

CONTROLE BIOLÓGICO

Atividade Larvicida de *Bacillus sphaericus* 2362 contra *Anopheles* sp. (Diptera, Culicidae) em rios do Amazonas, BrasilILÉA B. RODRIGUES¹; WANDERLI P. TADEI¹; JOSÉ M. C. S. DIAS²; CARLOS A. P. LIMA¹¹INPA/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, CEP 69083-000, Manaus-AM. Email: brandao@inpa.gov.br, tadei@inpa.gov.br, c.praia@inpa.gov.br,²Embrapa/Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, CEP 70770-900, Brasília-DF. Email: cabral@cenargen.embrapa.br*BioAssay*: 8:2 (2013)*B. sphaericus* 2362 larval activity against *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in the rivers from Amazon, Brazil

ABSTRACT - Studies addressing vector control are important due to the high incidence of malaria in Amazonia. The present study aims to analyze the larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 2362 against anophelines in Amazonia. Laboratory assays testing *B. sphaericus* 2362 as lyophilised in waters collected from anopheline breeding sites in the Solimoes and Negro Rivers, were carried out on *Anopheles nuneztovari* larvae. A field test using a *Bacillus sphaericus* 2362 formulation, named Spherico, was applied on *Anopheles* species in the natural breeding sites in the Solimoes and Negro Rivers. Laboratory bioassay showed that, the *B. sphaericus* tested dosage are not efficient in the control of *A. nuneztovari* larvae in black water, with CL50= 0.563ppm, compared to the larvicide dosage found in white water presenting CL50= 0,859 ppm, in the 24 h reading, with a significance of $p>0.05$. Regression straight lines point out that in the highest *B. sphaericus* 2362 dosages (1 ppm, 0.5ppm), there was higher mortality rate against this target species in black water, than that found in white water. In the field assays the *Anopheles* predominant species, both in black and white water breeding sites, were *A. triannulatus* (74%) and *A. albitarsis* (22%). The present study showed a decrease in the man hour larval index (MHLI) values following the larvicide application, both, in Solimões and Negro River breeding sites, as compared to that found prior to the treatment. The Solimões River breeding site, presented a value of MHLI equal to 72% wherever the highest Spherico formulation (0.2mL/m²) was applied, and MHLI of 18% where the lowest larvicide dosage was applied (0.025mL/m²), both values were found in the 48 h evaluation. In the Negro River, the MHLI was 53 and, 11%, for the highest and lowest Spherico tested dosage. The activity of the *B. sphaericus* 2362 and Spherico formulation on anopheline larvae differed significantly between the two water types tested (Solimões and Negro Rivers).

KEY WORDS - Malaria, Biological control, Anopheline, *Bacillus*.

RESUMO - Devido à alta incidência de malária na Amazônia, estudos que contemplem o controle de vetores são muito importantes. O estudo objetivou analisar a atividade larvicida de *Bacillus sphaericus* 2362 contra anofelinos em condições amazônicas. Ensaio em Laboratório foram realizados com *B. sphaericus* 2362 liofilizado utilizando água coletada dos rios Negro (água preta) e Solimões (água branca) contra larvas de *Anopheles nuneztovari*. Testes em campo usando um formulado de *B. sphaericus* 2362, denominado Spherico, foram realizados em criadouros de espécies de *Anopheles* sp localizados nos rios Solimões e Negro. Os bioensaios apontaram maiores níveis de mortalidade observados na leitura de 24 horas, nos dois tipos de água, de forma acentuada nas duas maiores doses. Mas, o valor da CL50 foi menor na água preta em relação à água branca. Portanto, as doses efetivas foram qualitativamente iguais, porém, quantitativamente diferentes; com valores da Potência Relativa (PR) mostrando que na água preta, para matar 50% das larvas na leitura de 24 horas, há necessidade de uma concentração de 1,435 vez menos isolado do que se necessita na água branca. Nos estudos das atividades do formulado

Spherico contra anofelinos em campo, em que as espécies predominantes nos criadouros dos rios Negro e Solimões foram *A. triannulatus* e *A. albitalis* mostraram que houve um maior valor de ILHH (Índice de larva por homem hora) na água branca do que na água preta, denotando maior redução de larvas no rio Negro. A atividade larvicida do formulado Spherico (*B. sphaericus* 2362) sobre as larvas de anofelinos apresentou diferença significativa entre os dois tipos de águas testados. A atividade larvicida de *B. sphaericus* 2362 contra larvas de anofelinos em laboratório e campo utilizando águas dos rios Negro e Solimões diferiram significativamente entre os dois tipos de água.

PALAVRAS-CHAVE - Malária, Controle Biológico, Anofelino, Bacilo.

As condições ambientais da região Amazônica favorecem o desenvolvimento de mosquitos vetores de doenças, especialmente os anofelinos que transmitem a malária (Tadei, 2001).

A dinâmica de transmissão da malária pode ser observada pelos estudos dos vetores, determinando o grau de vulnerabilidade para as diferentes áreas de risco (Tadei, 2001). Essa característica focal da malária na Amazônia está relacionada, dentre outros fatores, aos diferentes ambientes aquáticos encontrados na região. São as águas pretas do rio Negro e as águas brancas do rio Solimões (Sioli & Klinger, 1962) que proporcionam condições do contato do homem ribeirinho com o vetor durante o pulso das enchentes, originando a sazonalidade da manifestação da doença.

As águas pretas, pobres em nutrientes e ácidas, favorecem a reprodução do *Anopheles darlingi* Root, 1926 no igapó. As águas do rio Solimões são ricas em sólidos minerais em suspensão e as espécies de mosquitos predominantes pertencem ao gênero *Mansonia*, mas espécies de *Anopheles* são observadas em baixa densidade (Tadei, 2001).

Ressalta-se a importância desses ambientes para o desenvolvimento das formas imaturas (larvas) de mosquitos e as dificuldades aí encontradas para o controle das mesmas. A importância do seu controle na quebra da cadeia de transmissão é um ponto relevante em áreas onde as coleções de águas são predominantes, impedindo o contato do homem com o vetor. Alternativas de controle das formas imaturas de vetores na Amazônia devem ser apontadas em face também da resistência de mosquitos aos inseticidas químicos (Kelly-Hope et al., 2005; Vatandoost et al., 2005). Outro aspecto a ser considerado na busca de alternativa de controle desses vetores, na água do ambiente Amazônico, é o uso de produtos não poluentes, devido a grande importância desse biótopo.

O controle biológico de vetores da malária na Amazônia, por meio do uso de larvicidas bacterianos, é de grande relevância quando se considera a preservação ambiental e a busca de métodos eficazes na atuação contra as formas imaturas (Tadei & Rodrigues, 2002). Dentre os patógenos mais efetivos nos programas de malária, citam-se espécies de bactérias do gênero *Bacillus* – *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* (Habib, 1989; Barjac, 1990; Regis, 2000). Estudos apontam a existência de efetividade de *B. sphaericus* estirpe padrão 2362 (WHO, 2005), contra espécies de *Anopheles* em condições de laboratório, além das estirpes isoladas de solos brasileiros, que são mais efetivas no controle de anofelinos que a estirpe padrão (Rodrigues et al., 1999).

Neste trabalho, a atividade larvicida de *B. sphaericus* estirpe 2362 liofilizada e do formulado Spherico SC foi estudada contra espécies de *Anopheles* da Amazônia,

utilizando-se águas pretas do rio Negro e águas brancas (barrentas) do rio Solimões, em ensaios de laboratório e de campo, visando obter respostas quanto ao uso de *B. sphaericus* 2362 nesses ambientes diferenciados contra vetores de doenças e identificar um formulado efetivo para a Amazônia.

Material e Métodos

Bioensaios em Laboratório. Os bioensaios foram realizados com larvas de terceiro estágio, as quais se originaram de fêmeas obtidas da natureza, levadas para o Insetário do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e foram mantidas em temperatura constante, com média de 26±2°C e umidade relativa variando entre 80 e 90%. As fêmeas foram criadas no insetário seguindo-se os métodos descritos por Scarpassa & Tadei (1990).

A medida de pH das águas foi tomada anteriormente à realização dos bioensaios, que consistiram de copos plásticos contendo 100 mL de água preta proveniente do rio Negro, ou água branca do rio Solimões, vinte larvas de *A. nuneztovari*, 1 mL de alimento líquido e o volume de suspensão bacilar para atingir a concentração previamente definida. As dosagens de *B. sphaericus* 2362 utilizadas nos testes foram (em ppm): 1 - 0,5 - 0,25 - 0,12 - 0,06 - 0,02 - 0,01 e o controle onde não foi adicionado o entomopatógeno. Posteriormente, foram realizadas as leituras de 24 e 48 horas do contato da larva com o bacilo.

A concentração letal para matar 50% da população alvo (CL₅₀), assim como os valores de probit expressos pelas retas de regressão, foi calculada utilizando-se o programa POLO-PC (Finney, 1981).

Ensaios em condições de campo na Amazônia.

(1) Áreas de estudo e criadouros alvo dos testes. Os estudos foram desenvolvidos em áreas dos rios Negro e Solimões onde existiam criadouros de anofelinos naturalmente encontrados nesses rios. Um levantamento preliminar indicou locais com presença de no mínimo 70 larvas de anofelinos. Amostras de larvas foram coletadas para serem identificadas posteriormente no laboratório, com a utilização das chaves taxonômica de Lane (1953).

Os locais selecionados como alvo deste estudo é: (1) rio Negro – Chiboreminha (S03°14'42,9" W60°02'11,6"), Cacau Pirêra (S03°13'59,6" W60°01'41,3"), Catalão (S03°12'40,6" W60°02'10,9") e Curupira (S03°10'20,3" W59°55'53,7") e (2) rio Solimões - Imbaúba (S03°18'54,9" W60°02'50,9"), Comprido (S03°17'36,4" W59°58'21,3"), Cobra Grande

(S03°17'49,8" W59°59'50,7") e Redondo (S03°17'36,5" W59°58'21,4"). Estes se caracterizam por possuírem muita vegetação aquática (macrófitas, gramíneas, aningais, etc) nas suas margens. Também eram ensolarados, ou semi-sombreados, formando pequenos lagos ou enseadas ao longo do curso dos rios. As medidas de potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura (°C) foram também realizadas nesses criadouros.

(2) Aplicação e avaliação do larvicida bacteriano. Foi utilizado o larvicida bacteriano Spherico SC, formulado líquido de *B. sphaericus*, estirpe 2362, com potência de 1700 ITU/mg (5%). A dose recomendada para aplicação pelo fabricante é 0,075 mL/m². O Spherico é um formulado que foi produzido pela empresa Geratec, em colaboração com a EMBRAPA/CENARGEN – Brasília. As aplicações foram feitas com bomba Hudson X-Pet convencional, e as doses utilizadas, em mL/m², foram: 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025, tanto em águas pretas como em águas brancas. Durante a aplicação cobria-se um raio de aproximadamente dois metros da margem do criadouro para o centro, e o deslocamento foi realizado por barco.

A avaliação da atividade larvicida foi realizada por meio do acompanhamento da densidade larvária. Realizaram-se leituras prévias, registrando-se as larvas na pré-aplicação, considerando os quatro estádios do desenvolvimento. Após o tratamento com o Spherico SC, as leituras foram feitas em 24, 48 e 72 horas. Essas medidas ocorreram seguindo-se os seguintes critérios: (1) As coletas foram realizadas em três pontos de cada criadouro; (2) Esforço de coleta em cada ponto do criadouro com duração de vinte minutos (método utilizado pelo laboratório de Malária e Dengue).

As coletas, para dimensionar a densidade larvária nos criadouros, ocorreram com o auxílio de concha padrão com capacidade volumétrica de aproximadamente 350 mL, diâmetro de abertura de 11cm e cabo de manuseio de um metro; vidros transparentes e um conta-gota. Para dimensionar a densidade larvária nos diferentes estádios, adotou-se o cálculo do Índice de larva por Homem Hora

segundo a fórmula descrita por Tadei et al. (2007):

$$ILHH = \sum_{j=1}^L \left(\frac{N}{Cxh} \right) \frac{1}{L}$$

onde: N= n° exemplares de larvas, C=n° de coletores, h=n° de horas de coleta e L=n° de locais de coleta.

A análise estatística avaliando a atividade larvicida do formulado aplicado nos criadouros de anofelinos do rio Negro e rio Solimões foi feita pelo teste do qui-quadrado.

Resultados

Ensaio em Laboratório. Os resultados da atividade larvicida de *B. sphaericus* 2362 liofilizado contra larvas de terceiro estágio de *A. nuneztovari*, foram obtidos em águas de pH= 4,26 (águas pretas do rio Negro) e pH=6,56 (águas brancas do rio Solimões). Tais resultados indicaram maiores níveis de mortalidade observados na leitura realizada 24 horas após, nos dois tipos de água, de forma acentuada nas duas maiores doses (1 e 0,5 ppm); nas doses intermediárias de 0,25 e 0,12 ppm, houve uma equivalência de toxicidade nas duas leituras e, nas menores doses – de 0,06 a 0,01 ppm, a mortalidade foi maior na leitura de 24 horas, isto é, o maior efeito tóxico foi verificado na primeira observação (Figura 1). A análise de qui-quadrado indicou que houve diferença significativa do nível de mortalidade quando se compara os dois tipos de água na leitura de 24 horas ($X^2= 11,39$; g.l.= 1; $P < 0,001$) e de 48 horas ($X^2= 7,6$; g.l.= 5; $P < 0,01$).

As análises dos resultados indicaram em todas as equações de regressão (Figura 2) que os valores de t foram significativos para os coeficientes angulares, em nível de 5%, tanto para a água preta (24 horas: $t = 14,05$; 48 horas: $t = 19,23$) como para a água branca (24 horas: $t = 11,12$; 48 horas: $t = 16,45$). Os valores de qui-quadrado não foram significativos em todas as observações (Tabela 1), indicando a aderência dos dados ao modelo da análise de Próbite.

Em relação às concentrações letais CL_{50} (IC0,05) e CL_{90}

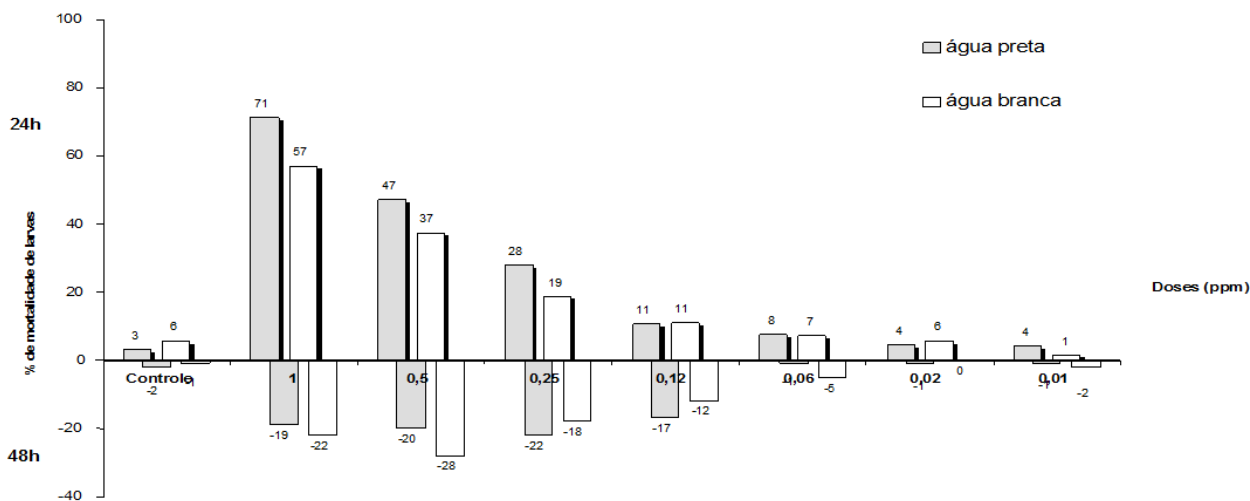
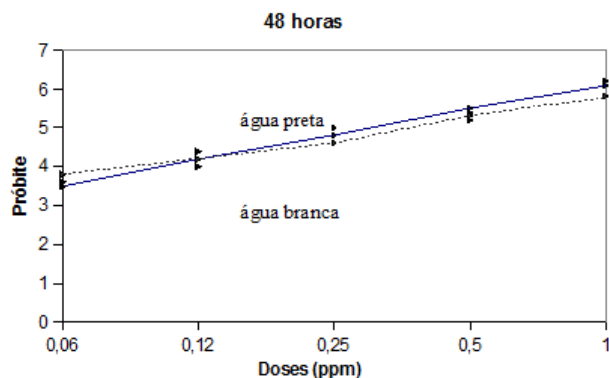


Figura 1. Porcentagem de mortalidade de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de *Anopheles nuneztovari* em águas do rio Negro e do rio Solimões, em laboratório.

Tabela 1. Concentração Letal (CL) de *Bacillus sphaericus* 2362 encontrada nos bioensaios contendo larvas de *Anopheles nuneztovari* e águas dos rios Negro e Solimões.

Leitura (horas)	Tipo de água	Equação de regressão	CL ₅₀ (ppm) IC _{0,05}	CL ₉₀ (ppm) IC _{0,05}	n	X ²	g.l.	P	t IC _{0,05}
24	preta	Y=5,502+2,017*logx	0,563 (0,509-0,629)	2,434 (1,948-3,247)	300	2,719	5	0,90 < > 0,70	14,05
	branca	Y=5,117+1,773*logx	0,859(0,674-1,226)	4,539(2,582-13,342)	300	10,501	5	0,10 < > 0,05	11,12
	preta	Y=6,170+2,116*logx	0,280(0,242-0,322)	1,129 (0,903-1,511)	300	7,250	5	0,30 < > 0,10	19,23
48	branca	Y=5,804+1,877*logx	0,372 (0,312-0,445)	1,796 (1,326-2,764)	300	8,037	5	0,30 < > 0,10	16,45

Figura 2. Valores de próbite observado nos bioensaios com *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de *Anopheles nuneztovari*.

(IC_{0,05}), comparando-se água preta e água branca, os dados indicaram que o intervalo de confiança disjuncto ocorreu apenas para a CL₅₀, na leitura de 24 horas (Tabela 1). Nesta última, o valor da CL₅₀ para a água preta foi menor - 0,563 ppm – em relação ao observado para a água branca - 0,859 ppm.

Levando-se em consideração as comparações dentro de cada tipo de água nas duas leituras (A) e nos dois tipos de água em cada leitura (B), os resultados evidenciaram que tanto em A como em B, a hipótese de igualdade foi rejeitada, ou seja, a inclinação e os pontos de intersecção no eixo de y são os mesmos.

Considerando a mortalidade nas leituras e nos dois tipos de água, observou-se que em ambos os casos (A e B) os valores de qui-quadrado foram significativos para cada leitura, rejeitando a hipótese de igualdade da mortalidade.

Levando-se em conta o teste de paralelismo, ou seja, testar a hipótese de que os coeficientes angulares das regressões não foram significativamente diferentes, a hipótese de paralelismo foi aceita, pois os valores de qui-quadrado não foram significativos em todas as comparações (24 horas = $P > 0,554$; 48 horas = $P > 0,556$).

A hipótese de igualdade foi rejeitada e há paralelismo entre as retas, ou seja, os coeficientes angulares das regressões não foram significativamente diferentes. As doses efetivas foram qualitativamente iguais, porém, quantitativamente diferentes.

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa com base nos dados obtidos nos bioensaios. Os resultados evidenciaram que na água preta, para matar 50% das larvas na leitura de 24 horas, houve necessidade de uma concentração de 1,435 vezes menos do isolado que se necessita na água branca. Assim ao considerar as mesmas condições e a leitura de 48 horas, são necessárias 1,321 vezes menos *Bacillus*.

Ensaio em condições de campo. Diversidade de espécies nos criadouros. Os resultados do levantamento prévio da diversidade de espécies de larvas nos criadouros naturais encontrados nos testes realizados nos rios Negro e Solimões indicaram que as espécies de *Anopheles* encontradas foram as do Subgênero *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902, entre elas: *Anopheles albitarsis* Lynch Arribálzaga, 1878; *Anopheles nuneztovari* Gabaldón, 1940 e *Anopheles triannulatus* Neiva & Pinto, 1922; e do Subgênero *Anopheles* Meigen, 1818, que são: *Anopheles braziliensis* (Chagas, 1907) e *Anopheles peryassui* Dyar & Knab, 1908. Os registros de *A. albitarsis*, *A. nuneztovari* e *A. triannulatus* referem-se às espécies *latu sensu*. A espécie predominante foi *A. triannulatus*, com 74%, seguido de *A. albitarsis*, com 22%. Outro aspecto importante observado está no fato de não haver uma grande diversidade

Tabela 2. Comparação dos bioensaios realizados com águas dos rios Negro e Solimões referentes à hipótese de paralelismo e igualdade.

Leitura (horas)	Tipo de água	X ²	g.l.	P	Hipótese de igualdade	X ²	g.l.	P	Hipótese de paralelismo
A									
24/48	preta	114,58	2	P<0,0001	rejeitada	0,351	1	P>0,554	aceita
24/48	branca	116,94	2	P<0,0001	rejeitada	0,348	1	P>0,556	aceita
B									
24	branca/preta	25,033	2	P<0,0001	rejeitada	1,593	1	P>0,207	aceita
48	branca/preta	21,056	2	P<0,0001	rejeitada	2,626	1	P>0,105	aceita

Tabela 3. Média do Índice de larvas (ILHH) maduras de espécies de *Anopheles* encontrado em criadouros de águas do rio Negro e do rio Solimões tratados com o formulado Spherico.

Criadouros			Leitura (horas)			
	Leitura prévia	Doses (mL/m ²)	24	48	72	Total
Rio Solimões						
Imbaúba	38,25 (35)	0,2	19,51(51)	27,45(72)	14,44(38)	61,4(49)
Redondo	24,41(22)	0,1	7,98(33)	3,05(12)	6,02(25)	18,86(15)
Cobra Grande	33,44(30)	0,05	12,66(38)	2,55(8)	12,33(37)	24,28(20)
Comprido	13,85(13)	0,025	4,49(32)	5,76(41)	5,38(39)	20,5(16)
Total	109,95 (100)		44,64(41)	38,81(35)	38,17(35)	125,04(100)
Rio Negro						
Catalão	50,32(39)	0,2	27,23(54)	26,86(53)	20,37(40)	74,46(48)
Chiboreminha	24,43(18)	0,1	7,51(31)	11,21(46)	7,83(32)	21,03(14)
Curupira	26,7(20)	0,05	11,28(42)	8,14(30)	9,07(34)	29,12(19)
Cacau Pirêra	30,89(23)	0,025	16,47(53)	3,44(11)	9,27(30)	29,17(19)
Total	132,34(100)		62,49(41)	44,14(29)	47,15(30)	153,78(100)

das espécies de *Anopheles* nos criadouros de água preta em relação ao de água branca, nos quais ocorreram os testes.

As medidas de temperatura e do potencial hidrogeniônico (pH) encontrados nesses criadouros naturais dos rios Negro e Solimões mostraram valores de temperatura que variaram, nos criadouros de água branca, entre 28 e 31°C e, nos de água preta, entre 29 e 31°C. O pH medido nas margens desses criadouros, no local onde as larvas foram coletadas, mostrou uma média de 7,12 na água branca e de 4,25 nos criadouros de água preta.

Atividade Larvicida do formulado nos criadouros. Observou-se pelos resultados que, após a aplicação do larvicida, houve diminuição do índice de larvas por homem/hora (ILHH), se comparados aos índices obtidos antes do tratamento (Tabela 3). Constatou-se, também, maior valor de ILHH na água branca do que na água preta. Na leitura de 48 horas, a porcentagem de larvas encontrada nos criadouros de água branca (rio Solimões) foi de 72% no Imbaúba, onde aplicou-se a maior dose do formulado (0,2 ml/m²), enquanto que, no Comprido, onde foi aplicada a menor dose do larvicida (0,025 ml/m²), observaram-se 18% de larvas. No criadouro Catalão, no rio Negro, a porcentagem de presença de larvas foi de 53%, onde foi aplicada a maior dose (0,2 ml/m²) de Spherico; no Cacau Pirêra, com menor dose aplicada do larvicida (0,025 ml/m²), observaram-se 11% de larvas, ambas na leitura de 48 horas.

Nesse trabalho, enfocou-se o uso dos larvicidas bacterianos, para manutenção dos rios Solimões e Negro, livres de resíduos de inseticidas poluentes. No entanto, alguns fatores podem influenciar na atividade larvicida destes bacilos em relação à população alvo, quando introduzidos nos diferentes habitats dos mosquitos, podendo-se citar dentre estes, radiação solar, profundidade da água, modo de alimentação do inseto e a qualidade da água (Barjac, 1990). Glare e Callaghan (1998) relatam sobre a influência da qualidade da água na eficácia de *Bacillus thuringiensis* israelenses incluindo a presença de poluentes, salinidade, partículas orgânicas e inorgânicas. Ramoska et al. (1982) constataram que a eficácia do esporo-cristal de formulações de B.t.i. contra larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes*

aegypti decresce em meio aquoso que contenha uma concentração de solo ou argila com partículas maiores ou igual a 0,5 mg/mL.

Discussão

Na natureza, as fêmeas de *Anopheles*, dentre outros culicídeos, colocam seus ovos diretamente na superfície da água ou em substratos úmidos, geralmente na periferia de coleções de água de rios, igarapés, lagos, etc. Autores destacam a seleção dos locais de reprodução feita pelos mosquitos, detectando fatores do meio importantes para o seu desenvolvimento biológico, tais como os biofísicos, microorganismos, matéria orgânica em decomposição de diferentes naturezas, dentre outros (Glare e Callaghan 1998). Locais preferenciais no Amazonas para o desenvolvimento de anofelinos tem origem de dois grandes rios que possuem ecossistemas bastante diferentes, o rio Solimões e o rio Negro (Tadei et al. 2005).

O Solimões é um rio geologicamente mais jovem (Lopes, 1992), com grande produção primária, isto é, síntese de matéria orgânica a partir de gás carbônico, sais minerais e energia solar (Sioli, 1968), e, portanto, há presença de macrófitas flutuantes e fitoplâncton (Lopes, 1992). O pH tende ao neutro (6,85 a 7,20) para um ciclo hidrológico completo (Lopes, 1992).

O rio Negro é geologicamente mais antigo, suas águas pretas são ricas em compostos húmicos dissolvidos, os quais auxiliam na permanência do pH ácido do rio (Santos, 1983); a fertilidade é mínima, com baixa condutividade elétrica, assim como a produção primária (Sioli & Klinger, 1962; Walker, 1995). Outra característica destas águas é a grande quantidade de bactérias Gram positivas chamadas *Chromobacterium violaceum* (*Bacillus violaceus*). Análise bacteriológica de amostras de água preta apontou que são encontradas 500 colônias de *C. violaceum* por milímetro de água, e Caldas (1991) demonstrou que a violaceína tem ação fotobiológica sobre bactérias, linhagens de *Staphylococcus epidermidis*. O vírus que está contido no DNA do *S.*

Epidermidis era induzido quando se adicionava violaceína à cultura em fase exponencial de crescimento; demonstrando uma sobrevivência de cem por cento à luz.

Os primeiros testes examinando o efeito do pH e a eficácia de bioinseticidas, em laboratório, foram realizados por Lacoursière e Charpentier (1988), utilizando B.t.i. contra simulídeos. Estes autores observaram que a alta mortalidade de larvas *S. decorum* ocorriam em valores altos de pH (9,0).

Tian-min et al. (1989) testaram o isolado de *B. sphaericus* denominado BS-10 contra larvas de *Culex pipiens pallens* (Coquillett) em diferentes valores de pH, observando que quanto menor o valor dentre os pHs estudados do meio, maior a porcentagem de mortalidade para uma concentração de 0,3 ppm e 0,6 ppm de BS-10. Outros autores, testando soluções tamponadas de pH sob a atividade de *B. sphaericus* (0,5 e 1 ppm) e *B. thuringiensis* (0,1 e 0,5 ppm) contra *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 em 48 horas de exposição, em condições de laboratório, observaram mortalidades diferenciadas. Para a dose de 0,5 ppm de *B. sphaericus*, utilizando-se as médias de pH ácidos (4,3 e 5,6) apresentaram valores de mortalidade de 67 e 76% respectivamente; e para o pH alcalino (8,3), na mesma dose, a mortalidade foi de 95% (Ramoska, 1982).

Observaram-se neste estudo maiores níveis de mortalidade na leitura de 24 horas, nos dois tipos de água, de forma acentuada nas duas maiores doses. Mas, o valor da CL_{50} foi menor na água preta em relação à água branca. Os testes relativos às retas de regressão quanto à diferença de mortalidade entre os dois tipos de águas e entre as leituras mostraram que a hipótese de igualdade foi rejeitada. Portanto, as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes; com valores da Potência Relativa (PR) mostrando que na água preta, para matar 50% das larvas na leitura de 24 horas, há necessidade de uma concentração de 1,435 vez menos isolado do que se necessita na água branca.

O B.t.i. apresentou percentuais de mortalidade de 100% na dose de 0,5 ppm para os valores de pH de 4,3, enquanto nesta mesma dose para pH 8,3 a toxicidade foi de 94% (Mulligan et al., 1980). Lacey, Mulla e Dulmage (1987) registraram uma correlação positiva entre aumento do pH e da patogeneidade de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* para *Simulium vittatum*. A redução da eficácia de B.t.i. em águas ácidas, segundo estes autores, precisa ser confirmada em estudos de controle em condições de campo (Barjac, 1990).

Barjac (1990) ressalta fatores bióticos e abióticos que influenciam na atividade de *Bacillus* no ambiente, dentre estes a qualidade da água. Um número de estudos tem sido conduzidos sob condições de laboratório e de campo simulado para determinar a lista de alguns destes fatores que afetam a atividade e a potência do Bti (Barjac, 1990). Ressalta-se a cobertura vegetal, a baixa temperatura e a profundidade da água.

Nos estudos das atividades do formulado Spherico contra anofelinos em campo, em que as espécies predominantes nos criadouros dos rios Negro e Solimões foram *A. triannulatus* e *A. albitarsis* mostram que houve um maior valor de ILHH na água branca do que na água preta, denotando maior redução

de larvas no rio Negro. A atividade larvicida do formulado Spherico (*B. sphaericus* 2362) sobre as larvas de anofelinos apresentou diferença significativa entre os dois tipos de águas testados.

Constatou-se, portanto, aumento da eficácia de *B. sphaericus* 2362 quando aplicado na água preta do rio Negro. A pergunta que sequencia esta constatação é: Porque *B. sphaericus* aumenta sua atividade larvicida em água ácida do rio Negro? O que ocorrerá com *B. sphaericus* quando cultivado com água do rio Negro?

O formulado Spherico mostrou uma redução moderada nos criadouros em condições Amazônica. Será que poderemos obter um formulado mais adequados para o controle de vetores na Amazônia utilizando água do rio Negro?

Agradecimentos

Aos técnicos do Laboratório de Malária e Dengue do INPA pela dedicação nas atividades de campo e aos alunos do Laboratório de Controle Biológico da EMBRAPA de Brasília pelo apoio referente às atividades com o bacilo.

Literatura Citada

- Barjac, H. 1990. Classification of *Bacillus sphaericus* strains and comparative toxicity to mosquito larvae. In: Barjac, H. & Sutherland, D. J. Bacteriol control of mosquitoes & Black flies: biochemistry, genetics & applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press, New Brunswick. 228-236 p.
- Caldas, L.R. 1991. Um Pigmento nas águas negras. Ciência Hoje; Volume especial Amazônia, 123-128 p.
- Finney, D. J. 1981. Probit Analysis. 3 ed. S. Chand & Company Ltda, Ram Nagar, New Delhi. 333p.
- Glare, T.R. 1998. Callaghan M. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Report for the Ministry of Health 57p.
- Habib, M.E.M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. Mem Inst Oswaldo Cruz, 84: 31-43.
- Kelly-Hope, L.A. Yapabandara, A.M.G.M. Wickramasinghe, H. Perera, M.D.B. Karunaratne, S.H.P.P. Fernando, W.P. Abeyasinghe, R.R. Herath, P.R.J. Galappaththy, G.N.L. & Hemingway, J. 2005. Spatiotemporal distribution of insecticide resistance in *Anopheles culicifacies* and *Anopheles subpictus* in Sri Lanka. Royal Society of medicine and Hygiene, 99: 751-761.
- Lacey, L.A. Mulla, M.S. & Dulmage, H.T. 1987. Some factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against blackflies. Environ. Entomol, 7: 583-588.
- Lacoursière, J.O. & Charpentier, G. 1988. Laboratory study of the influence of water temperature and pH on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* efficacy against black fly

- larvae Diptera: Simuliidae). J. Amer. Mosq. Control Assoc., 4:64-72.
- Lane, J. 1953. Neotropical Culicidae. Desanae, Chaoborinae and Culicionae, tribes Anophelini, Toxorhynchitini and Culicini (genus *Culex* only). Published by University of São Paulo, Brazil. Vol. 1.
- Lopes, U.B. 1992. Aspectos físicos, químicos e ecológicos das misturas naturais de águas físico-quimicamente diferentes, na Amazônia. Tese Doutorado, 49p.
- Mulligan, F.S. Schaefer, C.H. & Wilder, W.H. 1980. Efficacy and Persistence of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against Mosquitoes under laboratory and field conditions. J. Econ. Entomol., 73:684-688.
- Ramoska, W.A. Watts S. & Rodriguez, R.E. 1982. Influence of suspended particulates on the activity of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. Journal of Economic Entomology, 75:1-4.
- Regis, L. Silva, S.B. & Melo-Santos, A.V. 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 95: 207-10.
- Rodrigues, I.B. Tadei, W.P. & Dias, J.M.C.S. 1999. Larvicidal activity *Bacillus sphaericus* 2362 against *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* and *Anopheles braziliensis* (Diptera, Culicidae). Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 41:101-105.
- Santos, A. 1983. Limnologia do sistema Tocantins-Araguaia: aspectos físico e biogeoquímicos – São Carlos, Tese Doutorado 257p.
- Scarpassa, V.M. & Tadei, W.P. 1990. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari*. Acta Amazon. 20: 95-118.
- Sioli, H. & Klinger, H. 1962. Solos Tipos de vegetação e águas na Amazônia. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi avulsa 1, 46p.
- Sioli, H. 1968. Hydrochemistry and Geology in the Brazilian Amazon Region. Amazoniana, 3:267-277.
- Tadei, W.P. 2001. Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia. 7a. Reunião Especial da SBPC. Anais/Resumos (CD-ROM). Manaus: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1-6 p.
- Tadei, W.P. & Rodrigues, I.B. 2002. O Controle Biológico para Anofelinos na Amazônia. Anais do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia. [CD-ROM]. 1 – 6p.
- Tadei, W.P. Rodrigues, I.B. Lima, C.P. Pinto, R.C. Oliveira, A.E.M. Santos, J.M.M. Rafael, M.S. Terrazas, W.C.M. & Lopes N.R. 2005. Malária no rio Negro/ AM: importância do igapó na proliferação de *Anopheles darlingi* e sua relação com a transmissão. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 38(suplemento I):505.
- Tadei, W.P. Passos, R.A. Rodrigues, I.B. Santos, J.M.M. & Rafael, M.S. 2007. Indicadores entomológicos e o risco de transmissão de malária na área de abrangência do projeto Piatam. In: Cavalcante, K. V. Rivas, A. F. & Freitas, C. E.C. Indicadores socioambientais e atributos de referência para o trecho Urucu-Coari-Manaus, Rio Solimões, Amazônia, 160p._.
- Tian-Min, Z. You-Guang, M. & Chong-Hu, Z. 1989. Studies on the efficacy and persistence of the microbial agent *Bacillus sphaericus* against larvae of *Culex pipiens pallens*. Chinese Medical Journal, 102:464-468.
- Vatandoost, H. Mashayekhi, M. Aflatoonian, M.R. Hanafi-Bojd, A.A. & Sharifi, I. 2005. Monitoring of insecticides resistance in main malaria vectors in a malarious area of Kahnooj district, Kerman province, southeastern Iran. Journal Vector Borne Dis., 42:100-108.
- Walker, I. 1995. Sedimentation in the inundation forest flanking the Central Amazonian blackwater rio Tarumnã-Mirim (Manaus, Amazonas). Amazoniana, Manaus, Amazonas, v. 13, n. 3/4: 237-243.
- WHO. 2005. Global malaria situation. Disponível em: www.who.int/globalatlas/autorlogin/malaria_login.asp Acesso em: 07 de jun. de 2005.

Available online: www.bioassay.org.br/ojs/index.php/bioassay/article/view/95