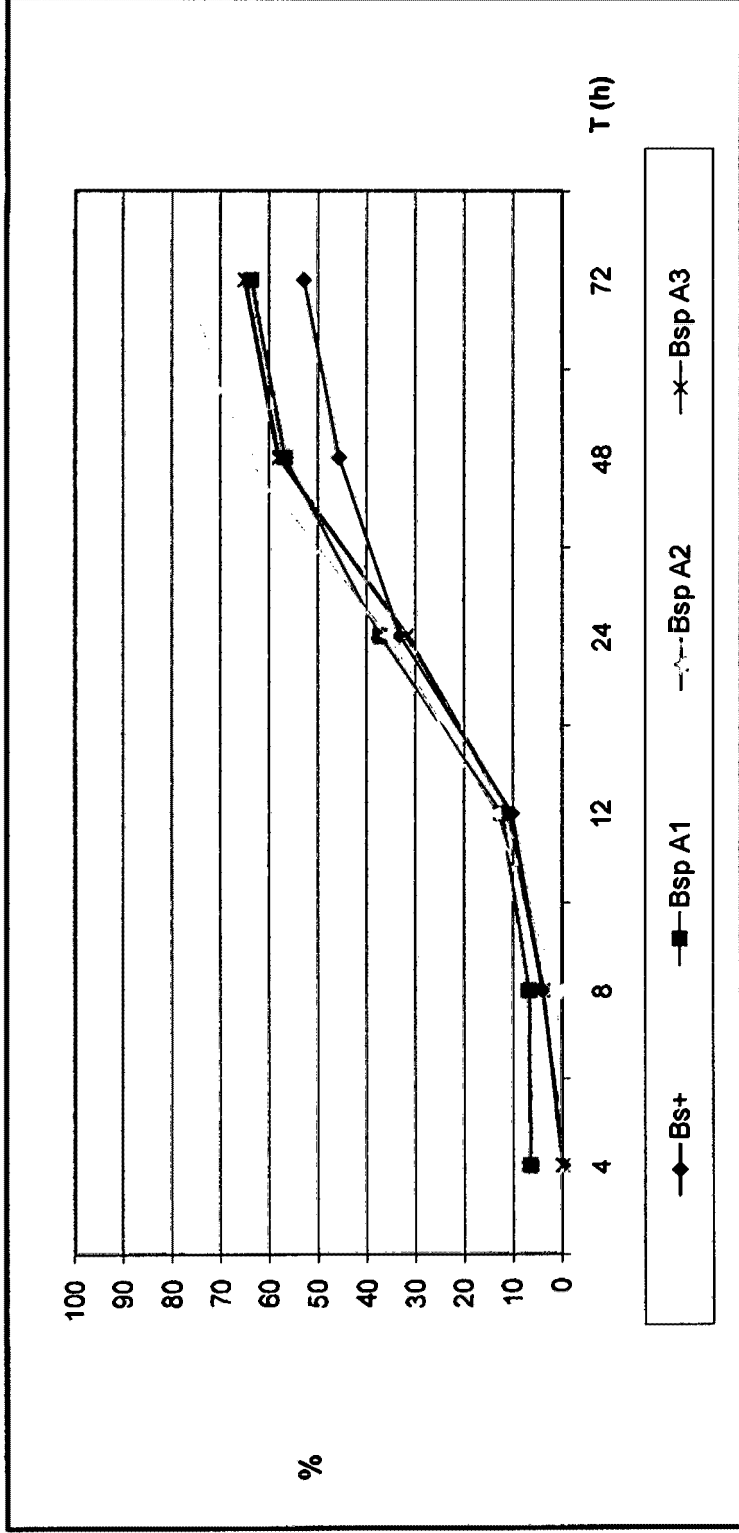


Figura N° 10: Mortalidad de larva III de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua destilada frente a cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 en concentraciones de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL en función al tiempo de exposición. 28 °C Y 87% H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

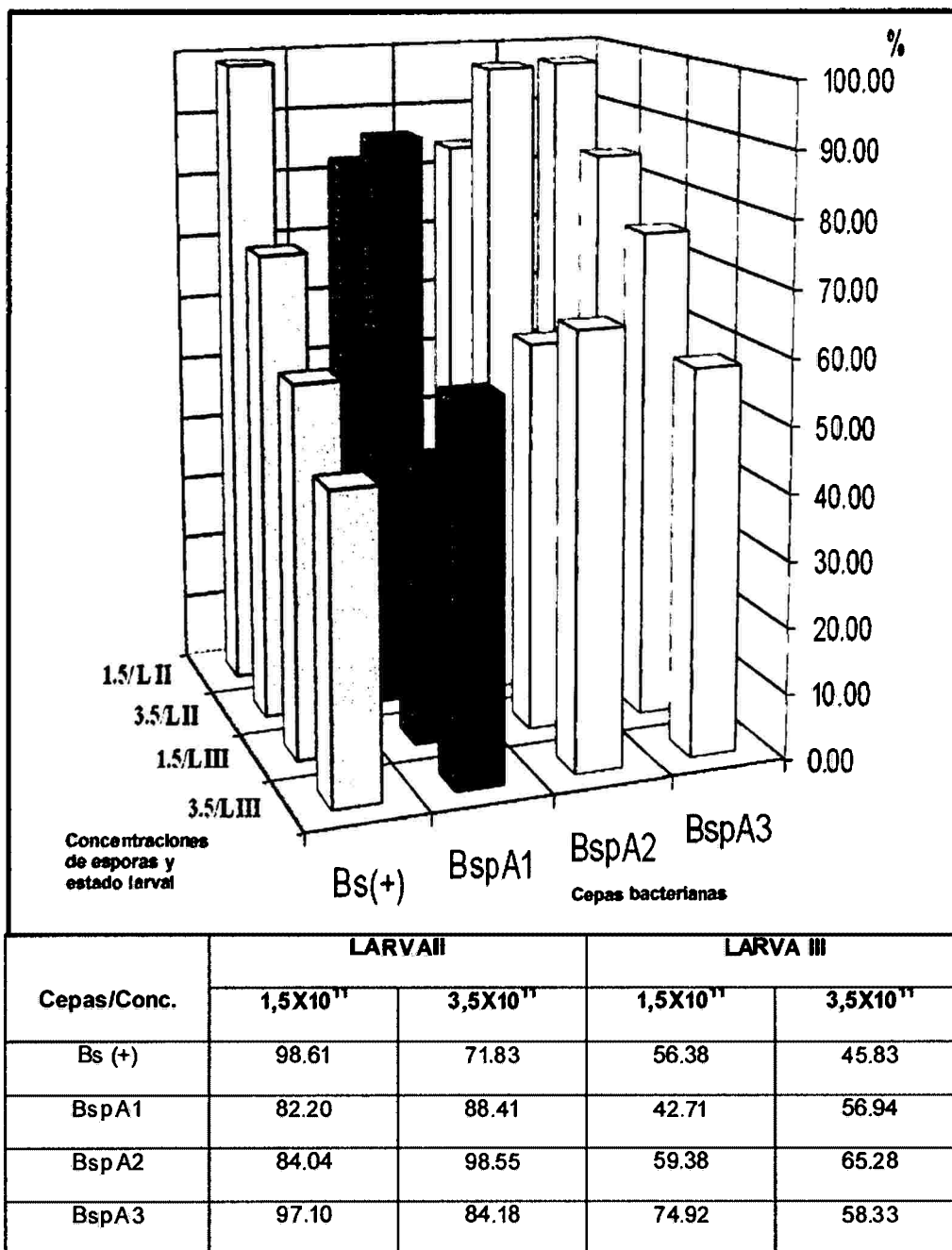


Figura N° 11: Comparacion del porcentaje de mortalidad de larva II y Larva III en agua destilada a las 48 horas a concentraciones de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362. 28 °C Y 87%. H.R. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

V. DISCUSIÓN

Los criaderos de Viru Viru /Huanta/Ayacucho y Sillco/Angaráes/ Huancavelica fueron los criaderos temporales de mayor duración y los más permanentes, presentaron también mejor adaptación biológica de especies y condiciones ambientales favorables para el crecimiento y reproducción de *Anopheles pseudopunctipennis*, a pesar de los constantes cambios climáticos ocurridos en esta zona, donde la densidad larvaria estuvo entre 1.6 larvas/cucharón y 12.8 larvas/cucharón.

La flora asociada con los criaderos estuvo conformada por plantas arbustivas como: *Dorotea viscosa* "chamana", *Baccharis sp.* "chilca". Plantas acuáticas como helechos acuáticos, lentejas de agua, algas verdes filamentosas abundantes como *Cladofora spp.* (anexo N° 11, 12 y 13).

La fauna asociada estuvo conformada por estadios ninfales de odonatos, y coleópteros acuáticos, al mismo tiempo se encontró estados inmaduros de dos insectos que demostraron tener un comportamiento predador de larvas de Anophelinos (anexo N° 40 y 41). Además entre las especies biológicas encontradas, tenemos: el ganado vacuno, caprino y equino que se acercan al criadero para beber agua. La temperatura del agua del criadero fluctuó entre 20-25°C con pH = 6.0.

Los resultados del análisis físico químico, de las aguas de los criaderos de

anophelinos, reportaron agua con ninguna fuente de contaminación y adecuados para las larvas de Anopheles (anexo N° 32).

En la tabla N° 02 se aprecia las pruebas bioquímicas de las tres cepas aisladas y de la cepa control de *Bacillus sphaericus*. Según la tipificación en el presente trabajo, podemos afirmar que las cepas aisladas presentan similitud en las pruebas bioquímicas de identificación, tal como lo indica Sneath y colaboradores (1986) en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. A su vez Batista (1998), afirma que en general *Bacillus sphaericus* descompone caseína y presenta reacción positiva para catalasa y puede tolerar medios anaeróbicos y que presenta coloración variable a la coloración Gram pero en general son positivas.

En la tabla N° 03 los valores de lectura de la absorbancia nos muestra diferentes curvas de crecimiento de las cepas aisladas. Se observó que las cepas aisladas en Ayacucho tienen un menor tiempo de reproducción así: Bsp A1 tiene una tasa de alto crecimiento microbiano hasta las 14 horas, Bsp A2 hasta las 16 horas y Bsp A3 hasta las 20 horas, la cepa control Bs(+) presentó alta tasa de crecimiento a las 26 horas.

Ninguno de los autores consultados mencionan el tiempo de crecimiento óptimo o de mayor reproducción celular de la cepa *Bacillus sphaericus*.

En cuanto a la susceptibilidad de las larvas en agua de criadero y agua destilada podemos mencionar el porcentaje de mortandad de larvas II y III se encuentra entre el 50% al 100% a las 48 horas post aplicación, y con temperatura controlada en laboratorio es por eso que creemos que la temperatura jugó un papel importante en el efecto patógeno de *Bacillus sphaericus*, esta temperatura estuvo entre 26°C y 30°C con 87% HR. Es así que nuestros resultados obtenidos en agua de criadero y agua destilada estuvieron en rangos próximos a los que mencionan algunos autores; así Wraight y colaboradores (1981), pero al

probar *Bacillus sphaericus* 1593 frente a larvas de *Aedes stimulans* pudieron apreciar que en un rango de 19 a 23°C, las Larva I, II y III mueren hasta por más del 80% y entre 10 y 17°C se apreció que los cuatro estadios larvales alcanzan un 90% de mortalidad.

Nongrados y colaboradores (2000), mencionaron que Mittal y colaboradores en 1993 con diferentes dosis probaron *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas del tercer estadio de *Anopheles stephensi* entre 21°C y 31°C \pm 2. Además Rodrigues y colaboradores (1998), con temperaturas de 26°C \pm 2, obtuvieron una excelente mortandad entre 24 y 48 horas de exposición en estudios con *Anopheles nuneztovari* y *Anopheles darlingi*.

Con respecto al agua de criadero, en la tabla N° 05 y figura N° 03 con una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL, se aprecia que el porcentaje de mortalidad se aproxima a 25 larvas II de *Anopheles pseudopunctipennis* en la cual la cepa Bsp A1 ocasiona el 99% de muertes de larvas II, seguida por Bsp A2 con 93% de mortandad, Bsp A3 con 80% y finalmente Bs (+) con 73% de muertes. En cambio a una concentración de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa más efectiva fue Bsp A1 con 87% de mortandad de larvas II seguida por Bsp A3 con 80% y finalmente Bs (+) con 76% y Bsp A2 con 73% de muertes de larvas II.

Por otro lado en la tabla N° 06 referido al estado larval III, la mortalidad es menor, sin embargo a una de concentración de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL Bsp A1 ocasionó el 71% de muertes de larvas III seguida por Bsp A3 con 63% y Bs (+) con 61% de muertes y a una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL sólo Bsp A2 ocasionó 54% de mortalidad de larvas III. Esto demuestra que en agua de criadero el estado larval II es más susceptible al efecto de *Bacillus sphaericus* que el estado larval III y que las cepas aisladas en Ayacucho actúan mejor que la cepa control. Estos datos se confirman en la tabla N° 04 donde la cepa Bsp A1 mata a 3 larvas II seguida por Bsp A2 con 21 larvas II muertas; Bsp A3 con 21

larvas I y Bs(+) con sólo 19 larvas II muertas. El efecto de las concentraciones es un dato que no tiene significancia en los bioensayos (anexos N° 33, 34 y 35). Esto se puede observar en las figuras N° 02, 03, 04 y 05. Es probable que la mortalidad se debió a la capacidad fago estimulante que ejercen los componentes que forman el agua de criadero y el alimento que se le dió a las larvas.

Los autores consultados mencionan el efecto patógeno de la bacteria en criaderos naturales, así:

Lacey y colaboradores (1986), indicaron que *Bacillus sphaericus* 2362 reduce entre 71 y 82% de las larvas de *Anopheles quadrimaculatus* desde 48 horas a una semana post tratamiento.

Majori y colaboradores (1987), a las 48 horas de exposición comprobaron que *Bacillus sphaericus* 1593 consiguió 81% de reducción de larvas I y II, y 100% de reducción larval III y IV de *Anopheles gambiae* y con la cepa 2362 redujo de 68% a 95% las larvas III y IV de *Anopheles gambiae*.

Thiery y colaboradores (1997), evaluaron *Bacillus sphaericus* 2362 frente a *Bacillus sphaericus* cepas; C3-41, Mal y LB24, en sitios de reproducción natural de *Culex*. Logrando que en países tropicales, la cepa C3-41 demuestre alta actividad y la cepa "mal" fuera menos activa con 80% de mortalidad y con 20 a 90 días de capacidad residual.

Rodrigues y colaboradores (1998), en condiciones de campo probaron *Bacillus sphaericus* cepas: S2, S20 y S46 aislados de muestras de suelo en Brasil, contra larvas del 3° estadio de *Anopheles nuneztovari* y *Anopheles darlingi*, mostrando más efectividad las cepas S2 y S20 después de 48 horas.

Dennett y Meisch (2000), al probar *Bacillus sphaericus* sobre el 1° y 2° estado larval de *Anopheles quadrimaculatus* produjo 75% de muertes entre 48 – 77 horas, en criaderos de Arkansas y otras regiones de Estados Unidos. Pero

Rodríguez y colaboradores (1998), indican la susceptibilidad y mortandad en orden de importancia de la larva III de *Anopheles Braziliensis*, larva II de *Anopheles nuneztovari* y la larva III de *Anopheles darlingi* entre 24, 48 y 72 horas luego de la exposición al bacilo.

Por otro lado en agua destilada, en la tabla N° 08 a una concentración de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL observamos que el 99% de mortalidad de larvas II fue causada por la cepa Bs(+), seguida por la cepa Bsp A3 con 97%, Bsp A2 con 84% y Bsp A1 con 82% de las muertes del estado larval II. En cambio con una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL destaca la cepa Bsp A2 con el 99% de mortalidad de larvas II, seguida por Bsp A1 con 88%; Bsp A3 con 84% y finalmente Bs(+) con 72%, de muertes de larvas II.

Los autores consultados tienen variadas opiniones sobre el efecto de la cepa en aguas más limpias o con poca contaminación, como la del agua destilada; así:

Rashed y Mulla (1989) mencionan que *Bacillus sphaericus* provee un nivel de control muy bueno en aguas claras más que en agua contaminadas. Por otro lado Batista (1998), menciona que los efectos patogénicos de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus Thuringiensis* en laboratorio resultan alentadores, pero en campo suelen tener resultados muy por debajo de lo que se pretende, esto debido al tipo y calidad de agua y a la persistencia del microorganismo en el ambiente.

En la tabla N° 09, para agua destilada, podemos ver que las 48 horas post aplicación el estado larval III es menos susceptible ya que a una concentración de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bsp A3 produce el 75% de muertes de larvas III, seguida de la cepa Bsp A2 con 59% de muertes y Bs(+) con 56% de muertes de larvas III. En cambio a una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bsp A2 ocasiona el 65% de muertes de lavas III, seguida por Bsp A3 con 58% de las muertes y Bsp A1 con 56% de muertes de larvas III. Con esto demostramos que

el estado larval II también es mucho más susceptible al efecto de *Bacillus sphaericus* en agua destilada. Los datos de la tabla N° 07 indican que la cepa más destacada a $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL fue Bs(+) con 24 muertes de larvas II seguida por Bsp A2 con 23; Bsp A3 con 23 y Bsp A1 con 22 larvas II. Sin embargo podemos considerar también como medianamente susceptible al estado larval III frente a una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL porque presenta mortalidades mayores al 50%. Esto debe ser a causa de la mayor pureza del agua y al estar con pocas impurezas el efecto fago estimulante fue sólo por la presencia del inóculo y del alimento para las larvas.

Pocos son los autores que mencionan los efectos de la bacteria en agua destilada, sin embargo los consultados tuvieron variadas opiniones a cerca del efecto de la bacteria en sobre especies de mosquitos; así:

Nongrados (1999) mencionó que Ribeiro y colaboradores en 1996, en laboratorio, probaron cepas de *Bacillus sphaericus* 2362 aislado de muestras de suelo en el Brasil, comprobando su toxicidad a las 48 horas, contra larvas II de *Anopheles albimanus* y *Anopheles quadrimaculatus*.

Sin embargo Nongrados (1999), mencionó que *Anopheles pseudopunctipennis* no es susceptible a *Bacillus sphaericus* 2362 en ninguna dosis, pero su efectividad es mejor contra larvas de *Culex quinquefasciatus* a las 48 horas

Para agua de criadero en la figura N° 06 podemos demostrar que a las 48 h, 28 °C y 87% H.R. la cepa Bsp A1 es muy efectiva con larvas II y III en ambas concentraciones (muertes para larva II: 87%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y 99%= $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL y muertes para larva III: 71%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL), seguida por valores próximos para el estado larval II por las cepas Bsp A2 (93%= $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL), Bsp A3 (80%= $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL) y Bs (+) (76%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL). En cambio para el estado larval III destacan la cepa Bsp A1 (71%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL) seguida

por Bsp A3 (63%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL) y Bs (+) (61%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL) y finalmente la cepa Bsp A2 (54%= $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL).

En cambio para agua destilada en la figura N° 11 Podemos apreciar que la cepa Bs(+) tiene un mejor efecto sobre las larvas II de *Anopheles pseudopunctipennis* (99%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL y 72%= $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL), seguida por el efecto de la cepa Bsp A2 (99%= $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL), Bsp A1 (88%= $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL) y finalmente Bsp A3 (84%= $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL). El estado larval III en agua destilada y en ambas concentraciones es menos susceptible.

En el anexo N° 33 se aprecia el análisis de varianza del diseño experimental para agua de criadero, en el cual encontramos una alta significancia o variabilidad de los datos en los tratamientos usados además una alta variabilidad entre los datos del factor A (estados larvales) y del factor B (cepas bacterianas), independiente mente, además una alta significancia en la interacción AxB, en otras palabras una alta relación entre los estados larvales y el efecto de la cepas bacterianas; mas nó las concentraciones usadas. En cambio en el anexo 36 se aprecia el análisis de varianza del diseño experimental para agua destilada, en el cual encontramos una alta significancia o variabilidad de los datos en los tratamientos usados además una alta variabilidad entre los datos del factor A (estados larvales) y del factor B (cepas aisladas), independiente mente, pero no de la interacción AxB, esto puede deberse al tipo de agua usado, en este caso el agua destilada.

Por ello en los anexos N° 35 y 38 se aprecia el analisis de varianza de efectos simples-simples realizados a los datos obtenidos. Con estos datos podemos afirmar que en agua de criadero, tal como se ve en el anexo N° 35, existen niveles de significancia entre los estadios larvales y el efecto patogénico de las cepas aisladas, por lo que todas las cepas a una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL ocasionan mortandad sobre larvas II y III de *Anopheles*

pseudopunctipennis con valores altamente significativos. Estas pruebas también revelan que en agua de criadero y destilada (anexos N° 35 y 38) el estadio larval II es muy susceptible; al mismo tiempo sólo en agua destilada, el estadio larval III es más susceptible (tabla N° 07). Sin embargo hay que resaltar que los datos de mortandad relacionados a las concentraciones revelaron ser no significativos, lo que implica que ninguna concentración fue mejor que otra, por resultar no significativo, por lo que no podemos hacer comparaciones sobre cual concentración fue mejor ya que los resultados son cercanamente homogéneos. por lo que todas las cepas a una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL ocasionan mortandad sobre larvas II y III de *Anopheles pseudopunctipennis*

Sin embargo en el anexo N° 38 para agua destilada podemos ver que las cepas que mas destacan en cuanto al efecto patógeno sobre larvas II y III son las cepas Bsp A1, Bs(+) y finalmente Bsp A2, con valores significativos.

Los autores consultados por su parte nos mencionan diversas formas en las que actúan cepas de *Bacillus sphaericus* sobre larvas de anofelinos, al igual que sus efectos patógenos, así:

Davidson y colaboradores (1984), probaron *Bacillus sphaericus* 1593 y 2362 sobre larvas III y IV de *Culex tarsalis* produciendo de 83% a 100% de reducción larval a los 2 días y de 94 a 100% a los 4 días postratamiento. Luego Thiery y De Barjac (1989) probaron 142 cepas de *Bacillus sphaericus*, de diferentes serotipos (H5a5b, H6 y H25) provocando la muerte a larvas de *Anopheles stephensi*.

Por otro lado Sharma y colaboradores (1998), en Uttar, India probaron *Bacillus sphaericus* B-101, serotipo H5a5b, obteniendo una mortalidad mayor al 95% de larvas de anofelinos y culícidos después de 48 horas post tratamiento.

Flores y colaboradores (1998), en Lima-Perú, con dosis de 2.50 $\mu\text{g/mL}$ de δ -endotoxina de *Bacillus sphaericus* 1583, produjeron 92.75% de mortalidad de

larvas de *Anopheles* spp. Y, Nongrados y colaboradores (2000), mencionaron que Mittal y colaboradores en 1998, probaron formulaciones de *Bacillus sphaericus* cepa B-101 (serotipo H5a, 5b) sobre *Anopheles stephensi* obteniendo buenos valores de mortandad.

Otro aspecto poco considerado por los investigadores es la capacidad residual de la bacteria en laboratorio, de hecho las larvas muertas fueron colocadas en solución salina fisiológica (SSF), por espacio de 10 días, posteriores a la prueba luego las cepas fueron nuevamente aisladas a partir de las larvas. Aunque no se pudo controlar en número de UFC/mL reaisladas; se pudo comprobar que se trataba de las mismas cepas porque presentaron la morfología indicada, la coloración Gram (+) y porque cumplieron con las mismas respuestas a la identificación bioquímica realizadas anteriormente (anexo N° 3 al 10; tabla N° 03).

Esto hace ver la capacidad de persistencia de Bsp A1, Bsp A2, Bsp A3 y Bs (+) y de su posible capacidad de controlar larvas de anofelinos, por su concentración y capacidad de persistencia en el medio. De esta manera se comprobó en el presente trabajo los 4 postulados de Koch.

Algunos autores manifiestan que el efecto puede prolongarse desde las 24 horas hasta días o meses, por lo que estas cualidades podrían aprovecharse para aplicaciones en campo, así:

Zahiri y colaboradores (2002), indican que *Bacillus sphaericus* 2362, es reconocida por tener una importante persistencia y seguridad medio ambiental, por lo que es reconocido como un promisorio larvicida de mosquitos.

Skovmand y Bauduin (1997), observaron en Kotiokb-Senegal que esta bacteria controla *Anopheles gambiae*, y que es viable por espacio de 15 días.

Castro y colaboradores (1999), en Maynas-Loreto comprobaron que *Bacillus sphaericus* 2362 tuvo una actividad residual de 7 a 30 días contra larvas de

Anopheles darlingi, *Anopheles triannulatus*, *Anopheles mattogrossensis* y *Anopheles oswaldoi*.

En Venezuela, Berti y colaboradores (2000), comprobaron que el efecto de *Bacillus sphaericus* (Vectolex® CG 7.5%) se prolongó por 21 días sobre larvas de *Anopheles aquasalis*; expuestas a pleno sol y pH relativamente ácido.

Davidson y colaboradores (1984), luego de 3 días de tratamiento realsó *Bacillus sphaericus* cepa 1593 y 2362 a partir de larvas muertas, obteniendo 10^6 bacterias por larva, siendo una cifra considerable respecto al número inicial consumido.

Thiery (1998), indica que además, algunas cepas pueden mantenerse almacenado en una suspensión stock a 4°C por 3 a 9 años sin perder su potencia.

Ganushkina y colaboradores (2000), en estudios de laboratorio pudieron mantener la mortalidad larvaria por 2 meses sobre *Anopheles stephensi*.

Blanco y colaboradores (2000), obtuvieron una reducción larval de 95% de *Anopheles albimanus* a las 72 horas y con una persistencia de 4 meses en 46 localidades de Guatemala.

VI. CONCLUSIONES

1. Se procesaron 69 muestras de suelo y agua que procedieron de diferentes localidades de las provincias de Huamanga y Huanta, de las que se aislaron e identificaron 03 cepas de *Bacillus* tipificándolas como: *Bacillus sp.* Ayacucho 1 (Bsp A1), *Bacillus sp.* Ayacucho 2 (Bsp A2) y *Bacillus sp.* Ayacucho 3 (Bsp A3). Además se aisló una cepa control a partir de una formulación líquida del producto comercial "GRISELESF-2362" de los laboratorios biológicos farmacéuticos (LABIOFAM) de La Habana-Cuba. La cual se tipificó como *Bacillus sphaericus* control positivo Bs (+).
2. Las larvas II y III de *Anopheles pseudopunctipennis* fueron susceptibles al efecto biocida de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 horas de aplicado el biolarvicida a una temperatura de: 28°C a 30°C de día y de 26°C a 27°C de noche con 87% H.R. ocasionando un promedio del 60% de mortalidad. En agua destilada a una concentración de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bs(+) produjo 99% de mortalidad de larvas II pero a $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bsp A2 produjo el 99% de larvas II muertas seguida por Bsp A1 con 88%; Bsp A3 con 84% y Bs(+) con 71%. Para el estado larval III, en agua destilada a una concentración de $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bsp A3 produjo 75% de muertes seguida por Bs(+) con 56% ; pero con $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL la cepa Bsp A2 produjo 65% de muertes y Bsp A1 57% de muertes de larva III.

En cambio en agua de criadero la cepa Bsp A1 a una concentración de $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL produjo el 99% de muertes de larvas II, Bsp A2 93% y Bsp A3 80%; pero con $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL Bsp A1 produjo 87% de muertes de larvas II seguida por Bs(+) con 76%. Finalmente las larvas III en agua de criadero a $1,5 \times 10^{11}$ esp/mL resultaron susceptibles a Bsp A1 con 71% de muertes, Bsp A3 63% y Bs(+) 61%; pero a $3,5 \times 10^{11}$ esp/mL; la cepa Bsp A2 produjo 54% de las muertes de las larvas III.

VII. RECOMENDACIONES

Luego de la ejecución del presente trabajo de investigación se recomienda:

1. Realizar trabajos para determinar la biología y comportamiento y linajes de *Anopheles pseudopunctipennis* en condiciones de laboratorio y campo para futuras pruebas de susceptibilidad a microorganismos y otros controladores biológicos.
2. Realizar otras pruebas de tipificación en las cepas aisladas, tales como: serotípicas, moleculares o genéticas, para una mejor confirmación de especie.
3. Realizar bioensayos para la búsqueda de la concentración óptima para causar la mortalidad larvaria con cada cepa aislada y probar diferentes formulaciones sólidas y líquidas y el tiempo de acción de las bacterias, para insertarlos en programas de control de mosquitos de *Anopheles pseudopunctipennis* en la región.
4. Realizar trabajos para evaluar la capacidad residual de las bacterias tanto en laboratorio como en campo para su posible uso en control biológico.
5. Realizar investigaciones acerca de los dos estados imaduros de insectos Himenoptera y Coleoptera que demostraron tener cualidades de potenciales predadores de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbott Laboratorios. 1998.** Vectolex® 7,5GR. Larvicida biológico. Formulación granulada: *Bacillus sphaericus* serotipo H5a5b. pp 1-8 Chicago USA.
2. **Acosta, J. 1958.** Niveles básicos de susceptibilidad de *Anopheles pseudopunctipennis* al DDT y al Dieldrin en la región occidental del Perú. Tesis doctoral. Instituto de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima Perú.
3. **Aidara-Kane, A., Fontenille, D., Lochouarn, L., Cosma-Dumanoir, V. y Lecadet, M. 1998.** Characterization of entomopathogenic *Bacillus* samples isolated in Senegal and study of their Toxicity for Malaria vectors. Dakar Med. 43 (2): 170-173. Dakar-Senegal.
4. **Batista, S. 1998** Controle Microbiano de Insetos. 2da. Edición. Piracicaba. FEALQ. Sao Paulo-Brasil
5. **Baumann, P., Clark, M., Baumann, L. y Broadwell, A. 1991.** *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: Propriertis of the organism and its toxins. Microbiological Rewiews. Sept. 55 (3): 425 – 436. California-USA.
6. **Berti, J. Ramirez, X., Gonzales, J. y Herrea, M. 2000.** Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en criaderos naturales del estado de Sucre, Venezuela. Entomotropica; Abril 17 (1): 1 – 5.
7. **Berrocal, E., Carey, C., Rodríguez, L., Calampa, C. y Valdivia, L. 1998.** Evaluación del efecto de residualidad de *Bacillus sphaericus* (VECTOLEX ®) en el control de *Anopheles darlingi* en Iquitos – Perú. Dirección Regional de Salud. Loreto.
8. **Blanco, S., Martinez, A., Cano, O., Tello, G. y Mendoza, I. 2000.** Introducción of *Bacillus sphaericus* strain 2362 (GRISELESF) for biological control of malaria vector in Guatemala. Revista Cubana Medicina Tropical.

Jan-Apr 52 (1): 37-43.Cuba.

9. **Boletín de la oficina sanitaria panamericana. 1986.** Reseñas: Contol de la malaria en las Américas: Análisis crítico. 10 (5): 522 –539.Washington- USA.
10. **Botero, D. y Restrepo, M. 1992.** Parasitosis humanas. Corporación para Investigaciones Biológicas. 2da. Edición. Editorial Carvajal S.A. Medellín – Colombia.
11. **Calderón, G. 1995.** Clave para identificar especies de Anopheles (Diptera: Culicidae, Anophelinae) del Perú (adultos hembras). Revista peruana de Entomología. Setiembre 37:31 – 40. Perú.
12. **Calderón, G., Fernández, R. y Valle, J. 1995.** Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. Revista Peruana de epidemiología. Julio 8 (1): 5 – 21. Perú.
13. **Castro, J., Nongrados, D. y Mariños, C.1999.** Evaluación del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de mosquitos en Loreto –Perú. Revista Peruana de Entomologia. Octubre 41: 91 – 95. Perú.
14. **Cisneros, F. 1995.** Control de Plagas Agrícolas. 2da edición.Full Print S.R.L. Lima–Perú.
15. **Darboux, I., Nielsen-Le Roux, C., Charles, F. y Pauron, D. 2001.** The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect Biochem Mol Biol. Sep. 31(10):981-90. Paris-Francia.
16. **Davidson, W., Urbina, M., Payne, J., Mulla, S., Darwageh, H. Dulmage, T. y Correa, A. 1984.** Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as a larvicide in the aquatic environment. Applied and environmental microbiology. b; 44 (2): 160-165. Arizona-USA.
17. **Dennett, A. y Meisch, V.2000.** Effectiveness of aerial – and ground applied

- Bacillus* formulations against *Anopheles quadrimaculatus* larvae in Arkansas rice plots. J. Am. Mosq. Control Assoc. Sep. 16 (3): 229 – 233.USA.
18. **Entomo web. 2000.** Insectos vectores de enfermedades. Disponible en URL: www.nmca.org/Nmca98-13.
 19. **Flores, A., Castro, J., Balta, R., León, W., Palomino, M., Egusquiza, R. y Del Castillo, F. 1998.** Evaluación del potencial entomopatógeno de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) y *Bacillus sphaericus* frente al vector de la malaria *Anopheles spp.* Informe técnico-científico. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima-Perú.
 20. **Flores, A., Egusquiza, R., Vilcapoma, A. y León, J. 2000.** Distribución geográfica de *Bacillus thuringiensis* con potencial entomopatógeno. Disponible en URL: www.unmsm.edu.pe/biologia/investigacion. Lima -Perú
 21. **Frutos, J. 1994.** Biología y Control de Plagas Urbanas. 1° edición. Mc Graw-Hill – Interamericana de España.
 22. **Ganushkina, A., Lebedevan, N., Azizbekian, R. y Sergiev, P. 2000.** Duration of the larvicidal effect of spore crystalline mass of bacteria *Bacillus thuringiensis* spp. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* in the laboratory setting *Med Parazitol (Mosk)*. Oct. (4): 45-9. India
 23. **Garrity, G., Winters, M. y Searles, D. 2001.** Taxonomic outline of the prokaryotic genera. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Second Edition, Release 1.0, April. Disponible en URL: www.cme.msu.edu/bergeys/index/
 24. **Georghiu, P.1986.** The magnitude of the resistance problem in pesticide resistance: strategies and tactics for management. National Academy Press. Washington DC.
 25. **Harwood, J. 1993.** Entomología médica y veterinaria. 1ra Edición. LIMUSA. Noriega Editores. México.

26. **Horna, E., Maravi, A., Ango, H. y Taype, C. 1983.** Pruebas bioquímicas en bacteriología serie: microbiología N° 2. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho – Perú.
27. **IDEASS-CUBA. 2007.** Innovación para el Desarrollo y la Cooperación Sur-Sur. Disponible en URL: www.ideassonline.org. Cuba.
28. **Instituto Nacional de Salud (INS).2002.** Susceptibilidad de los vectores de malaria a los insecticidas en el Perú. Informe técnico de la evaluación de la susceptibilidad a los insecticidas en mosquitos adultos del género *Anopheles* de las regiones maláricas del Perú: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Documento Técnico N° 05, Enfermedades emergentes y reemergentes. Perú.
29. **Lacey, L., Heitzman, M., Meisch, M. y Biliodeaux, J. 1986.** Becomist Applied *Bacillus sphaericus* for the control of Riceland mosquitoes. Journal American Mosquitoes Control Association. 2(4): 548-551. USA.
30. **Lecuona, R. 1995.** Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. IMYZA– CICA– INTA Castelar. Argentina.
31. **López, G. 2000.** *Bacillus thuringiensis* y control de plagas. Disponible en URL: www.cinvestav.mx/publicaciones/ Mexico
32. **Mac Faddin, J. 1975.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana. Pag. 27-44, 50-60, 109-111, 140-148, 154-160, 168-172. Buenos Aires-Argentina.
33. **Majori, G., Ali, A. y Sabatinelli, G. 1987.** Laboratory and Field Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *Israilensis* and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles gambiae* S.L. and *Culex quinquefasciatus* in ougadougou Burkina Faso. Journal American Mosquitoes Control Association. 3 (1): 20-24. India
34. **Metcalf, R. y Luckmann, W. 1994.** Introducción al manejo de plagas de insectos. 2da reimpresión. Editorial LIMUSA – Noriega. México.

35. **Miranda, R. y Casta, A. 1997.** La erradicación de la malaria en Puerto Rico. *Revista Panamericana Salud Pública.* 2 (2): 146-150. Puerto Rico.
36. **Nielsen-Leroux, C. Pasteur, N., Pretre, J., Charles, F. y Ben, H. 2002.** Chevillonc. High Resistance to *Bacillus sphaericus*, binari toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): The complex situation of wets Mediterranean countries. *Entomological Society of America.* 39(5): 729-735. USA.
37. **Nongrados, D. 1999.** Evaluación de la actividad larvicida del *Bacillus sphaericus* 2362 sobre larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* (theobald) y *Culex quinquefasciatus* (Say) en bioensayos de laboratorio (Tesis) Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
38. **Nongrados, D., Castro, J., Mariños, C., Laguna, A. y Rios, R. 2000.** Eficacia del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* (theobald 1901) y *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) en bioensayos de laboratorio. *Revista Peruana de Biología.* 7 (2): 176-190. Perú.
39. **OMS. 1976.** Resistencia de los vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. 22º informe del comité de expertos de la OMS en insecticidas. Serie de Informes Técnicos N° 585, 91 pp. Washington DC.
40. **OMS. 1982.** Lucha biológica contra los vectores de enfermedades. 6to. informe del Comité de Expertos de la OMS en biología de los vectores y lucha antivectorial. Serie de Informes Técnicos N° 679, 39 pp. Washington DC.
41. **Porter, G. Davidson, W. y Jian-Wei, L. 1993.** Mosquitocidal toxins of Bacilli and their Genetic Manipulation for Effective Biological Control of Mosquitoes. *Microbiology y Reviews.* 57 (4): 838-861. California-USA.
42. **Prado, M. 1995.** Detección de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* en

- muestras de agua y suelo de las provincias de Huamanga y Huanta (Tesis).
Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de
Huamanga. Ayacucho-Perú.
43. **Rashed, S. y Mulla, S. 1989.** Factors influencing ingestion of particulate materials by mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 26(3): 210-216. California-USA.
 44. **Rodrigues, B., Tadeo, W. y Dias, J. 1998.** Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amaxomía. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. Jul. 93 (4): 441-444.
 45. **Rodríguez, M. 1989.** Control de Plagas de Plantas y Animales. Editorial LIMUSA S.A.de C.V. Noriega. Editores. Volumen 5. España.
 46. **Sharma, N. Sharma, T. y Prasad, H. 1998.** Impact of spherix (*Bacillus sphaericus* B-101, serotype H5a,5b) spraying on the control of mosquito breeding in rural areas of Farrukhabad district, Uttar Pradesh. *Indian J. Malariol*. Dec. 35 (4): 185 –196. Delhi-India.
 47. **Schwartz, L. Potvin, L., Coux, F, Charles, J. F., Berry, C. Hurnphreys, M. J. Jones, F., Bernhart, I., Dalla Serra, M. y Menestrina, G., 2001.** Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components *Membrane Biology*. Nov. 15; 184(2): 171-83. Francia.
 48. **Shidrawi, R. 1992.** Programa Mundial de la OMS para la Vigilancia de vectores resistentes a los plaguicidas. *Bol. Of Sanit. Panam*. 113 (3): 223 – 232. Washington DC.
 49. **Sneath, P. Mair, N., Sharpe, M. y Holt, J. 1986.** Editors *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Volume 2.USA.
 50. **Skovmand, O. y Bauduin, S. 1997.** Efficacy of granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae*

- in west African countries, *J. Vector Ecol.* Jun 22(1): 43-51. Senegal-Africa
51. **Tamez, P., Galán, L., Medrano, H., Garcia, C., Rodrigues, C., Gómez, R. y Tamez, R. 2001.** Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL. Junio Vol IV (2):* 143-152. México.
 52. **Thiery, I., Baldet, T., Barbazan, P., Becker, N., Junginger, B., Mas, Jp., Moulinier, C., Nepstad, K., Orduz S. y Sinegre J. 1997.** International indoor and outdoor evaluation of *Bacillus sphaericus* products: complexity of standardizing outdoor protocols. *J. Am Mosq Control Assoc.* Sep. 13(3): 218-26. Francia.
 53. **Thiery I, y Hamon, S. 1998.** Bacterial control of mosquito larvae investigation of stability of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* and *Bacillus sphaericus* standard powders. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* Dec. 14(4): 472-6. Francia.
 54. **Thiery, I. y DeBarjac, H. 1989.** Selection of the most potent *Bacillus sphaericus* strains based on activity ratios determined on three mosquito species. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 31: 577-581 Paris-Francia.
 55. **Vargas, F. 1996.** Fauna Anofelina (Diptera: Culicidae) en las localidades de Rosario y Omayá del valle del río Apurímac. 1996 (Tesis) Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú.
 56. **Vargas, H. 2001.** Enfermedades transmisibles. vectores de malaria en el departamento de Ayacucho. *Salud para todos. Revista Institucional de la Dirección Regional de Salud – Ayacucho.* Noviembre Año 1 N° 2: 11. Ayacucho-Perú.
 57. **Vargas, H. 2001.** Programa de control de malaria y OEM: Malaria en los valles interandinos del departamento de Ayacucho. *Salud para todos: Revista Institucional de la Dirección Regional de Salud Ayacucho.* Julio Año 1 N° 1: 23. Ayacucho-Perú.

58. **Vargas, H. 2003.** Información Oral; "Utilización de insecticidas en el control de Anophelinos en el departamento de Ayacucho. DISA-Ayacucho".
59. **Vargas, W. 1995.** Insectos en la iconografía Inka. Revista peruana de entomología. Diciembre 37: 23-29. Lima-Perú.
60. **Wei-Liu, J., Hindley, J., Portes, A. y Priest, F. 1993.** New High – Toxicity Mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* lacking a 100 – kilodalton – toxin gene. Applied and environmental microbiology. Oct. 59 (10): 3470 – 3473. Singapur.
61. **Weinzierl, R., Henn, T. y Koehler, G. 1981.** Microbial Insecticides. University of Florida. Cooperative Extension Service. Disponible en URL: http://edis.ipas.upas.ufl.edu/BODY_INO81. Florida-USA
62. **Zahiri, S., Su, T. y Mulla, S. 2002.** Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. J. Med. Entomol. May. 39(3): 513-20. California-USA.

ANEXOS

ANEXO N° 01

Tabla N° 10: Ficha Técnica del producto commercial GRISILESF® 2362 de los laboratorios biológicos farmacéuticos (LABIOFAM) de La Habana - Cuba

Ingrediente activo:	Familia Química:
1.- <i>Bacillus sphaericus</i> CEPA 2362	MICROBIOLOGICO
Formulación:	
SUSPENSIÓN CONCENTRADA SC	1x 10⁹ esp/mL
Ámbito de uso:	
SALUD PUBLICA	
Tipo de función:	
1.- INSECTICIDA	
Mecanismo de acción:	
1.- PRODUCCION DE DELTA ENDOTOXINA/ LISIS CELULAR DEL INTESTINO	
Modos de acción:	ESTOMACAL
Estado Fisiológico:	
Periodo de reingreso:	

USOS AUTORIZADOS

Agente (Plaga/enfermedad/efecto):	
1.- LARVAS DE MOSQUITOS <i>Aedes spp.</i>	2.- LARVAS DE MOSQUITOS <i>Culex spp.</i>
3.- LARVAS DE MOSQUITOS <i>Anopheles spp.</i>	4.- LARVAS DE MOSQUITOS <i>Psorophora spp.</i>
5.- LARVAS DE MOSQUITOS <i>Mansonia spp.</i>	6.- LARVAS DEMOSQUITOS <i>Uranotaenia spp.</i>

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

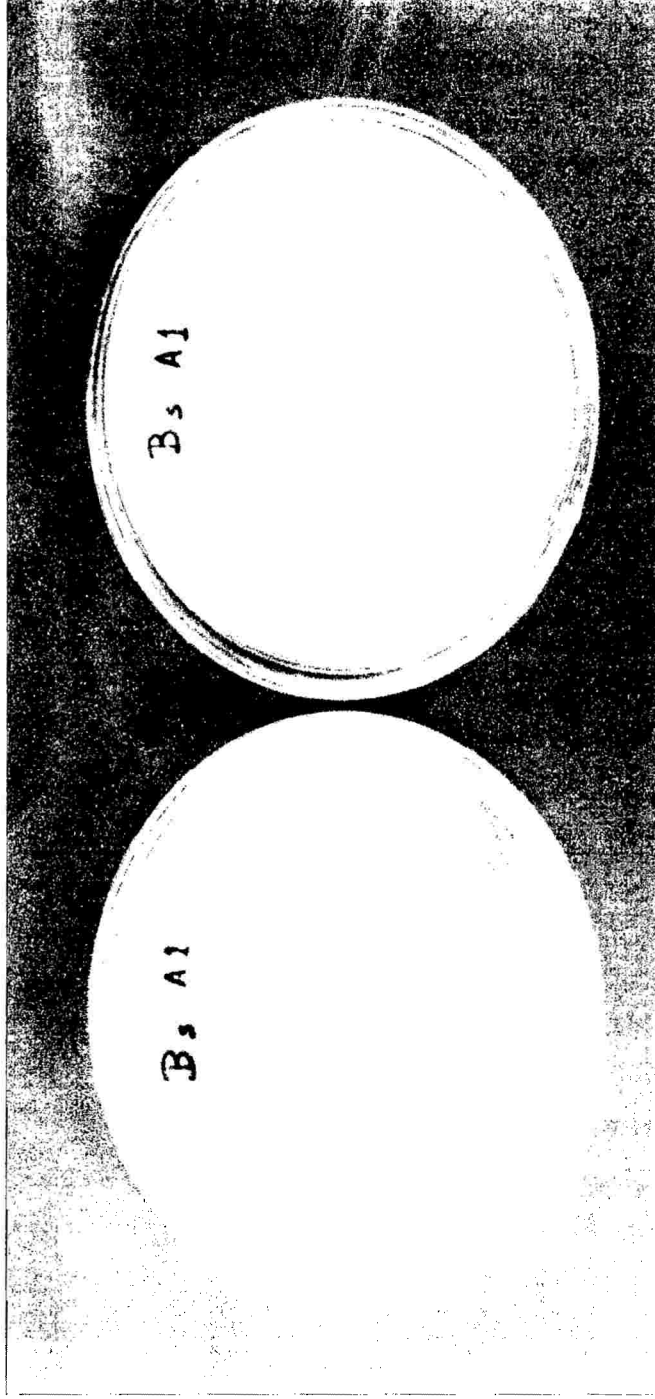
Categoría Toxicológica:	IV
DL50 ORAL:	> 5000 mg/kg
DL50 DERMAL:	> 2000 mg/kg
CL50 INHALATORIA:	N/D
Condiciones especiales de seguridad para el usuario:	
TOXICIDAD AVES:	PRACTICAMENTE NO TOXICO
TOXICIDAD PECES:	PRACTICAMENTE NO TOXICO
TOXICIDAD ABEJAS:	N/D
Mitigaciones de riesgos medioambientales:	

ANEXO N° 02

Tabla N° 11: Tipificación de las 4 cepas bacterianas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362 aisladas en el laboratorio de biotecnología microbiana FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

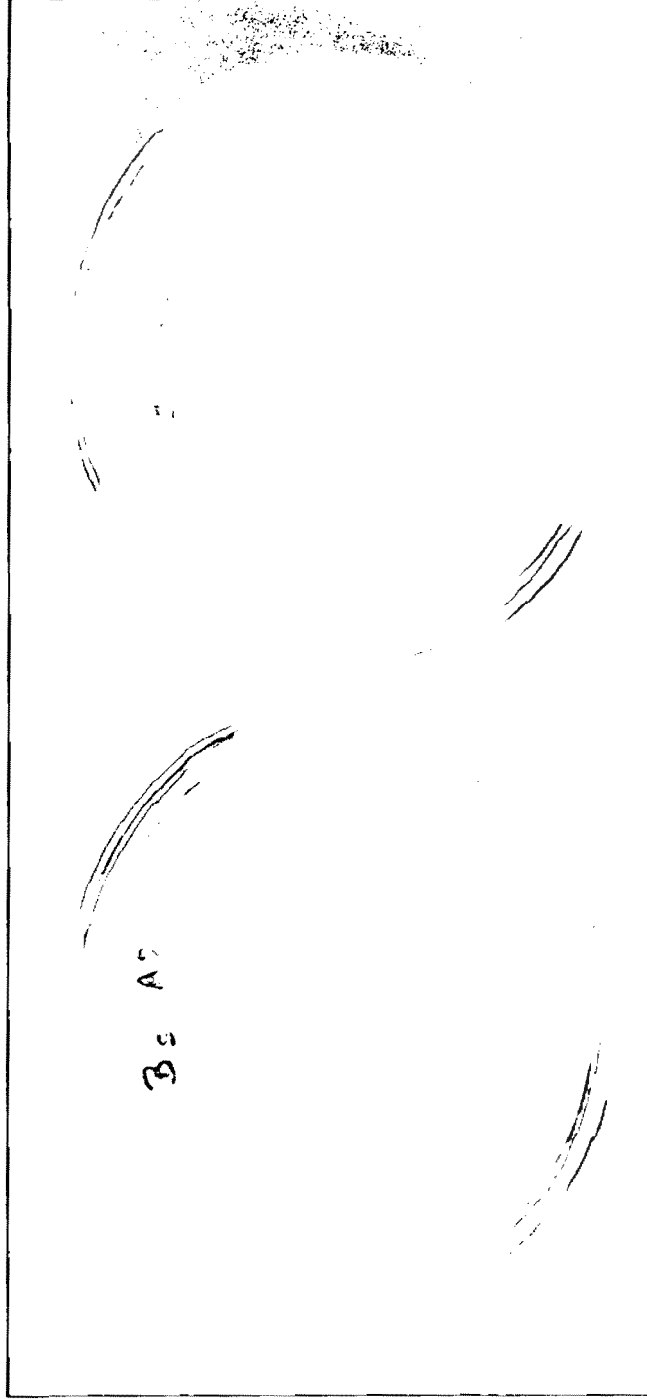
TIPIFICACION		LUGAR DE PROCEDENCIA
Nombre	Denominación	
<i>Bacillus sp.</i> Ayacucho 1	BspA1	Rivera río Huatatas-Huamanga
<i>Bacillus sp.</i> Ayacucho 2	BspA2	Cultivo alfalfa: totrilla-Huamanga
<i>Bacillus sp.</i> Ayacucho 3	BspA3	Cultivo de Cacao: Canayre/Llochegua/Huanta
<i>Bacillus sphaericus</i> 2362: control positivo	Bs(+)	Producto "GRISELESF 2362" Laboratorio LABIOFAM La Habana-Cuba

ANEXO N° 03



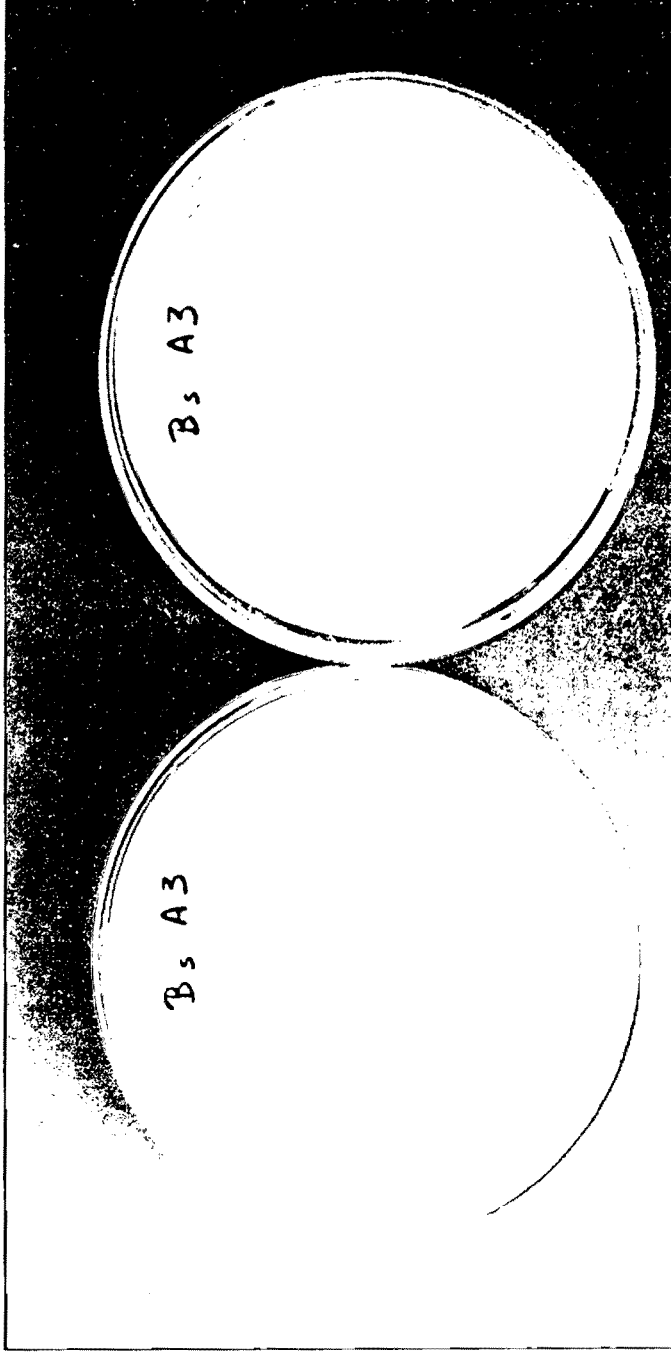
Fotografía N° 01: Placas de petri con agar nritrivo conteniendo *Bacillus* sp. Ayacucho 1 (Bsp A1) aislado de larvas muertas de *Anopheles pseudopunctipennis*. ASA 400; diafragma 2.8; velocidad 125"; luz natural. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 04



Fotografía N° 02: Placas de petri con agar nnitrito conteniendo *Bacillus* sp. Ayacucho 2 (Bsp A2) aislado de larvas muertas de *Anopheles pseudopunctipennis*. ASA 400; diafragma 2.8; velocidad 125"; luz natural. Laboratorio de bintecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 05



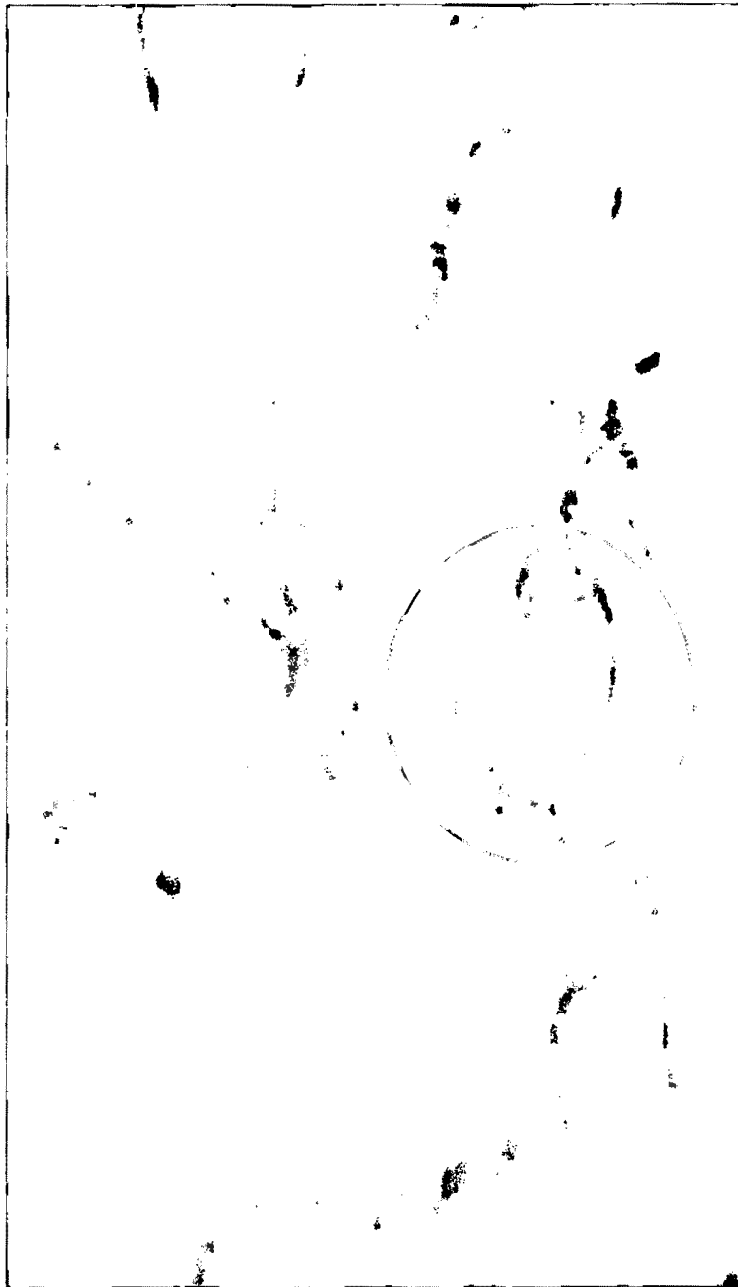
Fotografía N° 03: Placas de petri con agar nutritivo conteniendo *Bacillus* sp. Ayacucho 3 (Bsp A3) aislado de larvas muertas de *Anopheles pseudopunctipennis*. ASA 400; diafragma 2.8; velocidad 125"; luz natural. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 06



Fotografía N° 04: Placas de petri con agar nutritivo conteniendo *Bacillus sphaericus* 2362 (Bs(+)) aislado de larvas muertas de *Anopheles pseudopunctipennis*. ASA 400; diafragma 2.8; velocidad 125"; luz natural. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 07



Fotografía N° 05: Células coloreadas de *Bacillus sp.* Ayacucho 1 (Bsp A1) tomado con lente de inmersión a 1100 X de aumento. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 10



Fotografía N° 08: Células coloreadas de *Bacillus sphaericus* 2362 (Bs (+)) tomado con lente de Inmersión a 100 x de aumento.
Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 11



Fotografía N° 09: Vista Panorámica de ubicación para los criaderos de Viru Viru y Sillico. ASA 400; diafragma 4.0; velocidad 125"; luz natural, río Cachi. Huinta – Ayacucho (izquierda) y Angaraes – Huancavelica (derecha), 2000.

ANEXO N° 12



Fotografía N° 10: Criadero natural de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* de la localidad de Viru Viru – Huanta. ASA 400; diafragma 2.8, velocidad 125”;
luz natural. Huanta -Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 13



Fotografía N° 11: Criadero natural de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* de la localidad de Silco - Huancavelica. ASA 400; diafragma 4; velocidad 125"; luz natural. Angaraes - Huancavelica, 2000.

ANEXO N° 14



Fotografía N° 12: Larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* colectadas en cucharon. ASA 400; diafragma 4, velocidad 125"; luz natural. Huanta -Ayacucho, 2000.

ANEXON° 15



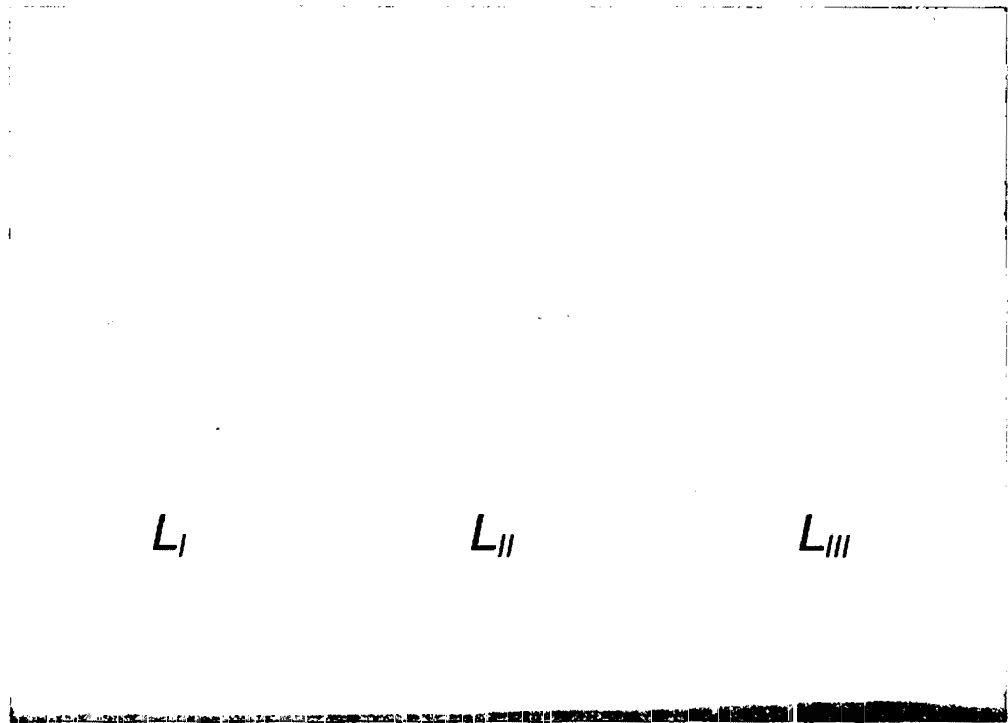
Fotografía N° 13: Colecta de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* por el método del cucharón, en criaderos. ASA 400; diafragma 4, velocidad 125"; luz natural. Huanta - Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 16



Fotografía N° 14: Baldes para el transporte al laboratorio, de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis*. ASA 400; diafragma 2.8, velocidad 60"; luz natural. Huanta -Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 17



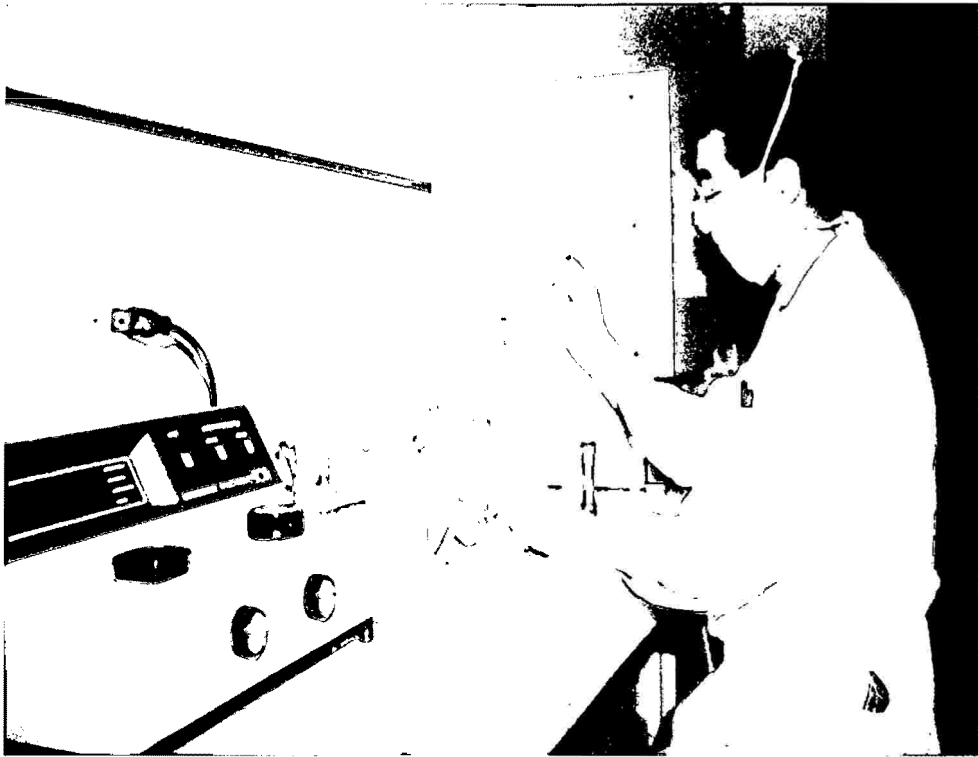
Fotografía N° 15: Larvas del I, II y III estado de *Anopheles pseudopunctipennis*, seleccionadas y divididas en bandejas plásticas dentro del laboratorio. ASA 400; diafragma 2, velocidad 60"; luz natural. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 18



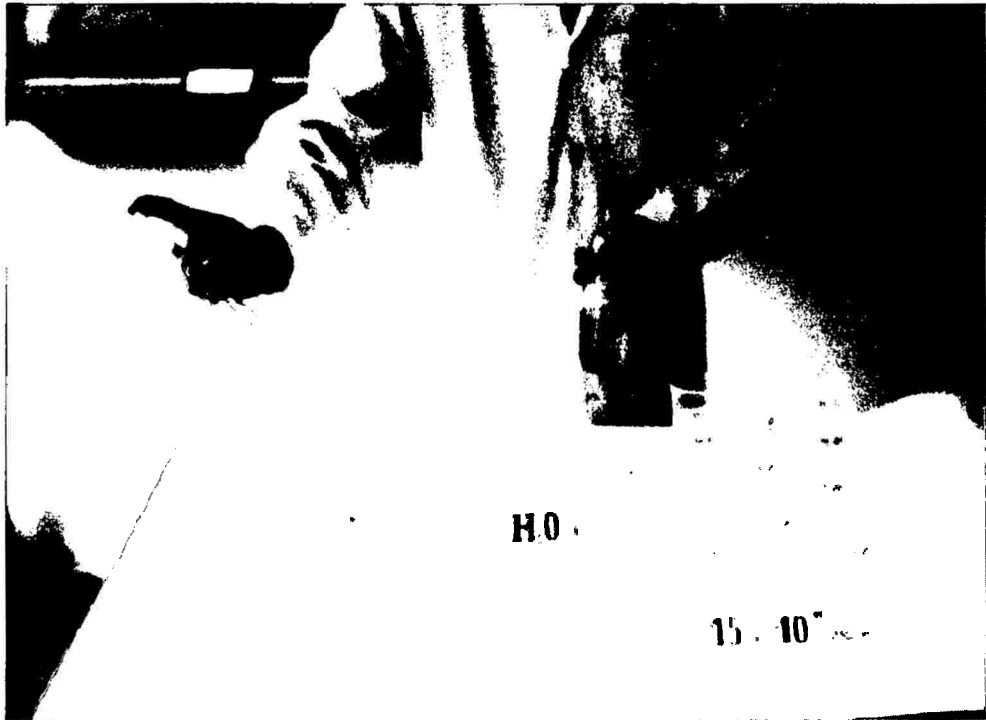
Fotografía N° 16: de Larvas IV y pupas de *Anopheles pseudopunctipennis* seleccionadas y separadas en bandejas de plástico. ASA 400; diafragma 2, velocidad 60"; luz natural. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 21



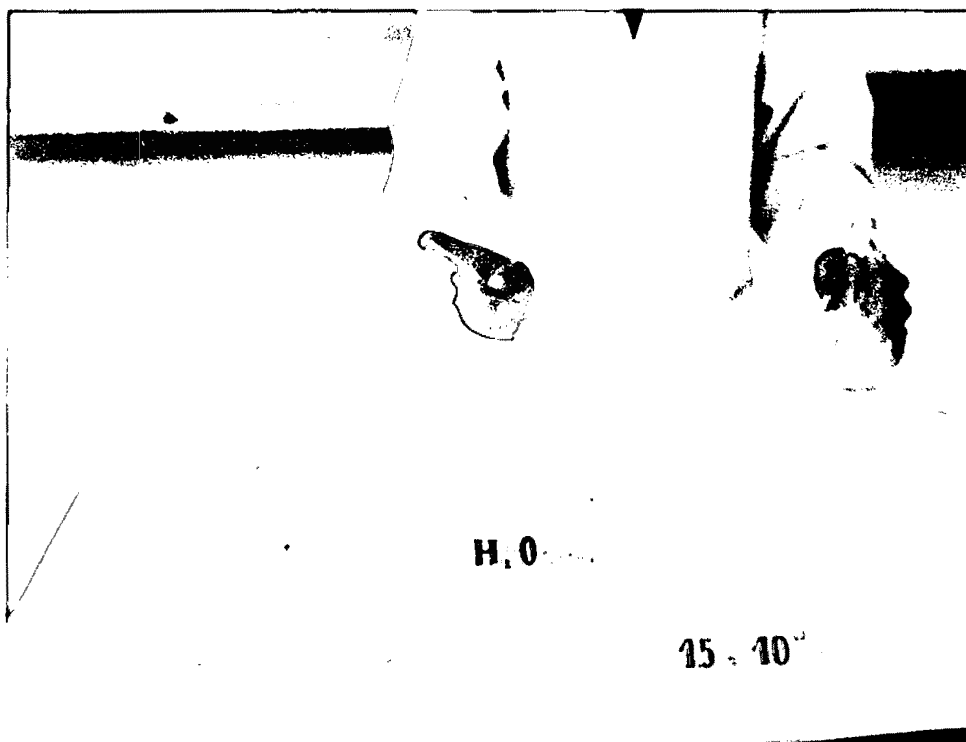
Fotografía N° 19: Proceso de evaluación de la curva de crecimiento y determinación de las UFC/mL de las cepas de *Bacillus sphaericus*. ASA 100; diafragma 4, velocidad 60"; luz artificial. Laboratorio de biotecnología microbiana. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 25



Fotografía N° 22: Inoculación del biolarvicida preparado con cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus sphaericus* 2362 en vasos conteniendo 25 larvas de II y III estadio de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua de criadero. ASA 400; diafragma 2.8, velocidad 125"; luz natural. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 26



Fotografía N° 23: Inoculación del biolarvicida preparado con cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus sphaericus* 2362 en vasos conteniendo 25 larvas de II y III estadio de *Anopheles pseudopunctipennis* en agua destilada. ASA 400; diafragma 2.8, velocidad 125"; luz natural. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 27



Fotografía N° 24: Evaluación de la mortalidad larvaria de *Anopheles pseudopunctipennis* en condiciones de laboratorio. ASA 400; diafragma 2.8, velocidad 125"; luz natural. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 28

Tabla N° 13: Registro de criaderos y larvas de anophelinos

LOCALIDAD _____
 ALTITUD _____
 DISTRITO _____ VALLE _____
 PROVINCIA _____ MES _____
 DEPARTAMENTO _____ COLECTOR _____

DATOS DE COLECTA		Area total del criadero	DETERMINACION DE LARVAS				TOTAL	Densidad Larvaria	Observaciones
Fecha	N°		Tipo criadero	I Estado	II Estado	III Estado			

CLASIFICADO _____ FECHA _____
 REVISADA POR _____ FECHA _____

* Ver clave al reverso

ANEXO N° 29

Tabla N° 14: Clave de identificación de tipos de criaderos de larvas de mcsquitos
TIPO DE CRIADERO

Natural	Artificial
A: Laguna, Lago B: Charco b1: Grande b2: Pequeño C: Pantano c1: Interior c2: margen c3: Depresión cenagosa D: Bosque inundado E: Infiltración, manantial F: Arroyo f1: Margen f2: Charco G: Remanso H: Hueco en la roca h1: Volcánico h2: Orilla de río I: Hueco del árbol J: Árbol caído K: Recipiente de origen animal en el suelo L: Axila de hojas - Epifita - Terrestre M: Flor, Bráctea, espata N: Ascidia	N: Pozo O: Huellas de animales P: Zanja, drenaje Q: Fuente, alcantarilla R: Canaletas S: Cuneñas T: Arrozales U: Piscigranjas u1: Grandes u2: Pequeñas

CARACTERÍSTICAS DEL CRIADERO

AGUA (a)	(b)	(c)
per = permanente tem = temporal	cla = clara tur = turbia col = colorada	dul = dulce sal = salobre

VEGETACIÓN EN EL CRIADERO (b)

(a)	(b)	(c)
abu = abundante esc = escasa nul = nula	flo = flotante alg = algas pas = pasto hie = hiervas leñ = leñas sum = sumergida eme = emergente	1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

FONDO DE CRIADERO (c)

bar = barro roc = roca
are = arena mat. org = materia orgánica
gra = grama

FAUNA EN EL CRIADERO (d)

(a) Insectos	(b) Aves	(c) Otros
Odonatos Coleópteros Otros		Vacuno Ovinos Caprinos

ANEXO N° 30

Tabla N° 15: Ficha de control y evaluación de mortalidad de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362

N° PRUEBA _____ HOJA DE APLICACIÓN (CEPA) _____

Tiempo de Exposición	DOSIS DE APLICACIÓN												FECHA DE LECTURA	HORA DE LECTURA
	1,5 X 10 ¹¹ esporas/mL			3,5 X 10 ¹¹ esporas/mL			1° R	2° R	3° R	1° R	2° R	3° R		
	1° R	2° R	3° R	1° R	2° R	3° R								
Poblac. Inicial	L =	L =	L =	L =	L =	L =	L =	L =	L =	L =	L =	L =		
4	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		
8	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		
12	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		
24	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		
48	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		
72	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		
Control	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		
Total	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =	M =		
	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =	V =		

Volumen de agua en los vasos: _____
 N° de especímenes por vaso: _____
 Tipo de agua: _____
 Temperatura: _____
 Humedad Relativa: _____
 Día: _____
 Noche: _____

Estadio larval utilizado _____
 R = repetición _____
 L = Población de larvas inicial _____
 M = Número de larvas muertas _____
 V = Número de larvas vivas _____

OBSERVACIONES: _____

ANEXO N° 32

Tabla N° 17: Análisis físico químico del agua de los criaderos.

PARÁMETROS	RESULTADOS	
	Criadero de Viru Viru	Criadero de Sillco
Turbidez (UNT)	0	0
Color (UC)	0	0
Temperatura (°C)	20 °C	21°C
Conductividad (Micromhos/cm)	320	320
Sólidos totales disueltos	224	220
pH	6.0	6.1
Cloruros (mg/L)	19	21
Nitritos (mg/L)	0.001	0.001

Realizado en: DGS. OSABAR –AYACUCHO

Ministerio de Salud

ANEXO Nº 33

Tabla Nº 18: Análisis de varianza de un diseño experimental de bloques completamente randomizados con arreglo factorial para el tratamiento de 2 estadios larvales de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a dos concentraciones de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 post aplicación, en agua de criadero. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Prueba de Significancia:

FUENTES DE VARIABILIDAD	GL	SC	CM	Fc	Ft 0.01	Ft 0.05	Nv. Sig.
BLOQUE	2	22.30	11.15	0.83	5.21	3.25	ns
TRATMTS	19	3474.18	182.85	13,56	2.26	1.97	**
FACT. A: Estados larvales	1	742.02	742.02	55.03	7.35	4.1	**
FACT. B: Cepas bacterianas	4	2342.43	585.61	43.43	3.86	2.62	**
FACT. C: Concentraciones	1	2.82	2.82	0.21	7.35	4.1	ns
AXB	4	235.23	58.81	4.36	3.86	2.62	**
AXC	1	25.35	25.35	1.88	7.35	4.1	ns
BXC	4	104.77	26.19	1.94	3.86	2.62	ns
AXBXC	4	21,57	5.39	0.40	3.86	2.62	ns
ERROR	38	512.37	13.48				
TOTAL	59	4008.85					

F.V. Fuentes de variabilidad

Fc Estadístico de Prueba

GL Grados de libertad

Ft prueba de significancia ** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)
 * Significativo (α 0.05)

S.C Suma de cuadrados

N.S.= No significativo

C.M Cuadrado medio

FACTORES:

A = Larva II (LII); Larva III (L III)

B =Testigo : Tes

Bacillus sp. Ayacucho 1 : BspA1

Bacillus sp. Ayacucho 2 : BspA2

Bacillus sp. Ayacucho 3 : BspA3

Bacillus sphaericus 2362 : Bs (+)

ANEXO N° 34

Tabla N°19: Análisis para el estudio de los efectos simples de los factores que provocan la mortalidad de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* frente cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 post aplicación, en agua de criadero. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft μ 0.05	Ft μ 0.01	Nv. Sig.
A: tes	1	1,50	1,50	71.40	4.1	7.35	**
A: Bsp A1	1	962.67	962.67	71.40	4.1	7.35	**
A: Bsp A2	1	468.17	468.17	34.72	4.1	7.35	**
A: Bsp A3	1	294.00	294.00	21.80	4.1	7.35	**
A: Bs (+)	1	228.17	228.17	16.92	4.1	7.35	**
B: L II	4	3827.73	956.93	70.97	2.62	3.86	**
B: L III	4	1327.60	331.90	24.62	2.62	3.86	**
A: 1,5X10 ¹¹ esp/mL	1	1232.67	1232.67	91.42	4.1	7.35	**
A: 3,5X10 ¹¹ esp/mL	1	2604.17	2604.17	193.14	4.1	7.35	**
C: L II	1	112.67	112.67	8.36	4.1	7.35	*
C: L III	1	28.17	28.17	2.09	4.1	7.35	ns
B: 1,5X10 ¹¹ esp/mL	4	2436.00	609.00	45.17	2.62	3.86	**
B: 3,5X10 ¹¹ esp/mL	4	2458.40	614.60	45.58	2.62	3.86	**
C: tes	1	1,50	1,50	0.11	4.1	7.35	ns
C: Bsp A1	1	32.67	32.67	2.42	4.1	7.35	ns
C: Bsp A2	1	104.17	104.17	7.73	4.1	7.35	*
C: Bsp A3	1	16.67	16.67	1.24	4.1	7.35	ns
C: Bs (+)	1	60.17	60.17	4.46	4.1	7.35	* a 0.05
Error	38	512.37	13.48				

ANEXO N° 35

Tabla N° 20: Análisis de varianza para el estudio de los efectos simples – simples de factores que provocan la mortalidad de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* frente cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 post aplicación' en agua de criadero Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

FUENTES DE VARIABILIDAD									
	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft.p.0.05	Ft.p.0.01	Nv. Sig.		
A- Test, 1.5X10 ¹¹	1	0.17	0.17	0.04	4.1	7.35	NS		
A- Bsp A1 y concentración 1.5X10 ¹¹ esp/mL entre los estados larvales	1	228.17	228.17	16.92	4.1	7.35	**		
A- Bsp A2 y concentración 1.5X10 ¹¹ esp/mL entre los estados larvales	1	104.17	104.17	7.73	4.1	7.35	*		
A- Bsp A3 y concentración 1.5X10 ¹¹ esp/mL entre los estados larvales	1	24.00	24.00	1.78	4.1	7.35	NS		
A- Bs(+), 1.5X10 ¹¹	1	20.17	20.17	1.50	4.1	7.35	NS		
A- Test, 3.5X10 ¹¹	1	0.67	0.67	0.05	4.1	7.35	NS		
A- Bsp A1 y concentración 3.5X10 ¹¹ esp/mL entre los estados larvales	1	253.50	253.50	18.80	4.1	7.35	**		
A- Bsp A2 y concentración 3.5X10 ¹¹ esp/mL entre los estados larvales	1	130.67	130.67	9.69	4.1	7.35	*		
A- Bsp A3 y concentración 3.5X10 ¹¹ esp/mL entre los estados larvales	1	150.00	150.00	11.12	4.1	7.35	*		
A- Bs(+), 3.5X10 ¹¹	1	112.67	112.67	8.36	4.1	7.35	*		
B- L ^I , 1.5X10 ¹¹	1	885.07	885.07	65.64	4.1	7.35	**		
B- L ^I , 3.5X10 ¹¹	1	1053.60	1053.60	78.14	4.1	7.35	**		
B- L ^{II} , 1.5X10 ¹¹	1	463.07	463.07	34.34	4.1	7.35	**		
B- L ^{II} , 3.5X10 ¹¹	1	302.27	302.27	22.42	4.1	7.35	**		
C- L ^I , Test	1	0.67	0.67	0.05	4.1	7.35	NS		
C- L ^I , Bsp A1	1	10.67	10.67	0.79	4.1	7.35	NS		
C- L ^I , Bsp A2	1	32.67	32.67	2.42	4.1	7.35	NS		
C- L ^I , Bsp A3	1	2.67	2.67	0.20	4.1	7.35	NS		
C- L ^I , Bs(+)	1	0.67	0.67	0.05	4.1	7.35	NS		
C- L ^{II} , Test	1	0.17	0.17	0.01	4.1	7.35	NS		
C- L ^{II} , Bsp A1	1	6.00	6.00	0.44	4.1	7.35	NS		
C- L ^{II} , Bsp A2	1	20.17	20.17	1.50	4.1	7.35	NS		
C- L ^{II} , Bsp A3	1	32.67	32.67	2.42	4.1	7.35	NS		
C- L ^{II} , Bs(+)	1	48.17	48.17	3.57	4.1	7.35	NS		
Error	38	512.37	13.48						

ANEXO N° 36

Tabla N° 21: Análisis de varianza de un diseño experimental de bloques completamente randomizados con arreglo factorial para el tratamiento de 2 estadios larvales de *Anopheles pseudopunctipennis* frente a dos concentraciones de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 post aplicación, en agua destilada. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

Prueba de Significancia:

FUENTES DE VARIABILIDAD	GL	SC	CM	Fc	Ft 0.01	Ft 0.05	Nv.Sig.
BLOQUE	2	54.233	27.117	2.655	5.21	3.25	ns
TRATMTS	19	3804.600	200.242	19.606	2.26	1.97	**
FACT. A: Estados larvales	1	576.600	576.600	56.457	7.35	4.1	**
FACT. B: Cepas bacterianas	4	3006.767	751.692	73.600	3.86	2.62	**
FACT. C: Concentraciones	1	0.267	0.267	0.026	7.35	4.1	ns
AXB	4	153.900	38.475	3.767	3.86	2.62	ns
AXC	1	0.000	0.000	0.000	7.35	4.1	ns
BXC	4	48.567	12.142	1.189	3.86	2.62	ns
AXBXC	4	18.500	4.625	0.453	3.86	2.62	ns
ERROR	38	388.100	10.213				
TOTAL	59	4246.933					

F.V. Fuentes de variabilidad

G.L. Grados de libertad

S.C. Suma de cuadrados

C.M. Cuadrado medio

Fc Estadístico de Prueba

Ft prueba de significancia

** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)

* Significativo (α 0.05)

N.S. = No significativo

FACTORES:

A = Larva II (LII); Larva III (L III)

B=Testigo

: Tes

Bacillus sp. Ayacucho 1

: Bsp A1

Bacillus sp. Ayacucho 2

: Bsp A2

Bacillus sp. Ayacucho 3

: BspA3

Bacillus sphaericus 2362 : Bs (+)

ANEXO N° 37

Tabla N° 22: Análisis para el estudio de los efectos simples de los factores que provocan la mortalidad de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* frente cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 post aplicación, en agua destilada. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

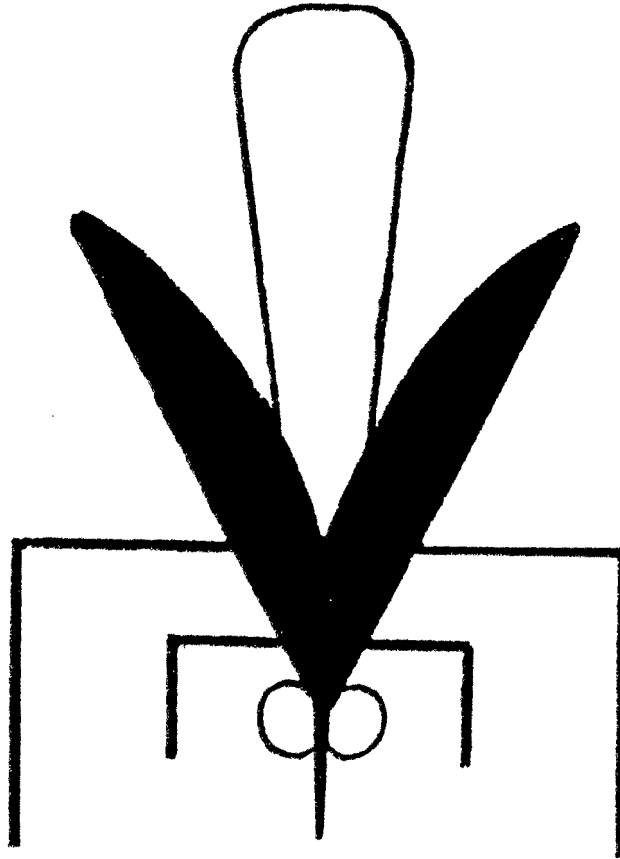
FUENTES DE VARIABILIDAD		G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft μ 0.05	Ft μ 0.01	Nv. Sig.
A: tes	Entre estados larvales y el testigo	1	1,50	1,50	37.60	4.1	7.35	**
A: Bsp A1	Entre estados larvales y la cepa Bsp A1	1	384.00	384.00	37.60	4.1	7.35	**
A: Bsp A2	Entre estados larvales y la cepa Bsp A2	1	384.00	384.00	37.60	4.1	7.35	**
A: Bsp A3	Entre estados larvales y la cepa Bsp A3	1	150.00	150.00	14.69	4.1	7.35	**
A: Bs (+)	Entre estados larvales y la cepa Bs(+)	1	541,50	541,50	53.02	4.1	7.35	**
B: L II	Entre las cepas bacterianas y el estado Larval II	4	4327.07	1081.77	105.92	2.62	3.86	**
B: L III	Entre las cepas bacterianas y el estado Larval III	4	1994.27	498.57	48.82	2.62	3.86	**
A: 1,5X10 ¹¹ esp/mL	Entre estados larvales y la concentración 1,5X10 ¹¹ esp/mL	1	1441,50	1441,50	141.14	4.1	7.35	**
A: 3,5X10 ¹¹ esp/mL	Entre estados larvales y la concentración 3,5X10 ¹¹ esp/mL	1	1441,50	1441,50	141.14	4.1	7.35	**
C: L II	Entre las concentraciones y el estado larval II	1	0.67	0.67	0.07	4.1	7.35	ns
C: L III	Entre las concentraciones y el estado larval III	1	0.67	0.67	0.07	4.1	7.35	ns
B: 1,5X10 ¹¹ esp/mL	Entre las cepas bacterianas y la concentración 1,5X10 ¹¹ esp/mL	4	3010.40	752.60	73.69	2.62	3.86	**
B: 3,5X10 ¹¹ esp/mL	Entre las cepas bacterianas y la concentración 3,5X10 ¹¹ esp/mL	4	3100.27	775.07	75.89	2.62	3.86	**
C: tes	Entre las concentraciones y el testigo	1	1,50	1,50	0.15	4.1	7.35	ns
C: Bsp A1	Entre las concentraciones y la cepa Bsp A1	1	42.67	42.67	4.18	4.1	7.35	ns
C: Bsp A2	Entre las concentraciones y la cepa Bsp A2	1	10.67	10.67	1.04	4.1	7.35	ns
C: Bsp A3	Entre las concentraciones y la cepa Bsp A3	1	42.67	42.67	4.18	4.1	7.35	ns
C: Bs (+)	Entre las concentraciones y la cepa Bs(+)	1	0.17	0.17	0.02	4.1	7.35	ns
	Error	38	388.10	10.21				

ANEXO N° 38

Tabla N° 23: Análisis de varianza para el estudio de los efectos simples – simples de factores que provocan la mortalidad de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* frente cepas de *Bacillus sp.* y *Bacillus sphaericus* 2362, a las 48 post aplicación, en agua destilada. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

FUENTES DE VARIABILIDAD									
	G.L.	S.C.	C.M.	Fo	Ft μ 0,05	Ft μ 0,01	Nv. Sig.		
A: Tes, 1,5X10 ¹¹	1	0.167	0.167	0.016	4.1	7.35	NS		
A: Bsp A1, 1,5X10 ¹¹	1	130.667	130.667	12.794	4.1	7.35	* A 0,05		
A: Bsp A2, 1,5X10 ¹¹	1	54.000	54.000	5.287	4.1	7.35	NS		
A: Bsp A3, 1,5X10 ¹¹	1	42.667	42.667	4.178	4.1	7.35	NS		
A: Bs(+), 1,5X10 ¹¹	1	150.000	150.000	14.687	4.1	7.35	NS		
A: Tes, 3,5X10 ¹¹	1	0.667	0.667	0.065	4.1	7.35	NS		
A: Bsp A1, 3,5X10 ¹¹	1	66.667	66.667	6.528	4.1	7.35	* A 0,05		
A: Bsp A2, 3,5X10 ¹¹	1	150.000	150.000	14.687	4.1	7.35	*		
A: Bsp A3, 3,5X10 ¹¹	1	32.667	32.667	3.198	4.1	7.35	ns		
A: Bs(+), 3,5X10 ¹¹	1	121.500	121.500	11.896	4.1	7.35	*		
B: L II, 1,5X10 ¹¹	1	1075.333	1075.333	105.289	4.1	7.35	**		
B: L II, 3,5X10 ¹¹	1	1121.733	1121.733	109.832	4.1	7.35	**		
B: L III, 1,5X10 ¹¹	1	519.067	519.067	50.823	4.1	7.35	**		
B: L III, 3,5X10 ¹¹	1	511.600	511.600	50.092	4.1	7.35	**		
C: L II, Tes	1	0.167	0.167	0.016	4.1	7.35	NS		
C: L II, Bsp A1	1	2.667	2.667	0.261	4.1	7.35	NS		
C: L II, Bsp A2	1	16.667	16.667	1.632	4.1	7.35	NS		
C: L II, Bsp A3	1	13.500	13.500	1.322	4.1	7.35	NS		
C: L II, Bs(+)	1	0.667	0.667	0.065	4.1	7.35	NS		
C: L III, Tes	1	0.667	0.667	0.065	4.1	7.35	NS		
C: L III, Bsp A1	1	24.000	24.000	2.350	4.1	7.35	NS		
C: L III, Bsp A2	1	0.667	0.667	0.065	4.1	7.35	NS		
C: L III, Bsp A3	1	8.167	8.167	0.800	4.1	7.35	NS		
C: L III, Bs(+)	1	0.167	0.167	0.016	4.1	7.35	NS		
Error	38	388.100	10.213						

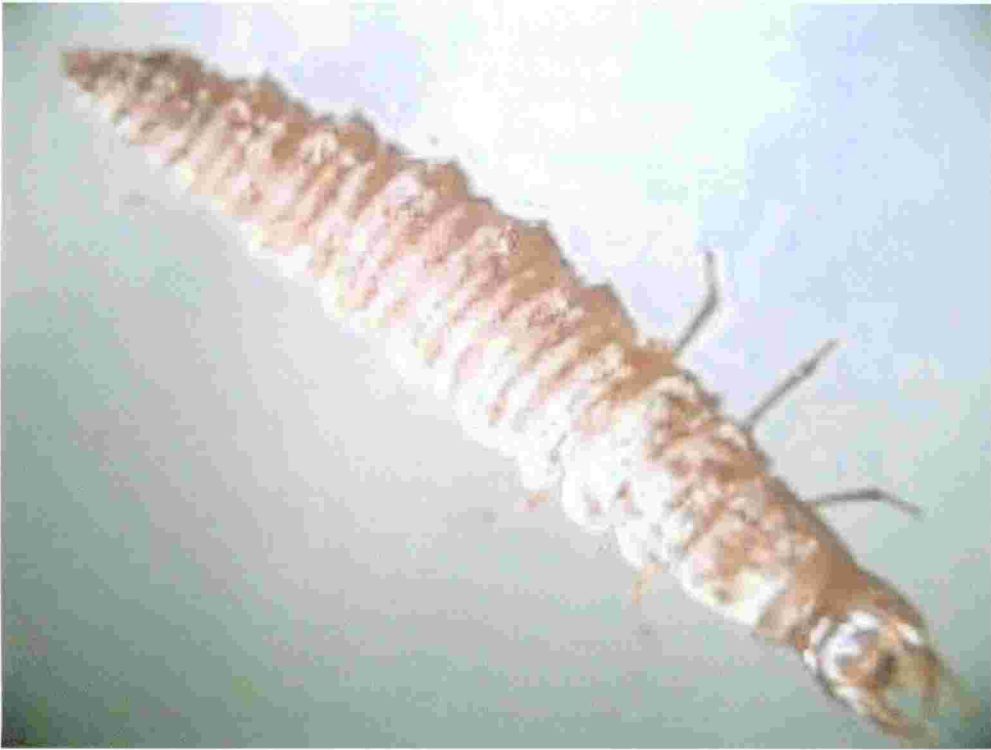
ANEXO N° 39



Un mosquito en posición de succión, posiblemente un anophelino. Se observa la presencia de un par de ojos grandes, por delante de la prolongación aguzada correspondería a la armadura bucal; un par de alas propias de dípteros; patas articuladas en número de dos pares, no aparece el tercer par, ya que de tratarse de un anophelino, estos acostumbran a

Figura N° 12: Representación gráfica del género anopheles en una cerámica Inca. Fuente: Vargas M. W. Revista Peruana de Entomología. 37:29 - 29 Dic. 1994 (Set. 1995)

ANEXO N° 40



Fotografía N° 25: Estadio inmaduro de insecto que demostró un comportamiento predador de *Anopheles pseudopunctipennis*, 450 X de aumento. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.

ANEXO N° 41



Fotografía N° 26: Estadio maduro de insecto que demostró un comportamiento predador de *Anopheles pseudopunctipennis* 450 X de aumento. Laboratorio de zoología. FCB - UNSCH. Ayacucho, 2000.