

digitalizado do original: Caderno de Farmácia, v. 3, n. 1/2, p. 47-57, 1987

UTILIZAÇÃO DE *Bacillus sphaericus* NEIDE, 1904 PARA CONTROLE DE *Culex quinquefasciatus*

¹GERMANI, J. C.; ²LEAL, L. F. A.; ³NETO, A. L. R.; ⁴SILVEIRA, S. M.; ⁵MINGUELLI, R. M.;

¹ Prof. Tecnologia Bioquímica - Faculdade de Farmácia/UFRGS; ² Prof. Tecnologia de Alimentos - ICTA/UFRGS; ³ Prof. Parasitologia Aplicada - Dirigente do Serviço de Controle de Vetores da Secretaria da Saúde e Meio Ambiente; ⁴ Médico Veterinário; ⁵ Acadêmica do Curso de Farmácia/UFRGS.

RESUMO: Observou-se neste trabalho a resposta de larvas de terceiro estágio de *C. quinquefasciatus* à uma formulação experimental de *B. sphaericus* cepa 2362. A tecnologia para obtenção do larvicida obedeceu às etapas de preparação do inóculo, fermentação envolvendo um subproduto industrial (soro de queijo), e formulação líquida com agente dispersante. Com uma mortalidade nula nos controles com água ou com placebo produzido com os agentes formulantes, observou-se como resultados em duas séries uma CL_{50} de $0,0007323 \pm 0,0001$ e CL_{90} de $0,0042320 \pm 0,0001$ ppm numa delas e CL_{50} de $0,0006399 \pm 0,0001$ e CL_{90} de $0,0066370 \pm 0,0001$ ppm na outra, considerando-se 10% de creme sedimentado utilizado nas formulações. Conclui-se que 0,01 ppm de formulações experimentais consideradas integralmente seria uma concentração eficaz num meio aquático semelhante ao testado, o que é estimulante para um incremento da produção e a continuidade dos testes com este agente de controle.

UNITERMOS: Controle biológico; *Bacillus sphaericus*, *Culex quinquefasciatus*.

ABSTRACT: *Bacillus sphaericus* NEIDE, 1904 IN THE CONTROL OF *Culex quinquefasciatus*. The susceptibility of third-instar *Culex quinquefasciatus* say larvae to *Bacillus sphaericus* strain 2362 experimentally produced was observed. The larvicide was obtained following fermentation in cheese serum, a by-product of this industrial production, and formulation as an aqueous suspension using surfactant agents. The control mortality either in a non-active formulation or in distilled water was negligible. The lethal concentrations derived from probit analysis were CL_{50} of $0,0007323 \pm 0,0001$ and CL_{90} of $0,0042320 \pm 0,0001$ ppm in one series and CL_{50} of $0,0006399 \pm 0,0001$ and CL_{90} of $0,0066370 \pm 0,0001$ ppm in the other one, considering only the 10% of creamy sediment used for formulation. It is proposed that 0,01 ppm of similar formulations considered as a whole could be used for an effective mortality in similar water conditions, what is promising for an enhanced production of the larvicide and future field scale trials.

KEYWORDS: Biological Control, *Bacillus sphaericus*, *Culex quinquefasciatus*.

INTRODUÇÃO

Bacillus sphaericus é uma bactéria conhecida de longa data como produtora de endotoxinas, as quais mais recentemente foram descobertas como potentes entomocidas para culicídeos, à semelhança das produzidas por outro agente, o *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac, 1978. A reciclagem em meio natural do *B. sphaericus* é, no entanto, considerada muito mais provável do que a do outro agente (RUAS NETO & OLIVEIRA, 1985).

Estão descritas numerosas cepas deste agente bacteriano, das quais apenas algumas poucas produzem tais toxinas a um nível que permita seu emprego como agente biocontrolador de culicídeos em sua fase larval. Destas cepas as codificadas como SSII-1, 1563, 2297 e 2362 são as mais conhecidas do ponto de vista biológico. As três últimas cepas citadas foram consideradas altamente promissoras para utilização

biotecnológica em produção de larvicidas biológicos (DAVIDSON, 1983). Atualmente as formulações com a cepa 2362 são consideradas as mais eficientes para programas de controle de mosquitos, dado à alta toxicidade e custo de obtenção relativamente baixo (NICOLAS & DOSSOU-YOVO, 1987).

O custo de produção de formulações de *B. sphaericus* tem sido considerado extremamente baixo, quando subprodutos industriais são utilizados (DHARMSTHITI et alii, 1985).

Entre os gêneros de culicídeos são conhecidos como susceptíveis *Culex* e *Anopheles*, estando em estudo a susceptibilidade de outros gêneros. As espécies de *Aedes* são comprovadamente refratárias (BURGES, 1982).

A espécie *C. quinquefasciatus* é considerada o alvo prioritário da utilização deste agente de controle biológico, devido à alta susceptibilidade das larvas desta espécie

(DAVIDSON, 1982). Sua importância deve-se ao fato de ser o principal mosquito urbano em todo o mundo tropical e subtropical, causando incômodo, insônia, culicose (alergias) e em algumas áreas inclusive do Brasil é o principal transmissor da filariose bancroftiana (PESSOA, 1978). O controle desta espécie no mundo inteiro ocorre principalmente com larvicidas, na maior parte das vezes, químicos. O custo destes Programas é sempre elevado e, além disto, existem problemas do impacto ambiental e da resistência que vem ocorrendo em ritmo acelerado (BROWN, 1986). Na busca de alternativas eficientes e aceitáveis do ponto de vista ambiental insere-se o presente trabalho que visa estabelecer o potencial de formulações locais de *B. sphaericus* para o controle de culicídeos susceptíveis como o *C. quinquefasciatus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente procedeu-se a extração de sedimentos ou "cremes" obtidos de culturas de *B. sphaericus* 2362 em fermentação aeróbica. O inoculo inicial foi fornecido por United States Department of Agriculture.

A fermentação procedeu-se em copos de Erlmeneyer de 250 mL, em agitadores de plataforma, a cerca de 200 rpm e 30 °C por três dias. Como meio de fermentação foi utilizado soro de queijo não diluído autoclavado a 115 °C.

Os sedimentos obtidos em centrifugação de 6000 rpm foram formulados a 10 % em água destilada estéril com adjuvantes surfactantes para formação de suspensão.

Larvas de *C. quinquefasciatus* foram obtidas de ovos coletados em focos urbanos em Porto Alegre e criadas em bandejas com leite em pó adicionado diariamente em reduzidas quantidades, até o estágio de L₃.

Os bioensaios seguiram o método descrito por VANDEKAR & DULMAGE, 1983 para testes com larvicidas biológicos em copos. O primeiro teste teve como controle larvas colocadas em água destilada, sendo que no segundo usou-se placebo dissolvido em água destilada.

Para a dosagem dos recipientes, utilizou-se uma suspensão estoque de um litro a 200 ppm, da qual então se derivou então uma segunda suspensão a 20 ppm. Foram a seguir pesadas alíquotas para adição em copos de 200 mL. No primeiro teste utilizaram-se quatro réplicas para cada concentração e controle, sendo que no segundo apenas três.

Os resultados dos testes em termos de mortalidade por concentração foram analisados pelo desenvolvimento "Probit" com utilização de log ppm x 10⁴ referentes à concentração de creme de cultura contra "Probitos" dos percentuais de

mortalidade. Houve avaliação das aproximações pelo "qui-quadrado". No caso de significância deste último, realizou-se um fator de correção para heterogeneidade, o qual corrige a variação ou erro padrão da inclinação da reta calculada.

RESULTADOS

As TABELAS 1 e 2 demonstram os resultados, obtidos em duas séries de testes, com as respectivas CL₅₀ e CL₉₀, mais os erros padrão obtidos pela utilização da variância de cada um. Pode-se notar a grande proximidade das concentrações letais obtidas nas duas séries, mesmo com um x² significativo no primeiro caso. Em ambos os casos a mortalidade no controle foi nula.

Os parâmetros obtidos com o desenvolvimento de probitos estão nas Tabelas 3 e 4 e Figura 1, com as equações deduzidas. É nítida a diferença do valor de b (inclinação) nos dois casos, mas, numa amostra de testes reduzida como esta, tal diferença é de difícil avaliação.

Tabela 1: Mortalidade em função da concentração de sedimento de cultura de *B. sphaericus* formulado a 10%. Controle em água.

Concentração (mg/L)	Nº de larvas	Mortalidade
0,01	135	96,26
0,005	135	89,28
0,003	135	89,30
0,001	135	66,95
0,0005	135	32,49

CL₅₀ (Análise de probitos) = 0,0007323 ± 0,0001 mg/L
 CL₉₀ (Análise de probitos) = 0,0042320 ± 0,0001 mg/L

Tabela 2: Mortalidade em função da concentração de sedimento de cultura de *B. sphaericus* formulado a 10%. Controle em placebo.

Concentração (mg/L)	Nº de larvas	Mortalidade
0,01	135	92,30
0,005	135	87,92
0,003	135	81,89
0,001	135	65,21
0,0005	135	40,50

CL₅₀ (Análise de probitos) = 0,0006399 ± 0,0001
 CL₉₀ (Análise de probitos) = 0,0066370 ± 0,0001

Tabela 3: Análise de probitos da primeira série de testes.

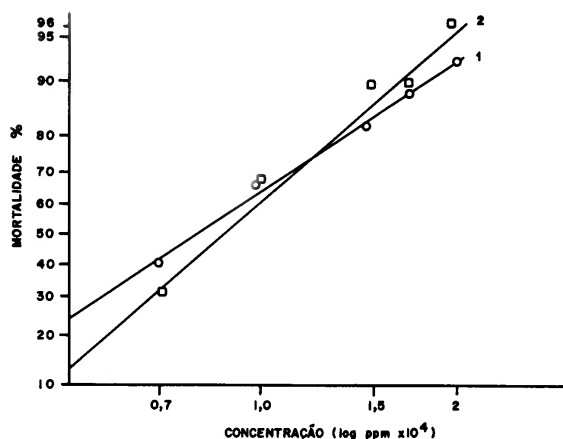
DOSE (ppm x 10 ⁴)	N	P	Y
100	135	96,26	6,91
50	135	89,30	6,41
30	135	89,30	6,04
10	135	67,00	5,23
5	135	32,49	4,73

Y = 3,55 + 1,68 x

Tabela 4: Análise de probitos da segunda série de testes.

DOSE (ppm x 10 ⁴)	N	P	Y
100	135	92,30	6,50
50	135	87,92	6,12
30	135	81,89	5,84
10	135	65,21	5,24
5	135	40,50	4,86

$Y=3,98 + 1,26x$

**Figura 1:** Curvas de mortalidade obtidas com o desenvolvimento do teste de probitos, em função da ação do sedimento de cultura de *B. sphaericus* formulado a 10 % sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*: controle água destilada (1) e controle placebo (2). X^2 curva 1 = 10,12; curva 2 = 2,87.

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

As toxinas das cepas mais promissoras de *B. sphaericus* situadas na parede do esporo, são extremamente ativas contra larvas de *C. quinquefasciatus*. Tal atividade supera inclusive a de larvicidas químicos, chegando a uma CL₅₀ da ordem de 0,00043 ppm de extratos purificados segundo Davidson, 1982. Como bem relata Burges, 1982, esta eficácia dificilmente repete-se em formulados comuns. Isto pode ser observado nas comparações de Yousten, 1984 com meios e temperatura diversos para a cultura de *B. sphaericus* 2362 nas quais os melhores resultados situam-se entre 0,004 e 0,007 ppm para CL₅₀. Em nosso experimento, levando-se em conta a concentração total da formulação, obtivemos também aproximadamente 0,007 ppm para CL₅₀. Eles são, mesmo assim, ainda extremamente baixos.

Em termos de controle, outro aspecto a considerar para estimar mos a eficiência de um inseticida ou larvicida e o seu efeito residual, ou seja, o tempo de efeito após a aplicação. Larvicidas químicos em geral tem efeitos residuais curtos e tem que ser repetidos a cada ciclo do mosquito (WHO, 1984). Fazem exceção os clorados que não são usados contra *C. quinquefasciatus* devido à resistência (BROWN,

1986). Larvicidas à base de *B. sphaericus*, no entanto, podem apresentar efeito prolongado de até um mês, pela reciclagem no meio, ou seja, pela germinação continuada de esporos nos cadáveres das larvas e a conseqüente formação de toxinas no próprio meio onde foi lançado (ROCHERS & GARCIA, 1984). Esta característica pode ainda ser mais aprimorada com o uso de formulações flutuadoras, em "pellets", como demonstra o trabalho de Lacey et alii, 1984.

Em termos de eficiência resultante de custo/benefício, parece claro que uma produção local de *B. sphaericus* representa um considerável avanço. Isto porque, via de regra, os larvicidas químicos mantêm um custo elevado em termos de aquisição. Por exemplo, a deltametrina, um piretróide de uso corrente em nosso Estado chega a custar U\$ 70,00/litro em formulações concentradas (RUAS NETO, comunicação pessoal). Por outro lado, Dharmstithi et alii, 1985 demonstraram que produções locais de *B. sphaericus* podem custar tão pouco quanto U\$ 0,006/litro se subprodutos industriais são usados. Em nosso caso, também optamos por esta última linha de trabalho, com o soro de queijo que tem um custo baixíssimo, e os resultados foram promissores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, A.W.A. Inseticide resistance in mosquitoes; a pragmatic review. **Journal of American Mosquito Control Association**, 2(2):123-140, 1986.
- BURGES, H.D. Control of insects by bacteria. **Parasitology**, 84:79-117, 1982.
- DAVIDSON, E.W. Insecticidal factors from *Bacillus sphaericus* and production of biocides from this organism. In: MICHAL, F. **Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases**, p.53-63. Genebra: UNDP/WORLD BANK/WHO, 1983.
- DES ROCHERS, B. & GARCIA, R. Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. **Mosquito News**, 44(2):160-165, 1984.
- DHARMSTHITI, S.C.; PANTUWATANA, S. & BHUMIRATANA, A. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. Sphaericus* stain 1593 on media using a byproduct from a monosodium glutamate factory. **Journal of Invertebrate Pathology**, 46(3):231-38, 1985.
- LACEY, A.L.; URBINA, M.J. & HEITZMAN, C.M. Sustained released formulation of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* (H-14) for control of container-breeding *Culex quinquefasciatus*. **Mosquito News**, 44(1):26-32, 1984.

7. NICOLAS, L. & DOSSOU-YOVO, J. Differential effects of *Bacillus sphaericus* strain 2862 on *Culex quinquefasciatus* and its competitor *B. cinereus* in West Africa. **Medical and Veterinary Entomology**, 1:23-27, 1987.
8. PESSOA, S.B. **Parasitologia médica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
9. RUAS NETO, A.L. & OLIVEIRA, C.M. Controle biológico de simúlideos e culicídeos; inseticidas bacterianos. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 37:61-75, 1985.
10. VANDEKAR, M. & CULMAGE, H.T. **Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H-14**, Genebra: UNDP/WORLD BANK/WHO 1983.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Chemical methods for the control of arthropod vectors and pests of public health importance**, Genebra: WHO, 1984.
12. YOSTEN, A.A. *Bacillus sphaericus* microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, 3:315-343, 1984.