

ACTIVIDAD PARASITARIA DE *ROMANOMERMIS IYENGARI* (NEMATODA, MERMITHIDAE) EN CRIADEROS NATURALES DE LARVAS DE MOSQUITO

A. SANTAMARINA MIJARES

Santamarina Mijares, A., 1993-1994. Actividad parasitaria de *Romanomermis iyengari* (Nematoda, Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquito. *Misc. Zool.*, 17: 59-65.

Parasitic activity of Romanomermis iyengari (Nematoda, Mermithidae) in natural breeding sites of mosquito larvae.— The preparasitic stage of the mermithid nematode *Romanomermis iyengari* (Welch, 1964) was released on July 1991 at dosage rate of 1000 specimen per square metre, to test the effect of the nematode on the larval stages of mosquitoes. The results indicated that 80-100% of *Anopheles albimanus* Wiedeman, 1821, *Culex nigripalpus* Theobald, 1901 and *Uranotaenia sapphirina* (Oster-Sacken, 1868) larvae and 75-78% of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 larvae were infected by *R. iyengari* and marked reductions in host populations were observed seven days post-treatment. A temporary recycling was determined on August 1991, one month after the applications, in at least one of the reservoirs and an observation on December 1991 revealed that the worms greatly reduced the larval populations. These data suggest the potential use of *R. iyengari* against mosquito larvae in the tropical conditions of Cuba.

Key words: Nematoda, *Romanomermis iyengari*, Mosquito larvae, Infection levels, Recycling.

(*Rebut*: 12 IV 93; *Acceptació condicional*: 13 III 94; *Acc. definitiva*: 6 IX 94)

Alberto Santamarina Mijares, Lab. de Nematodos, Depto. de Control de Vectores, Inst. de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Autopista Novia del Mediodía km 6 e/ Autopista Nacional y Carretera Central (N/251), Ciudad de La Habana, Cuba (Cuba).

Esta investigación recibió el apoyo financiero del UNDP/World Bank/WHO del Programa Especial para Investigaciones y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos mermítidos han sido considerados como candidatos potenciales para el control de las larvas de mosquitos, que proliferan masivamente en diversos hábitats (Petersen en BAKER & MULLER, 1985).

Las investigaciones realizadas para determinar la capacidad biorreguladora del parásito *Romanomermis iyengari*, han indicado su efectividad en reducir las poblaciones naturales de algunas especies de

mosquitos, las cuales crían en embalses tanto temporales como permanentes (CHANDRAHAS & RAJAGOPALAN, 1979).

R. iyengari es un nematodo de la familia Mermithidae cuya fase infectiva o preparasítico se desarrolla en el interior de la larva hospedera de mosquito, la cual muere cuando el parásito emerge. Según WELCH (1964) esta especie de mermítido fue originalmente hallada en una amplia variedad de larvas de mosquitos de los géneros *Anopheles* y *Culex* y aislada, en forma parásita del hemocele de

larvas de *Anopheles subpictus* Grassi, 1879, en Bangalore (India).

Algunos datos concernientes a los efectos de *R. iyengari* en otros organismos invertebrados, han demostrado que este parásito es virtualmente específico de mosquitos y no constituye riesgo alguno para aquellos otros hidrobiontes que puedan estar expuestos accidentalmente al parásito (POINAR, 1975).

El presente estudio describe los resultados encontrados en Cuba, con la aplicación de la fase infectiva del nematodo *R. iyengari*, en criaderos naturales de larvas de mosquitos de importancia médico-epidemiológica, de las especies: *Anopheles albimanus* Wiedeman, 1821, vector de la malaria; *Culex nigripalpus* Theobald, 1901, vector de la encefalitis; *Uranotaenia sapphirina* (Oster-Sacken, 1868) y *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, vector de la filariasis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar la capacidad biorreguladora de *R. iyengari* fueron utilizados cuatro criaderos temporales de un área de 80, 25, 33 y 23 m² y dos secciones de aliviaderos de un área de 12 y 15 m², correspondientes a dos lagunas de oxidación localizadas en el municipio Isla de

la Juventud (tabla 1). Una evaluación de la densidad larvaria pretratamiento fue realizada en cada uno de los embalses naturales, para lo cual se utilizó un colector cónico con fondo de malla de nilón para la recolección de larvas, de 10 cm de radio, 20 cm de profundidad y mango de 100 cm de largo (DUBITSKY, 1978). Las muestras de larvas se tomaron de forma aleatoria cada 2 m. En la tabla 1 se dan las concentraciones de larvas de cada especie de mosquito encontradas en cada embalse.

Se observó que alrededor del 95% de las larvas muestreadas de ambas especies eran del estadio I-II. La dominancia de estos estadios pudo ser atribuida a la formación reciente de dicho criadero. En los demás embalses se observó la presencia de larvas del estadio I-IV. No fue detectada ninguna actividad parásita natural en las poblaciones de larvas. Para los cuatro primeros embalses se colocó un control de un área de 20 m², con una densidad larvaria de 495 larvas/m² de *A. albimanus* y para los aliviaderos se utilizó un control de un área de 11 m², con una densidad de 363 larvas/m² de la especie *C. quinquefasciatus*. Como resultado de los muestreos pretratamientos en los embalses, se observó la presencia de numerosos insectos acuáticos: formas adultas de

Tabla 1. Concentraciones de larvas (larvas/m²) de cada especie de mosquito.
Mosquito larvae concentrations (larvae/m²) per each mosquito species.

Especies	Área (m ²)	Criaderos					
		1	2	3	4	5	6
		80	25	33	23	12	15
<i>A. albimanus</i>		51	0	264	250	0	0
<i>C. nigripalpus</i>		62	375	0	0	0	0
<i>U. sapphirina</i>		0	0	0	84	0	0
<i>C. quinquefasciatus</i>		0	0	0	0	3036	2475

Thermoneutes circumscripta (Latr.) del orden Coleoptera; estados adultos y ninfales de *Belostoma apache* Kirk, 1808 del orden Hemiptera y náyades de *Ischnura ramburii* Klots, 1932 del orden Odonata y suborden Zygoptera.

Las características y los valores medios de algunos parámetros físico-químicos de los embalses antes del tratamiento se dan en la tabla 2.

Para el tratamiento de los criaderos se utilizaron siete cultivos de nematodos, los cuales fueron inundados con agua destilada para inducir la eclosión de los huevos. Cuatro horas después se calculó el número total de preparásitos contenido en los cultivos mediante el método de dilución volumétrica (PETERSEN & WILLIS, 1972), obteniéndose un total de 205.000 larvas infectivas. Para las aplicaciones realizadas se necesitó un total de 188.000 preparásitos. Se aplicó una dosis de 1000 preparásitos/m² de área de

superficie, a razón de 80.000, 25.000, 33.000, 23.000, 12.000 y 15.000 larvas infectivas por cada embalse respectivamente. Los tratamientos se efectuaron en el mes de julio de 1991. Para la dispersión uniforme de los preparásitos en la superficie de cada embalse, se utilizó un aspersor manual Holder-planta 5, a una presión de 2,2 atm. Tres días después de las aplicaciones se tomó aleatoriamente una muestra de 200 larvas por cada embalse y las mismas fueron trasladadas al laboratorio. Las larvas recolectadas fueron disecadas mediante agujas entomológicas, a través de un microscopio estereoscópico WILL HEERBRUGG M-108 (LEVY & MILLER, 1977), para determinar las medias de infectación y los porcentajes de mortalidad.

La capacidad de establecimiento y reciclaje del parásito fue evaluada a través de un estudio de seguimiento a partir de agosto, un mes después de las aplicaciones efectuadas. Las muestras de larvas recolectadas periódicamente

Tabla 2. Características ecológicas de seis criaderos naturales.
Ecologic characteristics of six breeding sites.

Criadero N°	Área (m ²)	Características	pH	Conductividad (ms/cm)	Oxígeno (mg/l)	Temperatura (°C)
1	80	Aguas limpias con vegetación	6,3	383	7,4	30
2	25	Aguas limpias con vegetación	6,4	280	7,5	30
3	33	Aguas limpias con vegetación	6,6	310	7,3	30
4	23	Aguas limpias con vegetación	6,5	302	7,1	29
Control	20	Aguas limpias con vegetación	6,3	290	7,1	30
5	12	Aguas turbias	7,0	610	2,2	29
6	15	Aguas turbias	7,2	620	2,8	29
Control	11	Aguas turbias	7,1	618	2,4	29

camente fueron disecadas y examinadas con microscopio óptico.

Todos los datos obtenidos se analizaron estadísticamente. Previamente se determinó si los valores medios de infectación presentaban distribución normal y homogeneidad de varianza. En todos los resultados se dan tanto el valor medio de infectación como el porcentaje de mortalidad, pero sólo se analiza el primero, pues el segundo mostró una correlación cercana a 1 ($r_s = 0,094$; $p < 0,01$) con el valor medio de infectación. Se utilizó un ANOVA simple para la comparación de las medias de infectación y una prueba Duncan para determinar las diferencias entre medias, ambos para $p < 0,05$. Para evaluar la efectividad del biolarvicida se utilizó una prueba "t" para datos apareados antes y después de los tratamientos y la ecuación de LAWRENCE & MULLA (1979) para determinar los porcentajes de reducción en larvas por cada reservorio:

$$\% \text{ reducción} = 100 - C_1/T_1 \times T_2 / C_2 \times 100$$

C_1 . Número de larvas de mosquitos en el control antes de los tratamientos; T_1 . Número de

larvas de mosquitos en los criaderos a tratar antes de las aplicaciones; T_2 . Número de larvas de mosquitos en los criaderos a tratar después de las aplicaciones; C_2 . Número de larvas de mosquitos en el control después de los tratamientos.

RESULTADOS

En la tabla 3 se muestran los promedios de infectación con los porcentajes de parasitismo hallados.

Mediante la aplicación de un ANOVA se encontraron diferencias significativas entre las distintas medias de infectación de las cuatro especies ($F = 464,2$; $p < 0,001$). La prueba Duncan ($p < 0,05$) determinó que *A. albimanus* difiere de *C. nigripalpus*, *U. sapphirina* y *C. quinquefasciatus*. Esto evidenció que *A. albimanus* resultó más susceptible al parasitismo del nemátodo. El 85% de las larvas del I-II estadio en las cuatro especies presentaron 2-3 parásitos durante las disecciones efectuadas. Larvas de III-IV

Tabla 3. Niveles de infectación y porcentajes de mortalidad en larvas infectadas por *R. iyengari*: * $p \leq 0,05$.
Levels of infection and percentages of mortality in mosquito larvae infected by *R. iyengari*: * $p \leq 0.05$.

Criadero N°	Especies	Dosis preparásitos/m ²	Infectación x	Mortalidad (%)
1	<i>C. albimanus</i>	1000	2,8 *	100
	<i>C. nigripalpus</i>		1,2 *	85
2	<i>C. nigripalpus</i>	1000	1,35 *	80
3	<i>A. albimanus</i>	1000	3,0 *	95
4	<i>A. albimanus</i>	1000	2,7 *	98
	<i>U. sapphirina</i>		1,5 *	80
Control	<i>A. albimanus</i>	-	-	-
5	<i>C. quinquefasciatus</i>	1000	1,5 *	75
6	<i>C. quinquefasciatus</i>	1000	1,6 *	78
Control	<i>C. quinquefasciatus</i>	-	-	-

estadio mostraron una susceptibilidad más moderada a la infectación del mermítido.

Siete días después de las aplicaciones, la densidad larvaria de cada embalse calculada mediante muestreos aleatorios era de: 9 larvas/m² en el embalse 1, 75 larvas/m² en el 2, 13 larvas/m² en el 3, 6 y 13 larvas/m² en el 4, 759 larvas/m² en el 5 y 544 larvas/m² en el 6. En los controles se determinaron densidades larvarias de 510 y 399 larvas/m² de las especies *A. albimanus* y *C. quinquefasciatus* respectivamente. El aumento de la densidad poblacional de larvas en ambos controles fue atribuido a la continua puesta y eclosión de nuevos huevos y emersión de nuevas larvas de mosquitos.

Como los datos obtenidos no presentaban distribución normal ni homogeneidad de varianza, fueron transformados a \sqrt{x} . Una prueba "t" para datos apareados indicó un valor de $t = 7,42$ ($p < 0,001$) y ello mostró una alta diferencia significativa entre las densidades larvarias antes y después de las aplicaciones. La media transformada antes de los tratamientos fue de 141,46 y después de los tratamientos de 55,3.

En la tabla 4 se indica como fueron agrupados los valores del índice de Mulla. Se pudo observar que cuando la especie *A. albimanus* estaba presente en los criaderos, el índice de Mulla (% de reducción) era alto y decrecía cuando *A. albimanus* estaba ausente.

Tabla 4. Valores del índice de Mulla.
Values of Mulla index.

Especies en el embalse	n	Valores del índice de Mulla (% de reducción)			
<i>A. albimanus</i>	1	96			
<i>A. albimanus</i> + otra	2	87	92,5		
Otras especies	3	80	81	82	

Se evidenció la capacidad de permanencia del parásito después de su introducción en el embalse de 80 m² en el mes de julio. Durante cinco meses consecutivos, de agosto a diciembre de 1991, se llevó a cabo un estudio de seguimiento mediante recolecciones periódicas de muestras de larvas, encontrándose valores medios de infectación que oscilaron entre 1,5-2,2 con 90-98% de mortalidad (tabla 5). A partir de enero de 1992 este criadero fue objeto de una gran desecación. De igual forma los reservorios 2, 3 y 4 se secaron un mes después de los tratamientos. En los reservorios artificiales 5 y 6 no resultó posible evaluar el reciclaje del parásito, lo que se atribuyó a la ausencia de sustrato en el fondo de los mismos.

Tabla 5. Capacidad de reciclaje de *R. iyengari* en el embalse 1.

Capacity of recycling of R. iyengari in reservoir 1.

DLR/m ²	Infectación \bar{x}	Mortalidad (%)	Mes
12	1,7	96	Agosto
13	1,5	95	Septiembre
10	2,2	90	Octubre
8	2,0	94	Noviembre
6	2,1	98	Diciembre

DISCUSIÓN

La liberación experimental de las etapas infecciosas de *R. iyengari* en los criaderos tratados, demostró la susceptibilidad de las cuatro especies de larvas de mosquitos a la infectación del parásito, lo que se enmarca en lo descrito por autores como GAJANANA et al. (1978) y CHANDRAHAS & RAJAGOPALAN (1979).

El mayor nivel de parasitismo fue observado en larvas de *A. albimanus*, lo cual se

explica por la conducta típica de esta especie, cuyas larvas además de alimentarse en la superficie del agua respiran a través de un espiráculo localizado en el octavo segmento, lo que las obliga a adoptar una posición paralela al plano superficial del agua. Esta respuesta conductual las hace más vulnerables al ataque del nematodo, por cuanto que aumenta la probabilidad de contacto con los preparásitos infectivos, los cuales tienen una conducta tigmotáctica, es decir, se concentran en la superficie del agua. A diferencia de esto, en el resto de las especies se observó una disminución en los índices de parasitismo, ya que las mismas aunque respiran en la superficie del agua a través de un sifón respiratorio, asumiendo una posición perpendicular al plano superficial del agua, se alimentan de la materia orgánica depositada en el sustrato de los criaderos. Esta conducta diferente a la de los anofelinos disminuye un tanto las posibilidades de encuentro con los preparásitos (ROSS & SMITH, 1976).

Aunque el parasitismo ocurrió en todas las especies, principalmente en *A. albimanus*, la mayor incidencia tuvo lugar en los estadios más jóvenes I-II (PETERSEN & WILLIS, 1975), lo que quizás se explica por el poco desarrollo orgánico alcanzado en estos instares larvares y la escasa formación de quitina en la pared cuticular, lo que la hace más suave, facilitando la entrada del estilete de los preparásitos. En larvas de estadios más avanzados III-IV se observa un mayor grosor de la pared cuticular, debido a una mayor deposición de quitina, lo que dificulta la entrada del estilete, reflejándose en una disminución de los niveles de parasitismo.

Los preparásitos de *R. iyengari* localizaron y parasitaron las larvas de mosquitos. Asimismo, la presencia de vegetación al igual que los valores de los distintos parámetros físico-químicos evaluados, como pH,

conductividad, oxígeno y temperatura, no tuvieron aparentemente una influencia negativa en la acción de las larvas infectivas. Aunque la dosis utilizada resultó altamente efectiva para causar la muerte a las larvas de mosquitos, un aumento de dicha dosis podría incrementar los índices de infectación. Estos datos sugieren que una dosis superior a 1000 preparásitos/m² de área de superficie de criadero podría inducir en muchos casos un superparasitismo, lo que conllevaría a la muerte temprana de la larva hospedera y del parásito y limitaría la posibilidad de permanencia del mermítido.

La comparación numérica de las densidades larvares antes y después de los tratamientos mostró una reducción marcada de la población de larvas en los sitios tratados, lo que evidencia la efectividad del biolarvicida aplicado. Esto confirma lo enunciado por SERVICE (1983), en cuanto a las ventajas que ofrece este nuevo tipo de larvicida biológico en comparación a los insecticidas químicos.

La disminución observada de la población larval en el embalse 1 durante cinco meses consecutivos se atribuye a la implantación del parásito después de su introducción, lo que demuestra que *R. iyengari* es capaz de mudar, madurar y oviposicionar en el sustrato del criadero, liberando las etapas infectivas. Esto permite un control parcial en las subsiguientes estaciones de cría de larvas de mosquitos (ROSS & SMITH, 1976).

Los resultados del estudio indican que *R. iyengari* se estableció y recicló por un tiempo de cinco meses en un hábitat típico de *A. albimanus* y *C. nigripalpus*, en el municipio Isla de la Juventud, Cuba. Un agudo decremento de la población larval de *A. albimanus* relativo a la de *C. nigripalpus*, *U. sapphirina* y *C. quinquefasciatus* fue observado en el área de estudio, indicando así una mayor preferencia y efecto patogénico de *R. iyengari* por esta primera especie.

REFERENCIAS

- BAKER, R. & MULLER, R. (Eds.), 1985. *Advances in Parasitology*. Vol 24. Academic Press, London.
- CHANDRAHAS, R. K. & RAJAGOPALAN, P. K., 1979. Mosquito breeding and the natural parasitism of larvae by a fungus *Coelomomyces* and a mermithid nematode *Romanomermis*, in paddy fields in Pondicherry. *Indian J. Med. Res.*, 69: 63-70.
- DUBITSKY, A. M., 1978. *Métodos de control biológico de los dípteros hematófagos en la URSS*. Tomo I. Editorial AC Alma Atá, URSS.
- GAJANANA, A., KAZMI, S. J., BHEEMA RAO, U. S. SUJUNA, S. G. & CHANDRAHAS, R. K., 1978. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: Mermithidae) of mosquito larvae isolated in Pondicherry. *Indian J. Med. res.*, 68: 242-247.
- LAWRENCE, L. & MULLA, M. S., 1979. Field evaluation of Difluobenzuron (Dimilin) against simuliid larvae. *Mosq. News.*, 39(1): 86-90.
- LEVY, R. & MILLER, T. W., 1977. Susceptibility of the mosquitoes nematode *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae) to pesticides and growth regulators. *Environ. Entomol.*, 64: 447-448.
- PETERSEN, J. J. & WILLIS, O. R., 1972. Procedures of the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosq. News.*, 2(32): 226-230.
- 1975. Establishment and recycling of a mermithid nematode for the control of larval mosquitoes. the control of larval mosquitoes. *Mosq. News.*, 35: 526-532.
- POINAR, G. O., 1975. *Entomogenous Nematodes, a manual and host list of insect nematode associations*. E. J. Brill, Leiden.
- ROSS, J. F. & SMITH, S. M., 1976. A review of the mermithid parasites (Nematode: Mermithid) described from North America mosquitoes (Diptera: Culicidae) with description of three new species. *Can. J. Zool.*, 54: 1084-1102.
- SERVICE, M. W., 1983. Biological control of mosquitoes. Has it a future? *Mosq. News.*, 13(2): 113-120.
- WELCH, H. E., 1964. *Romanomermis iyengari* species nov. Nematoda: Mermithidae Braun, 1883. *Pilot Register of Zoology*, Card nº 4: 209.