

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



**Efecto toxicológico de *Bacillus thuringiensis* H-14
var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en presencia y
ausencia de alimento sobre larvas de *Culex
quinquefasciatus* (Insecta: Diptera), Ayacucho 2014.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA
CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA
PRESENTADO POR LA:

Bach. DE LA CRUZ QUISPE, Edelmira

AYACUCHO – PERÚ

2015

Tesis
B 715
Del
Ej. 1

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

Bach. Edelmira DE LA CRUZ QUISPE

R.D.N°092-2015-UNSCH-FCB-D

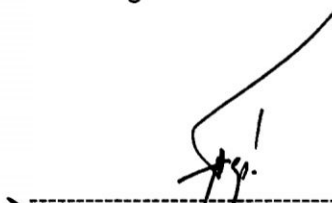
En la ciudad de Ayacucho a los treinta días del mes de abril del año dos mil quince estando reunidos en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, siendo las cinco y quince minutos de la tarde ,reunidos la comisión Evaluadora bajo la presidencia del señor Decano (e) Dr. Homero Ango Aguilar, actuando como miembros del jurado del jurado Evaluador a los docentes Mg Pedro Ayala Gómez , Dr. Edwin enciso Roca, Dr. Carlos E. Carrasco Badajoz y Mc Yuri Ayala Sulca, quien fue encargado como secretario docente a petición expresa del Decano Dr. Homero Ango Aguilar; reunidos con la finalidad de recepcionar el trabajo de investigación "Efecto toxicológico de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) con la disponibilidad de alimento sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* (Insecta: Díptera) Ayacucho 2014." presentado por la Bach. en Ciencias Biológicas Edelmira DE LA CRUZ QUISPE, trabajo de tesis con el cual pretende optar el título profesional de Bióloga con mención en la especialidad de Microbiología.

Habiendo sido verificado la documentación existente y en vista que la señorita sustentante ha cumplido con presentar toda la documentación exigida con fines de titulación, por la facultad, el Dr. Homero Ango (Presidente) autorizo a la sustentante a iniciar su exposición y defensa de su trabajo de investigación, disponiendo para ello de cuarentaicinco minutos; pudiendo utilizar medios electrónicos para dicho fin. Finalizado esta estación, el Decano dio apertura a la siguiente estación de preguntas, sugerencias, observaciones y/o comentarios del Jurado Evaluador, permitiendo que la señorita sustentante haga la defensa de su trabajo de investigación.

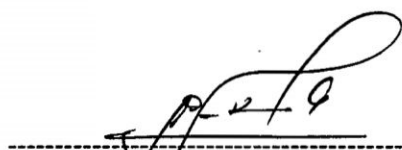
Terminado la etapa de preguntas y/o aclaraciones, el señor Decano (e) ,invito al público asistente y a la sustentante a abandonar el auditorium a fin de que el Jurado evaluador pueda deliberar la calificación de la tesis y la exposición y a su vez puedan realizar las observaciones que consideren pertinentes. Producto de la evaluación obtuvo las siguientes calificaciones:

MIEMBRO JURADO	EXPOSICIÓN	RTA. PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Homero Ango Aguilar	16	16	16
Mg. Pedro Ayala Gómez	17	17	17
Dr. Edwin Enciso Roca	16	16	16
Dr. Carlos Emilio Carrasco Badajoz	16	16	16
Mc Yuri Ayala Sulca	15	15	15
PROMEDIO FINAL:			16


Efectuada la calificación y evaluación final del trabajo de la tesis, la sustentante obtuvo la nota final de Dieciséis (16), como nota final promedio. Finalmente se invitó al público asistente a que reingresen al auditorium, con la finalidad de dar a conocer el resultado final, así como desarrollar el acto protocolar para su reconocimiento como nueva profesional Bióloga en fe de lo cual los miembros jurados firman al pie del presente, como signo de conformidad.



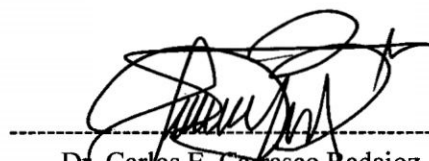
 Dr. Homero Ango Aguilar
 Presidente –Decano (e)




 Mg. Pedro Ayala Gómez
 Miembro-Jurado



 Dr. Edwin Enciso Roca
 Miembro-Jurado



 Dr. Carlos E. Carrasco Badajoz
 Miembro-Asesor



 Mc. Yuri O. Ayala Sulca
 Miembro-Secretario (e)

Nota: La comisión sugiere modificar el Título en los términos siguientes:

“Efecto toxicológico de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en presencia y ausencia de alimento sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* (Insecta: Díptera) Ayacucho 2014.”

Con mucho cariño a mis padres y hermanos
que con su insistencia y apoyo hicieron que
me forjara una carrera.

A mi hijo que es el motor y motivo para
seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por haberme acogido y brindado la oportunidad de formarme profesionalmente y desarrollar capacidades y competencia, para el éxito personal y profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, principalmente de la Especialidad de Microbiología, a los docentes por su abnegada labor y compartir conmigo sus conocimientos y materialización durante mi formación profesional.

A mi asesor Dr. Carlos Emilio Carrasco Badajoz por su orientación y sabios consejos, que han permitido desarrollar este trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que con su invaluable apoyo contribuyeron en la materialización del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	5
2.2.1. Presencia de alimento	5
2.2.2. Toxicología	5
2.2.3. Efecto toxicológico	5
2.2.4. Porcentaje de mortalidad	5
2.2.5. Concentración Letal Media (CL ₅₀)	5
2.2.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>Israelensis</i>	5
2.2.7. <i>Culex quinquefasciatus</i>	5
2.2.8. Vectobac – WG	5
2.3. Bases teóricas	6
2.3.1. La bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.3.2. Larvicida biológico: Vectobac –WG Larvicida	10
2.3.3. Toxicidad	12
2.3.4. Dosis letal media (DL50) y concentración letal media (CL50)	12
2.3.5. Orden Díptera: familia Culicidae	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Ubicación de la zona de estudio	17
3.2. Población y muestra	17
3.2.1. Población	17
3.2.3. Unidad experimental	18
3.3. Metodología	18
3.3.1. Obtención de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	18
3.3.2. Identificación de <i>Culex quinquefasciatus</i>	18
3.3.3. Prueba de laboratorio	18
3.4. Análisis estadístico	19
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	27

VI. CONCLUSIONES	33
VII. RECOMENDACIONES	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.	Aplicación y dosis a emplear de Vectobac-WG para el control de plagas	11
Tabla 2.	Disposición de frascos con diferentes concentraciones de Vectobac-WG	19

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1.	Detalles morfológicos de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	7
Figura 2.	Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	8
Figura 3.	Producto Vectobac-WG.	10
Figura 4.	Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	15
Figura 5.	Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> frente a <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.	21
Figura 6.	Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> frente a cuatro concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.	22
Figura 7	Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> frente a la combinación de cuatro concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.	23
Figura 8	Tendencia del porcentaje de mortalidad estimada y concentración letal media (CL ₅₀) de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) para larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> en un medio con presencia de alimento.	24
Figura 9	Tendencia del porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL ₅₀) de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) para larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> en un medio sin presencia de alimento.	25

ÍNDICE DE ANEXOS		Página
Anexo 1.	Estadísticos descriptivos del porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> en tratamientos resultado de la combinación de cuatro concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) y medios con y sin presencia de alimento.	41
Anexo 2.	Prueba de Kruskal-Wallis para el porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> causado por <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.	42
Anexo 3.	Prueba de Kruskal-Wallis para el porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> causado por cuatro concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG).	43
Anexo 4.	Prueba de Kruskal-Wallis para el porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> según los tratamientos resultado de la combinación de cuatro concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) con y sin presencia de alimento.	44
Anexo 5.	Valores de los porcentajes de mortalidad de <i>Culex quinquefasciatus</i> a diferentes concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en un medio con presencia de alimento.	45
Anexo 6.	Valores de los porcentajes de mortalidad de <i>Culex quinquefasciatus</i> a diferentes concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en un medio sin presencia de alimento.	46
Anexo 7.	Registro fotográfico del proceso experimental.	47
Anexo 8.	Matriz de consistencia.	51

RESUMEN

En el control de mosquitos como *Culex quinquefasciatus*, se han utilizado controladores tanto como agentes químicos, como biológicos: depredadores, parasitoides y patógenos. Sin embargo es poco conocido el uso del producto comercial de Vectobac-WG que contiene el formulado de gránulos de *Bacillus thuringiensis*. Con la presente investigación pretendemos contribuir con la información ya que estos mosquitos tienen importancia médica. El objetivo fue evaluar el efecto toxicológico de cuatro concentraciones crecientes de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) bajo tratamiento con y sin presencia de alimento, en larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*, con cuatro repeticiones y un blanco experimental (control). Las larvas de *Culex* fueron colectadas en tres baldes de plástico que actuaron como criaderos de éstos organismos que fueron puestas en un jardín. El efecto toxicológico fue evaluado a las dos horas de aplicado el bioinsecticida, como número de larvas muertas. Se determinó que en pruebas con suministro de alimento la mortalidad de larvas fue de un 41% frente a un 65,7% de mortalidad en medios de tratamiento sin alimento siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$); por otro lado, en el medio de menor concentración que fue de 0,00113 g/L el porcentaje de mortalidad promedio fue de 60,63%; mientras que en el de mayor concentración que fue de 0,00904 g/L la mortalidad alcanzó valores de 67,50%, sin embargo dichos valores son estadísticamente similares entre sí. Los valores de la concentración letal media en condiciones de laboratorio con suministro de alimento fueron de 0,0065 mg/L, mientras que sin presencia de alimento fue -0.0088 mg/L.

Palabras clave: efecto toxicológico, *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG), *Culex quinquefasciatus*.

I. INTRODUCCIÓN

De las especies vectores, los culícidos constituyen el grupo más numeroso, siendo responsables de la transmisión de importantes enfermedades al hombre¹ motivo por el cual se han venido empleando productos químicos para su control.

Ante el impacto ecológico provocado sobre la biósfera, la popularidad de los métodos químicos para el control de plagas ha decaído. En su lugar se promueven nuevas soluciones que incluyen el empleo de agentes de control biológico, alternativa que crece rápidamente como estrategia de lucha antivectorial,² las estrategias empleadas en el control de larvas de mosquitos como *Culex quinquefasciatus* van desde el uso de agentes químicos hasta los controladores biológicos.³ Dentro del control Biológico de insectos de importancia médica, una alternativa es el uso del producto (Vectobac-WG) que es un concentrado de *Bacillus thuringiensis* que es utilizado potencialmente como agente de control en otros países como Panamá y Cuba, ya que son tóxicos para larvas de insectos. *Bacillus thuringiensis* var israelensis Bti es un entomopatógeno de especificidad para culícidos y simúlidos de importancia médica.⁴ Son ingeridos por larvas del insecto y al ser tóxicos acaban con la vida de éste, estos microorganismos habitan en el suelo. Por lo señalado, se ha propuesto determinar a qué concentración el producto Vectobac-WG muestra mayor mortalidad con y sin presencia de alimentos.

Por las razones señaladas en el presente trabajo de investigación se ha trazado los siguientes objetivos:

Objetivo General

Evaluar el efecto toxicológico de cuatro concentraciones crecientes de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) con y sin presencia de alimento, en larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*.

Objetivos Específicos

- a. Determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* sometidos a cuatro concentraciones crecientes de Vectobac-WG.
- b. Comparar el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus* sometidas a cuatro diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en condiciones de disponibilidad o ausencia de alimento.
- c. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de Vectobac-WG sobre larvas *Culex quinquefasciatus* en presencia y ausencia de alimento.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Corbillón,⁵ evaluó la influencia de los factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 contra larvas de *Aedes aegypti*, en la que se probó la disponibilidad de alimento, densidad y estadio larvario, se utilizó un biolarvicida comercial (Bactivec, Labiofam) y una cepa de referencia de *Aedes aegypti* Rockefeller. Se halló que la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 fue menor en la medida en que avanzó la densidad y el estadio de desarrollo larvario, con lo que concluye que la eficacia puede tener relación con la conducta de alimentación y la disponibilidad del principio activo, la presencia de abundante alimento también limitó la eficacia por un efecto de competencia.

Arjona,⁴ determinó que *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* Bti es un entomopatógeno de alta especificidad para culícidos y simúlidos de importancia médica. El trabajo fue realizado probando Bti en lagunas de oxidación (Miraflores, Panamá) contra larvas del género *Culex* del tercer y cuarto estadio (L3/4), con el objeto de determinar la formulación y concentración más adecuada para el control de estos mosquitos. En pruebas preliminares de laboratorio se determinó que concentraciones de 1.0 ppm o menores, no alcanzaron el 100% de mortalidad en larvas de *Culex* (L3/4), capturadas en las lagunas. Sin embargo, cuando se utilizaron acuarios con 10 litros de agua de criadero y más de 500 larvas de *Culex spp* por acuario, se registró a las 24 horas de exposición, 100% de mortalidad a una concentración de 3,0 ppm de Bti. Los bioensayos en el campo con cuatro formulaciones (ABG-6145, 0,6% i,a – 600 AA; Bactimos-briquetas 5% i,a – 800 AA; Vectobac-WG 0,2% i,a – 200 AA y Bactimos-FC 14,3% i,a – 1000 AA), mostraron un control por encima del 80% a las 24 horas post-tratamiento. El Bactimos-FC por su alta efectividad (>90%), fácil manejo y aplicación, y por disponerse en

cantidades suficientes fue seleccionado para una evaluación más rigurosa, que consistió en aplicar siete concentraciones con tres réplicas (0,28, 0,56, 1,12, 1,67, 2,24, 2,78 y 3,3 mL/m²). Se calcularon los porcentajes de reducción corregidos (fórmula de Henderson) para los días +1, +3 y +7 post-tratamiento, las cuales promediados fueron 95, 90 y 46 % respectivamente. Utilizando la prueba no-paramétrica de Friedman no se demostró diferencia significativa en los porcentajes de reducción obtenidos con las 7 concentraciones aplicadas, ni en las reducciones promedios de las diferentes especies de *Culex*, pero sí hubo diferencia significativa en los porcentajes de reducción para los días +1, +3 y +7 post-tratamiento. Concluyó que a una concentración de 0,28 mL/m² de Bactimos FC 14,3% es la recomendada para el control de *Culex spp* (III-IV) en las lagunas de oxidación, descargando 2,0 gal.dilución /180 m² con un restablecimiento de 34% al séptimo día post-tratamiento (AU).

Gómez,⁶ determinaron que al evaluarse la efectividad y permanencia del biolarvicida *Bacillus thuringiensis* SH-14 var. *Israelensis*, en la localidad de Fomento, provincia Sancti Spíritus, Cuba, y en la que se utilizó muestreos sistemáticos y de acciones de control de los programas provinciales de vigilancia y lucha anti vectorial, recogidos en los expedientes de cada criadero en la Unidad Municipal de Higiene y Epidemiología de la localidad, se halló que aplicando dosis de 10 mL de ingrediente activo por metro cuadrado, se redujo y estabilizó los índices larvales y de adultos en cebo humano de importantes especies vectores de malaria, filariasis, y fiebre del Nilo occidental, así mismo se comprobó la extensión del rango de recuperación larval hasta las 3 semanas.

Sulaiman,⁷ determinaron que al probarse la eficacia de tres formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* (VectoBac G, VectoBac 12AS como suspensión acuosa, y Bactimos WP con polvo humectante) sobre *Aedes albopictus* en los neumáticos desechados; se halló que tanto VectoBac G y VectoBac 12AS fueron eficaces a las 24 horas generando una mortalidad de más del 80%. Ambas formulaciones vectobac fueron significativamente más eficaz que Bactimos WP durante 24 horas después del tratamiento ($p < 0,0005$). Una semana después del tratamiento, VectoBac 12AS fue significativamente diferente de Bactimos WP ($p < 0,05$). Sin embargo, Vectobac G no difirió significativamente de Bactimos WP ($p > 0,05$), dos semanas después de la pulverización no hubo una diferencia significativa entre las diferentes formulaciones ($p > 0,05$).

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Presencia de alimento

Disponibilidad de recursos que permite satisfacer las necesidades alimentarias de los seres vivos.

2.2.2. Toxicología

Estudia los efectos nocivos de los agentes químicos, biológicos y de los agentes físicos en los sistemas biológicos y que establece, además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a previos agentes.

2.2.3. Efecto toxicológico

Respuesta aguda de modelos biológicos a la acción de agentes químicos como muerte, el que también puede ser considerado como la falta de movimiento (nock dow).

2.2.4. Porcentaje de mortalidad

Frecuencia de individuos muertos o inmóviles (nock down) en relación con el total de individuos sometidos a la acción de un agente químico.

2.2.5. Concentración Letal Media (CL₅₀)

Es la concentración de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba. Es empleada como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia

2.2.6. *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis*

Bacteria Gram positiva que habita en el suelo, y que se utiliza comúnmente como una alternativa biológica para el control de los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Orthocladius*, *Tipula*, *simulium*.

2.2.7. *Culex quinquefasciatus*

Mosquitos hematófagos de la familia *Culicidae*; muchas de sus especies actúan como vectores de importantes enfermedades, como el Virus del Nilo Occidental, filariasis, encefalitis virales (japonesa, equina venezolana y San Luis) y la malaria aviar.

2.2.8. Vectobac – WG

Formulado comercial en gránulos de *Bacillus thuringiensis* variedad *Israelensis* (serotipo H-14).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. La bacteria *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales. Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimiorganótrofo y con actividad de catalasa. La característica principal de *B. thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos. Estas proteínas se llaman Cry (del inglés, Crystal) y constituyen la base del insecticida biológico. Ciclo de vida tiene dos fases: la vegetativa y generan esporas, la primera es la bacteria tiene una forma bacilar con un tamaño promedio de 2-5 micras de largo por 1 micra de ancho, la división celular es por fisión binaria. La fase de esporulación se induce por condiciones adversas del medio de cultivo siendo los factores más importantes ambientales: baja concentración de nutrientes, disminución del pH (ácido), disminución de la humedad (sequedad), reducción del nivel de O_2 en el medio donde se halla; la composición química de la cubierta externa de la spora le confiere termo resistencia, le protege contra desecación. En un ambiente con las condiciones adecuadas la spora germina y da lugar a la fase vegetativa, simultáneamente a la formación de esporas, a la producción de cristales protéicos, los que varían en su composición, de acuerdo a la variedad (población de organismos de una misma especie, que se pueden diferenciar por su comportamiento, pruebas bioquímicas, etc.) pudiendo alcanzar hasta el 30% del peso seco de la célula vegetativa.⁸

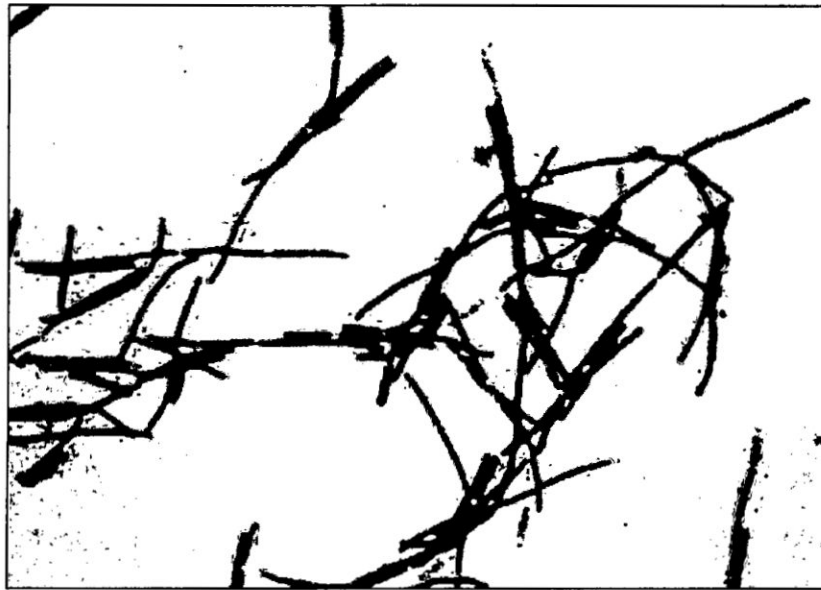


Figura 1. Detalles morfológicos de *Bacillus thuringiensis*.¹⁰

a. Situación taxonómica y clasificación

Bacillus thuringiensis pertenece a la familia Bacillaceae y se ubica dentro del grupo 1 del género *Bacillus*; forma parte del grupo de *Bacillus cereus*, el que incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, así como también a los más recientemente descritos *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis*. *B. thuringiensis*, se clasifica en 84 serovares mediante serología del antígeno flagelar H. El serotipo H-14 tiene todas las características bioquímicas y morfológicas comunes a todas las cepas del *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* produce cristales de proteínas de todas formas y tamaños, en tanto que otras variedades de la bacteria producen típicamente cristales de proteína en forma de diamante.⁹

La clasificación taxonómica des esta bacteria es la siguiente.¹⁰

Reino	: Eubacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Bacillales
Familia	: Bacillaceae
Género	: <i>Bacillus</i>
Especie	: <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner 1915
Variedad	: <i>Israelensis</i>
Serotipo	: H-14

b. Toxinas y mecanismos de acción

Investigación sobre la bioquímica de Bti, se reporta que el cristal, está dividido en regiones o subunidades de proteína, las cuales tienen actividad enzimática proteolítica similar a la tripsina del insecto. La ingestión de cristales y esporas por el insecto, revela una interacción entre el cristal y el intestino del hospedero, cuando un insecto susceptible los ingiere sus enzimas digestivas los hidrolizan en el ambiente alcalino de su intestino, lo que causa daño en las células epiteliales de la pared intestinal, así el insecto muere en menos de una hora o en varios días, depende de la dosis ingerida, cuando una larva consume cristales sin espora ocurre una secuencia idéntica de estos eventos, en consecuencia la parálisis y muerte del insecto, en donde las esporas son pasivas hasta que el pH disminuye a 7, lo que estimula su germinación, ya que las esporas sobreviven en casos específicos, como en graneros lo cual provoca epizootia por la invasión masiva de Bt en el insecto.¹¹

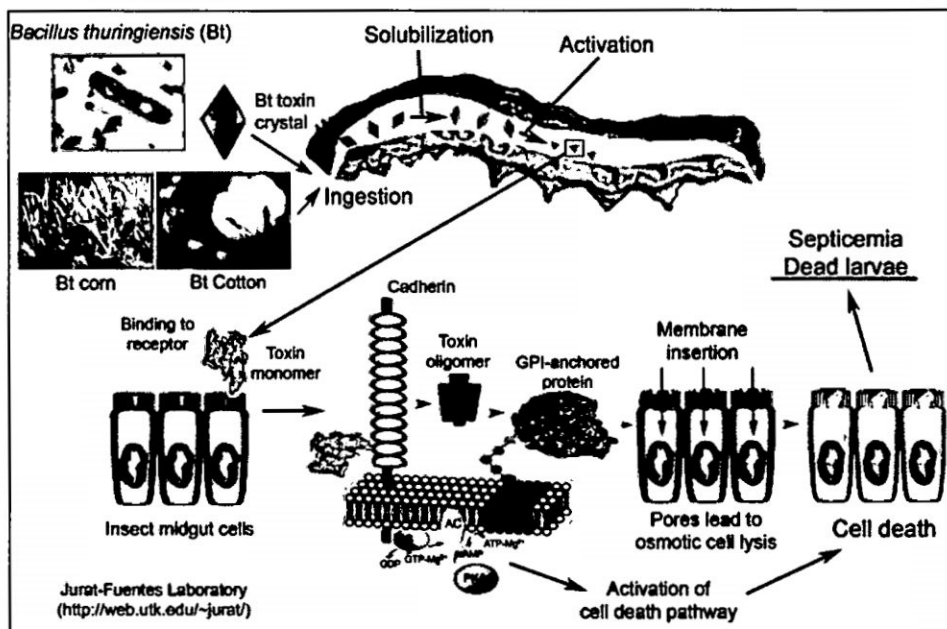


Figura 2. Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*.²⁰

c. Proceso de Esporulación

Según Sansinenea,¹² el proceso de esporulación comprende las siguientes fases o estadios:

- Estadio I:

En ella se inducen los genes que iniciarán la esporulación. Este punto puede ser reversible si se adicionan nutrientes.

- Estadio II:

A partir de este estadio de esporulación, el proceso es irreversible y continuo hasta finalizar con la formación de la espora. En este estadio, la bacteria forma un septo de división asimétrico.

- Estadio III:

Aquí, se inicia la síntesis del cristal insecticida, la cual continuará hasta el final de la esporulación. La síntesis del cristal insecticida se da a partir de dos promotores que funcionan secuencialmente.

- Estadio IV:

En este estadio y en el estadio anterior (III) es activado el promotor sigma.

- Estadio V

Inicia el proceso de formación de la espora.

- Estadio VI

Culmina la formación del cuerpo parasporal.

- Estadio VII

En este estadio finalmente se sintetizan enzimas líticas que liberan a las esporas y los cristales insecticidas.

d. Factores de virulencia producidos por *Bacillus thuringiensis*

Además de las δ -endotoxinas, *B. thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Entre estos factores de virulencia se encuentran: fosfolipasas, proteasas, quitinasas, α -exotoxinas o exotoxinas termolábiles, las β -exotoxinas, las cuales son toxinas que funcionan como análogos de ATP y las proteínas VIP, que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento. Las proteínas VIP se han cristalizado y contienen un dominio semejante al sitio activo de proteínas con actividad de ribosilación de ADP. Se propone que estos factores ayudan a la bacteria en la infección del insecto. Se ha reportado que en algunos casos la mezcla esporas/cristales mata mucho más eficiente que los cristales solos.¹¹

e. Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Como se mencionó, existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. A la fecha se han clonado y secuenciado 166 diferentes genes *cry*

y 16 diferentes genes *cyt*. La primera clasificación de las δ -endotoxinas se basó en la especificidad de la actividad insecticida. En esta clasificación las toxinas CryI eran las que presentaban actividad contra insectos lepidópteros, las toxinas CryII eran proteínas más pequeñas de 70 kDa, actividad contra lepidópteros y dípteros, las toxinas CryIII eran proteínas activas contra insectos coleópteros; las toxinas CryIV activas contra insectos dípteros y las CryV.y CryVI activas hacia nemátodos, en donde el CryVI era un grupo que no tenía homología con el grupo CryV. Sin embargo, muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes, pero con especificidad diferente o toxinas Cry con actividad dual hacia lepidópteros y coleópteros, las cuales también las llamaron CryV, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto propició que se creara una nueva nomenclatura de las δ -endotoxinas basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria. En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína parasporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. A la fecha las proteínas Cry están agrupadas en 28 grupos y varios subgrupos y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos.⁹

2.3.2. Larvicida biológico: Vectobac –WG Larvicida

Según Arjona,⁴ el producto comercial Vectobac –WG es un compuesto biológico que, aplicado sobre el agua, tiene la propiedad de controlar exclusivamente larvas de mosquitos, sin dañar otras especies (peces, caracoles, crustáceos, etc.



Figura 3. Producto Vectobac-WG.²²

a. Características del larvicida biológico Vectobac – WG

Formulación tipo gránulo dispersable en agua que contiene esporas de *Bacillus thuringiensis* serotipo H - 14. Son efectivos frente a larvas de mosquitos. Esta formulación seca ofrece múltiples ventajas.¹³

- Mezcla fácilmente en agua.
- Actividad altamente específica sobre mosquitos.
- Rápida acción sobre las larvas de mosquito (2 a 24 horas).
- Resultados visibles rápidamente en campo.
- Fácil aplicación.
- Prolongado tiempo de almacenamiento.
- Reducido peso para transportar.

Su actividad insecticida es por ingestión. La fuente principal de actividad de los *Bacillus thuringiensis* proviene del cristal proteico que contienen, que actúa cuando se disuelve en el interior del intestino debido a la alcalinidad del pH intestinal de las larvas de las especies diana. Ello permite la liberación de compuestos tóxicos que rompen la pared del intestino medio de las larvas provocando el cese de la alimentación y la posterior muerte de las larvas. Es respetuoso con la fauna útil, no perturbando el equilibrio ecológico, es inocuo para el hombre y la fauna terrestre y acuática.¹³

Tipo de formulación: Gránulo dispersable en agua (WG).

Composición: *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* (serotipo H-14) 37,65%.

b. Aplicación y dosis:

Tabla 1. Aplicación y dosis a emplear de Vectobac – WG para el control de plagas, según las recomendaciones del producto.⁴

Uso	Vector	Dosis
Ambientes acuáticos (Marismas, charcas, acequias, canales, balsas y lagunas) y en plantas de tratamiento de aguas residuales)	Larvas de mosquitos (<i>Aedes sp.</i> y <i>Culex sp.</i>) y mosca negra (<i>Simulium erythrocephalum</i>).	250 – 500 g/ha 1000 g/ha en caso de elevada contaminación.

c. Modo de empleo

Aplicar en pulverización diluido en la conveniente cantidad de agua, según técnica de aplicación. Utilizar la dosis más elevada en casos en que las aguas estén muy polucionadas, cuando haya predominio de larvas muy desarrolladas, elevada población de mosquitos, elevada concentración de materia orgánica, abundancia de algas o vegetación acuática densa. Aplicar uniformemente por medios

terrestres. En caso de necesidad de repetir la aplicación a intervalos de 7 – 14 días. No debe mezclarse con otros productos, ya que se podría alterar la viabilidad de las esporas. El momento más oportuno para su aplicación es el principio del desarrollo de las larvas.⁷

2.3.3. Toxicidad

Un residuo es tóxico si tiene el potencial de causar la muerte, lesiones graves, efectos perjudiciales para la salud del ser humano si se ingiere, inhala o entra en contacto con la piel. Se ha optado por una definición de toxicidad totalmente cualitativa para evitar análisis sofisticados de laboratorio para la clasificación de los residuos. Sin embargo, una definición más exacta requiere la utilización de límites cuantitativos de contenido de sustancias tóxicas el uso de definiciones que establecen la LC₅₀ (concentración letal media que mata al 50% de los organismos de laboratorio).¹⁴

El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos. Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico.¹⁵

2.3.4. Dosis letal media (DL50) y concentración letal media (CL50)

El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio, es un importante parámetro de caracterización denotado como DL₅₀ por dosis letal media (o DE₅₀ por dosis efectiva media, CL₅₀ por concentración letal media, CE₅₀ por concentración efectiva media y Ltm por límite de tolerancia media). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL₅₀, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo. La determinación de la DL₅₀, se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias; en el desarrollo de pesticidas se utiliza para determinar los límites de resistencia de insectos, por ejemplo, ante ciertos biocidas a concentraciones altas se puede llegar a correlacionar la bioactividad con el valor de la DL₅₀ y al mismo tiempo su grado de toxicidad. La determinación de la DL₅₀ requiere de la estadística cuantil, para lo cual es necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en

unidades Anglit, Logit o Probit y las dosis suministradas en unidades logarítmicas conocidas como dosis metamétricas.¹⁴

2.3.5. Orden Díptera: familia Culicidae

La familia Culicidae, nombre derivado de *Culex*, nombre latín para “mime”, es un miembro de los Nematóceras, de la infra-orden Culicomorpha de los Díptera. Contiene dos super-familias que incluyen a todos los nematoceros que pican y chupan, ambas depredadores y consumidores de sangre. La super-familia Chrinomoidea contiene a las familias Chrinomidae y Thaumaleidae que tienen partes bucales que no penetran la piel. Los Simulidae y Ceratopogonidae que pican vertebrados e invertebrados, la superfamilia Culicoidea comprende a los; Dixidae, Corethrellidae, Chaoboridae y los Culicidae, el segundo y el cuarto se alimentan de sangre de vertebrado. Sin embargo, entre todos los culicomorfos, la probosis larga de los mosquitos es particular. Está considerada como la parte bucal para picar más especializada entre los Nematóceras y apunta a una asociación muy cercana entre los mosquitos y los vertebrados.¹⁶

Los culícidos consisten de unas 3,200 especies descritas. Se considera que quedan muchas especies por describir, sobre todo de bosques tropicales. Las especies más estudiadas dejan entrever que consisten de complejos de especies parecidas lo que apunta a la capacidad de especialización atendiendo a las particularidades de los nichos que se hacen disponibles en un ecosistema. La clasificación presente de los culícidos reconoce tres sub-familias: Anophelinae, Culicinae, y la Toxorhynchitinae. Estudios cladísticos recientes apoyan el concepto de que los Anophelinae están remotamente distantes de los otros dos grupos y que los Toxorhynchitinae no merecen el estatus de sub-familia. Los huevos de anofelinos tienen flotadores característicos, las larvas carecen de tubos de aire y los adultos tienen palpos largos en los dos sexos. Las larvas de culícinos y de toxorinchitinae tienen tubos de aire y las hembras tienen palpos cortos. Los Toxorhynchitinae son depredadores como larvas y típicamente más grandes de lo normal, con probosis curva adaptada para alimentarse de néctar.¹⁷

a. Características morfológicas

Los mosquitos pertenecen a la Familia Culicidae, dentro del Orden Díptera (di = dos; ptera = alas), presentan un par de alas funcionales, mientras que el segundo par se ha transformado en pequeñas estructuras llamadas balancines o halterios que actúan como órganos para el equilibrio durante el vuelo. Los adultos son en general pequeños, de cuerpo delgado y patas largas (de ahí el nombre común de

zancudos), siendo generalmente los machos de menor tamaño que las hembras. Las alas son angostas y están cubiertas de escamas. El aparato bucal es largo, en el caso de los machos es de tipo chupador y en las hembras es picador-chupador. Los huevos son alargados, en general elípticos color claro al momento de ser colocados y se van oscureciendo después de algunas horas.¹⁸

b. Ciclo biológico

Los mosquitos pasan por cuatro estados durante su ciclo biológico (o ciclo de vida): huevo – larva – pupa– adulto. Los estados inmaduros (huevo – larva – pupa) son acuáticos, en tanto que los adultos son de vida terrestre. Los huevos pueden ser colocados en la superficie del agua, en la vegetación acuática o en lugares húmedos. Las larvas se alimentan de microorganismos y existen otras que son depredadoras; se dirigen periódicamente a la superficie para respirar. Las pupas no se alimentan y tienden a permanecer inmóviles. Los adultos buscan refugio en lugares húmedos y sin corrientes de aire. Los machos se alimentan de sustancias azucaradas (néctar y exudados de frutos), las hembras también ingieren sustancias azucaradas, pero necesitan además ingerir sangre (hematofagia) para poder desarrollar los huevos. El ciclo completo de huevo a adulto en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, ocurre en aproximadamente diez días. En los adultos, las hembras son más longevas que los machos. Generalmente, el período de vida de las hembras es de aproximadamente 2 semanas a un mes; en algunos casos, tanto en condiciones naturales como de laboratorio, la supervivencia puede ser de varios meses. Una hembra puede poner entre 100 y 300 huevos luego de ingerir sangre, pudiendo realizar varias ingestas a lo largo de su vida y depositar en consecuencia una cantidad importante de huevos.¹⁹

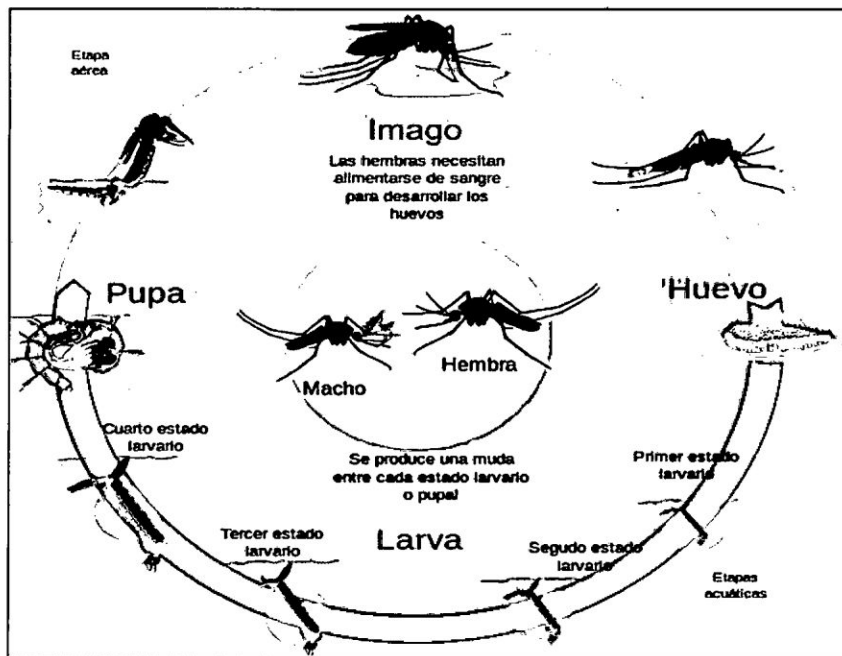


Figura 4. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus*.¹⁹

c. Ecología

Tienen amplia distribución en el mundo. Desde los trópicos a las regiones templadas, llegando incluso hasta el Círculo Polar Ártico, sin embargo, no se encuentran en la Antártida y en unas pocas islas. Las modificaciones del ambiente, producto de la actividad humana, afectan a las poblaciones de animales estimulando su crecimiento o disminución, o bien modificando sus hábitos. Algunas especies pueden adaptarse y colonizar nuevos lugares al ser eliminados los sitios naturales de cría. El proceso de adaptación al ambiente humano, o antrópico, ha quedado demostrado por la presencia de especies de mosquitos que, por ejemplo, se crían tanto en su medio natural como en ambientes urbanos.²⁰

En la ciudad de Ayacucho la presencia de *Culex quinquefasciatus* colonizan diversos recipientes o contenedores con presencia de aguas temporales empozadas en baldes, piletas, lagunas de oxidación, con abundante materia orgánica en descomposición, los cuales son hábitats propicios para el desarrollo de estos organismos.²⁹

d. Clasificación taxonómica

La clasificación de esta familia de dípteros es la siguiente.¹⁸

Dominio : Eukaryota
 Reino : Animalia

Subreino : Metazoa
Filo : Arthropoda
Clase : Insecta
Subclase : Pterygota
Infraclase : Neoptera
Superorden : Endopterygota
Orden : Diptera
Suborden : Nematocera
Infraorden : Culicomorpha
Familia : Culicidae
Género : Culex
Especie *Culex quinquefasciatus*

e. Importancia en la salud pública

El número de especies de mosquitos adaptados al ambiente antrópico (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus*, entre las más conocidas) está en aumento, ya que encontraron en este medio los recursos necesarios para su desarrollo. Solamente las hembras son importantes desde el punto de vista sanitario por ser transmisoras de patógenos causantes de enfermedades como la malaria o paludismo, dengue, fiebre amarilla, encefalitis y filariosis, entre otras. El mecanismo de infección es mediante la saliva anticoagulante que el mosquito hembra inyecta al succionar sangre, para que esta pueda seguir fluyendo. En esa saliva se encuentran los agentes patógenos. Cabe destacar que estos insectos son vectores de las enfermedades, es decir que transportan en su cuerpo virus u otros agentes infecciosos, transmitiéndolos de organismos infectados a otros sanos.²⁰ En áreas donde no existe riesgo de transmisión de agentes patógenos por parte de esta especie, constituye un problema de salud pública debido a la alergia ocasionada por su picadura y a las molestias causadas por las altas densidades de población que alcanzan,¹⁹ tal como ocurre en nuestra región, principalmente en épocas donde existe precipitación pluvial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el distrito de Ayacucho, ubicado políticamente en la provincia de Huamanga-Ayacucho. Teniendo como centros de investigación el Laboratorio de Ecología Biodiversidad y Sistemas de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), ubicado en la Ciudad Universitaria Universidad Nacional de san Cristóbal de Huamanga (UNSCH).

Geográficamente la ubicación del lugar donde se desarrolló el trabajo de investigación es la siguiente (sistema de coordenadas proyectada Universal Transversal de Mercator, UTM):

Longitud : 634788,67

Latitud : 8603575,11

Altitud (m.s.n.m) : 2791

Larvas de *Culex quinquefasciatus*: fueron colectadas de baldes instalados en las parcelas de una huerta ubicados en la provincia de Huanta en el distrito de Huanta ubicadas geográficamente.

Longitud : 581611.56

Latitud : 8569856.27

Altitud (m.s.n.m) : 2666

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Producto bioinsecticida en base a *Bacillus thuringiensis* comercializadas en polvo concentrado bajo el nombre de Vectobac-WG

3.2.2. Muestra

Cien mg de del producto comercial Vectobac-WG.

3.2.3. Unidad experimental

Frascos de plástico transparente con capacidad para un litro de agua conteniendo 20 larvas de *Culex quinquefasciatus*.

3.3. Metodología

3.3.1. Obtención de larvas de *Culex quinquefasciatus*

Para la obtención de larvas del IV instar de *Culex quinquefasciatus* se procedió a la instalación de baldes de plásticos de aproximadamente 20 L en lugares abiertos sin exposición directa a los rayos del sol, a los que se agregó agua hasta la mitad de su capacidad, con la finalidad de generar un ambiente adecuado para la ovoposición de las hembras adultas y la sobrevivencia de las larvas, se agregó un manojo de alfa alfa con la finalidad de incrementar la cantidad de materia orgánica. Se esperó varios días hasta que aparezcan los huevos, las mismas que se presentaron a manera de balsas. Posteriormente se hizo inspecciones minuciosas diarias con la finalidad de determinar el momento en la que se presentan larvas del IV instar que tienen un comportamiento al colgar la cabeza hacia abajo con respecto a la superficie del agua, los cuales fueron establecidos porque presentaban el mayor tamaño. Este hecho determinó la colecta de las larvas con un calcalillo los que fueron colocados en recipientes conteniendo agua fresca las mismas que fueron trasladadas al laboratorio para su empleo en pruebas de toxicidad.

3.3.2. Identificación de *Culex quinquefasciatus*

Las larvas colectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Ecología Biodiversidad y Sistemas de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas, para su posterior identificación, tomando una serie de características morfológicas, como el sifón respiratorio largo, el cual presenta 4 pelos 1-S multiramificados, además también se observan dientes del pecten ocupando menos del 0,75 de la base del sifón, para el cual se empleó las claves taxonómicas según Zapata P, Manrique S, Rebollar T, Che M. y Dzul M.³⁰

3.3.3. Prueba de laboratorio

Las larvas destinadas para el experimento fueron seleccionadas considerando los de mayor tamaño (IV estadio con un promedio: 1.0 a 1.2 cm de tamaño),³⁰ los que fueron mantenidas en un recipiente (acuario) por un tiempo mínimo de 24 horas antes de la prueba de toxicidad.

Las larvas fueron instaladas en recipientes de plástico (unidades de experimentación) conteniendo aproximadamente un litro de agua de clorada en el

que se colocó 20 larvas de *Culex quinquefasciatus*. Dichas unidades de crianza fueron distribuidas en cuatro grupos, correspondiendo cada uno a diferentes concentraciones del bioinsecticida con cuatro repeticiones cada grupo, más un recipiente sin el bioinsecticida (blanco), tal como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 2. Disposición de frascos con diferentes concentraciones de Vectobac-WG

Recipiente	Nº de individuos (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	Concentración de Vectobac -WG (g/L)	Dosis en campo (g/has)
Blanco	20	0	0
1	20	0,00113	100
2	20	0,00226	200
3	20	0,00452	400
4	20	0,00904	800

Se consideró dos grupos similares en los que a un grupo se le suministro alimento balanceado diariamente para peces de acuario; así mismo las unidades de experimento fueron de cuatro repeticiones.

Las soluciones de Vectobac-WG fueron preparados en las concentraciones señaladas en la tabla 2, una a dos horas antes de iniciar el bioensayo, porque se consideró la concentración de la proteína cristalizada y las esporas, ya que la formulación del producto dice contener excipientes.

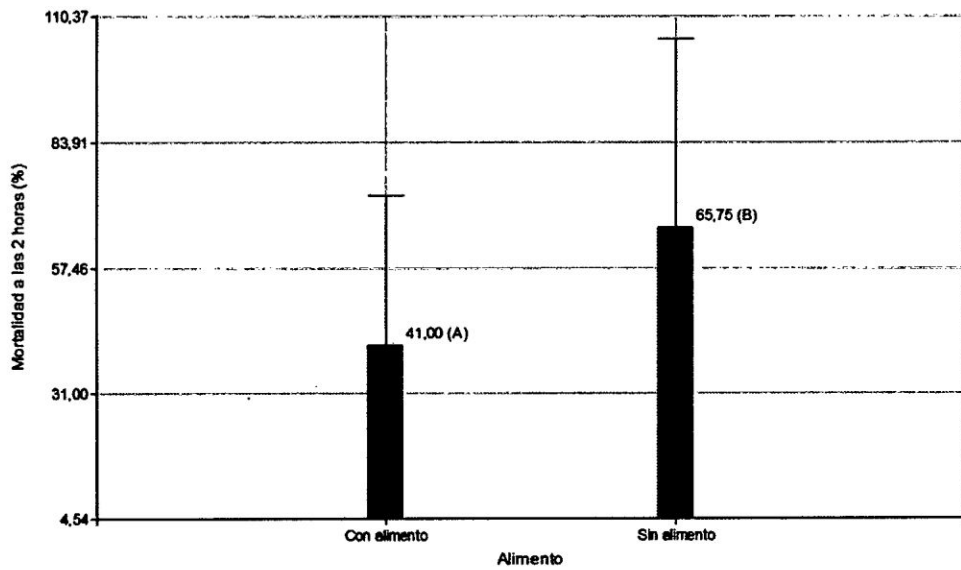
Una vez colocadas las larvas de los dípteros en los recipientes conteniendo las concentraciones respectivas del bioinsecticida, a las dos horas se realizó inspecciones minuciosas con la finalidad de determinar el número de larvas muertas en cada recipiente, con la ayuda de una pipeta se retiró las larvas inmóviles (muertas), de las unidades experimentales.

3.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron presentados en tablas y figuras quienes mostraron estadísticos de tendencia central y de dispersión. Con la finalidad de comparar las mortalidades registradas en las cuatro concentraciones del bioinsecticida con y sin presencia de alimento, se empleó el análisis de varianza no paramétrica donde se analizó el efecto de la concentración del Bti y de la presencia de alimento, debido a que los datos no presentaron una distribución normal, así mismo se trabajó con una confiabilidad del 95% ($\alpha = 0.05$). Para la estimación de la Concentración Letal

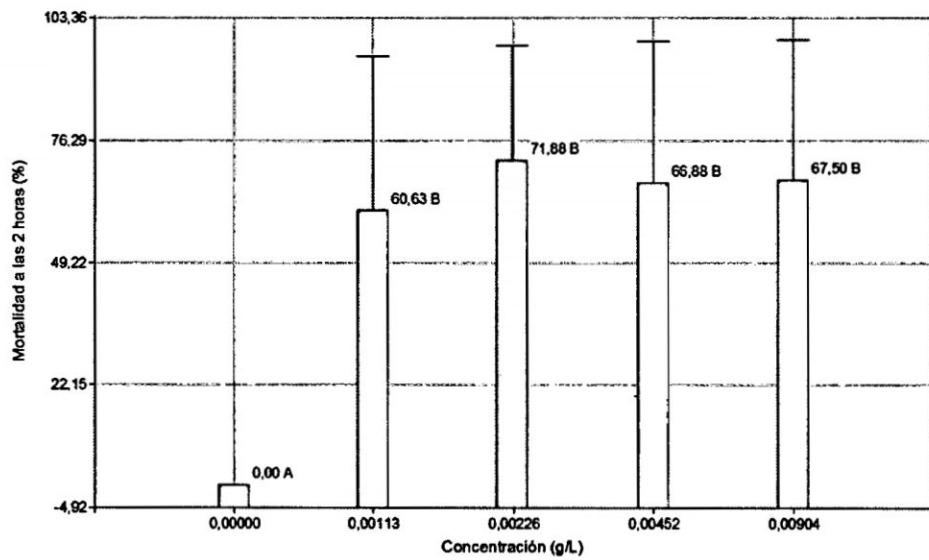
Media, se empleó la metodología de Probit. En todos los casos, se empleó el software SPSS 22 y MINITAB 15 para realizar los análisis estadísticos.

IV. RESULTADOS



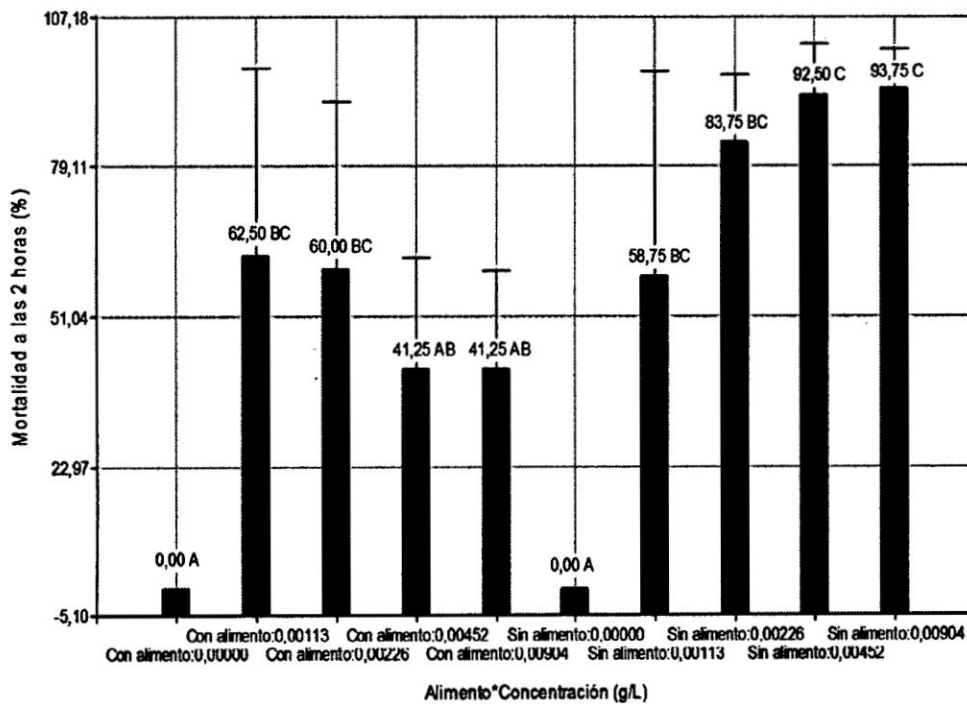
Prueba de Kruskal-Wallis: $H = 5,29$; $p = 0,0205$
(A) y (B): Rangos asignados por la prueba estadística

Figura 5. Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.



Prueba de Kruskal-Wallis: $H = 19,15$; $p = 0,0006$
 (A) y (B): Rangos asignados por la prueba estadística

Figura 6. Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a cuatro concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.



Prueba de Kruskal-Wallis: $H = 29,39$; $p = 0,00005$
 (A) y (B): Rangos asignados

Figura 7. Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a la combinación de cuatro concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.

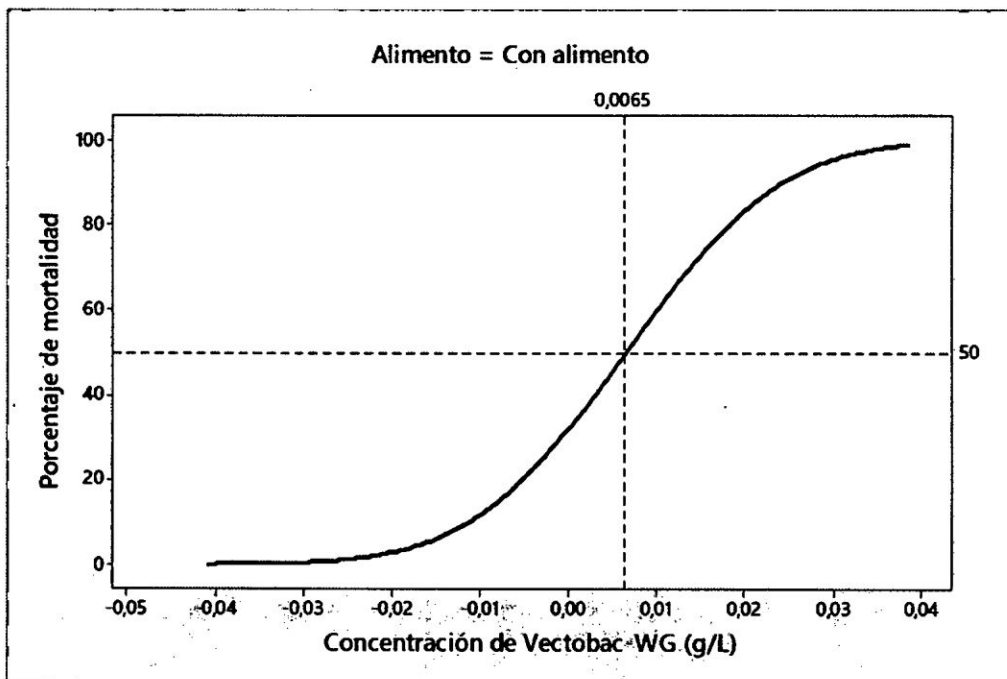


Figura 8. Tendencia del porcentaje de mortalidad estimada y concentración letal media (CL₅₀) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) para larvas de *Culex quinquefasciatus* en un medio con presencia de alimento.

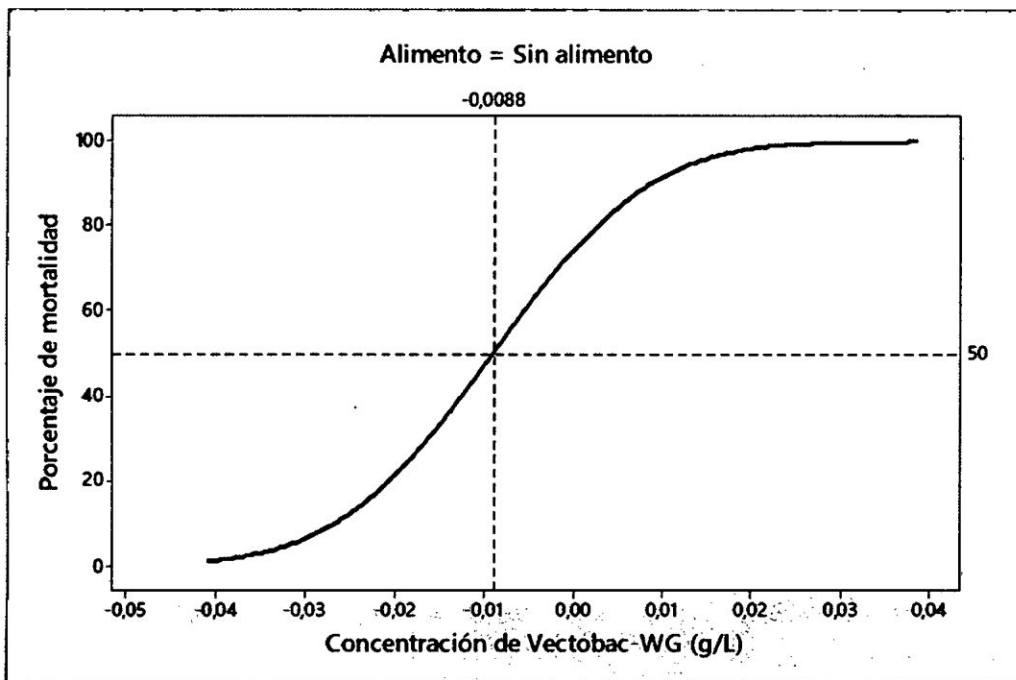


Figura 9. Tendencia del porcentaje de mortalidad estimada y concentración letal media (CL_{50}) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) para larvas de *Culex quinquefasciatus* en un medio sin presencia de alimento.

V. DISCUSIÓN

Las concentraciones probadas estuvieron de acuerdo a lo recomendado en el producto, esperando que la mortalidad que permita el cálculo del CL₅₀ se dé a las 24 horas, sin embargo la mortalidad luego de las dos horas de exposición, en los tratamientos con Vectobac-WG, desde los de menor concentración, fueron del 100%, por lo que los cálculos estadísticos y las interpretaciones respectivas fueron realizados con los datos de mortalidad obtenidos a las dos horas de exposición. En la figura 5, se muestra el promedio del porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente al tratamiento con *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento, a las dos horas de exposición. Se observa que el porcentaje de mortalidad promedio en larvas tratadas con Vectobac-WG sin la incorporación de alimento fue superior con 65,75 % de mortalidad, mientras que las larvas tratadas con Vectobac-WG más alimento la mortalidad promedio fue de 41%. Al realizar la prueba estadística de Kruskal-Wallis (Anexo 2) se halló significancia estadística ($p < 0,05$), lo que se interpreta como que la mortalidad registrada son diferentes en los tipos de tratamiento, siendo el tratamiento sin alimento en el que se registró mayores porcentajes de mortalidad en comparación con el medio en el que si hubo presencia. Estos resultados indican que la presencia de alimento en el medio donde se hallan las larvas, reduce la eficacia del Bti, resultado que concuerda con lo señalado por Delgado Puchi,²¹ quien en pruebas de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), halló que la velocidad de acción de todas las formulaciones, fue mayor en soluciones sin alimento.²¹ De igual manera Corbillón,⁵ concluye que la presencia abundante de alimento también limita la eficacia por un efecto de competencia, ya que es de esperar frente a fuentes de alimentación alternas, estas ingieren las de su

preferencia y de las que habitualmente se alimentan en el medio en el cual se hallan. La mortalidad hallada en los tratamientos sin incorporación de alimento se debe a que las larvas al no tener otro tipo de alimento disponible en su medio, lo ingiere en cantidades suficientes para causarle la muerte, además de que la formulación de Vectobac-WG incluye partículas de almidón y partículas de maíz que encapsula al Bti las mismas que también ejercer un efecto fago estimulante, mejorando el consumo del producto.²² Al no haber presencia de alimento más que el formulado las larvas de *Culex quinquefasciatus* consumen lo que está disponible, tal como lo afirma Ramírez Suero *et al.*,²² quienes llevaron a cabo la evaluación de un formulado de Bti encapsulado en partículas de maltodextrina, almidón y harina de maíz, para ello prepararon extractos de esporas y cristales, posteriormente los trataron con los distintos agentes para luego obtener un producto sólido. Al aplicar los productos en larvas de tercer instar de *Aedes aegypti* encontraron que, en el caso del almidón la actividad aumentaba alrededor de un 8% respecto a la de la toxina libre, y hasta en un 81% para el caso de la encapsulación en harina de maíz. Estos investigadores atribuyen esta mejoría en la actividad a la posibilidad que las harinas, funcionan como agentes fago estimulantes que mejoran el consumo del preparado por parte de la larva y de esta manera mejoran la llegada de la toxina a su sitio de acción. En el tratamiento con suministro de alimento, los porcentajes de mortalidad fue menor, debido a que las larvas dispusieron de un alimento alternativo a lo provisto como el formulado Vectobac-WG, conllevando a que las larvas de *Culex quinquefasciatus* tenían la posibilidad de consumir alimentos sin la toxina, lo señalado nos permite afirmar que alimentos alternativos al formulado de Vectobac-WG en el medio en el cual se hallan las larvas que se quiere controlar, reduce su efectividad, por lo que para aplicaciones en campo se debe controlar dicho factor.

En la figura 6, se muestra el promedio del porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a cuatro concentraciones crecientes de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG), y un blanco a las dos horas de exposición; se aprecia claramente que existe mayor porcentaje de mortalidad en los medios con presencia de Vectobac-WG con respecto al blanco, por otro lado también que los valores son similares en todas las concentraciones donde se halla presente el Vectobac-WG, así para una concentración de 0,00226 g/L presenta un promedio de 71,88%, seguido de las concentraciones de 0,00904 g/L, 0,00452 g/L, 0,00113 g/L y 0,0000 g/L con porcentajes de mortalidad promedio de 67,50%,

66,88%, 60,63% y 0,000% respectivamente. Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis (anexo 3) se halló significancia estadística ($p < 0,05$) es decir existe diferencia estadística en la mortalidad en las diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG), sin embargo es necesario resaltar que dicha diferencia se halla entre el blanco con los medios en el cual estuvo el Vectobac-WG en cuatro concentraciones crecientes, es decir, las mortalidades registradas en las cuatro concentraciones del bioinsecticida fueron iguales. Hecho que nos permite recalcar la eficacia que tiene el para el control de larvas del cuarto instar de *Culex quinquefasciatus*, incluso por lo recomendado en la etiqueta del producto, lo que hace indispensable realizar trabajos de investigación en el que se determine las cantidades mínimas del productos para causar las máximas mortalidades. El uso de este producto de tipo gránulo dispersable en agua el cual contiene esporas y proteínas de *Bacillus thuringiensis* serotipo H – 14, son efectivos frente a larvas de los zancudos ofreciendo múltiples ventajas,¹³ tal como afirma Dominic *et al.*,²³ quién también realizó pruebas para el control *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi*, mostrando que *C. quinquefasciatus* fue relativamente más susceptible en comparación con resto de especies probadas. La toxicidad de Bti. frente a *Culex quinquefasciatus* y las mortalidades larvales al 100% se producen a partir de las 2 primeras horas de realizadas las aplicaciones, probablemente el comportamiento alimentario de las larvas tiene mucho que ver en la eficacia potencial del Bti. Según Ramoska, dicho comportamiento varía entre géneros y aún entre especies, encontrándose que la baja acumulación de toxina observada en *Anopheles* con respecto a larvas de los géneros *Culex* y *Aedes*, quizás se deba a otros factores como selección ingestiva, eficacia del filtrado u otras características del comportamiento alimentario.²⁴ Así mismo, el efecto del contenido de materia orgánica, la composición del sedimento y la turbidez, han sido señalados como factores que reducen la eficacia y persistencia del Bti.²⁵

En la figura 7, se muestra el porcentaje promedio de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* en ocho tratamientos producto de la combinación de cuatro concentraciones de *Bacillus thurgiensis* 0,00113 g/L, 0,00225 g/L, 0,00452 g/L y 0,00904 g/L en medios con y sin alimentos en dos horas de exposición, observándose claramente que los mayores porcentajes de mortalidad fueron registrados en los tratamiento en los que no hay presencia de alimento. Así, los máximos valores de mortalidad registrada fueron en los tratamientos sin alimento

con concentraciones de 0,00452 y de 0,00904 g/L del bioinsecticida, con 92,5 y 93,75%, mientras que por otro lado las máximas mortalidades fueron registradas en los tratamientos en los que no estuvo presente el alimento, por ejemplo se registró una mortalidad de 41,25 en los tratamientos con 0,00904 mg/L y 0,00452 mg/L de bioinsecticida. Por otro lado también se puede apreciar que no se registró mortalidad en los blancos (con y sin presencia de alimento). Al realizar la prueba de Kruscall-Wallis (anexo 4) para comparar las mortalidades de los tratamientos descritos, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), lo que nos quiere decir que por lo menos uno de los tratamientos es diferente, por lo que se procedió a su categorización, del cual resulta que los tratamientos que no incluyen alimento con las máximas concentraciones del bioinsecticida son los muestran los mayores valores de mortalidad, en comparación con resto de tratamientos. Estos resultados concuerda con lo señalado por Aly *et al.*,²⁷ quienes encontraron una reducción en la mortalidad de larvas de *Aedes vexans* y *Anopheles albimanus* tratadas con Bti por efecto de la presencia de alimento.²⁶⁻²⁷ Igualmente, Ramoska y Pacey, obtienen respuestas similares en *Anopheles albimanus* y *Culex quinquefasciatus* Say tratados con *B. sphaericus*.²⁴ Sin embargo, Ignoffo et al, señalan resultados contrarios y concluyen que la presencia de alimento en el medio de las larvas actúa como fagoestimulante, favoreciendo la ingesta del Bti, estos resultados diferentes probablemente sea como consecuencia de que cada especie tiene comportamientos alimentarios diferentes, aspecto que en gran parte determina la eficacia de una formulación.²²⁻²⁸

En la figura 8, se muestra la tendencia del porcentaje de la mortalidad estimada de *Culex quinquefasciatus* y la concentración letal media (CL_{50}) mediante la técnica de Probit para las 2 horas de exposición en un medio con presencia de alimento. Se observa que los porcentajes de mortalidad se incrementan a medida que la concentración del producto también sigue esa tendencia. El CL_{50} Calculado mediante la técnica Probit es de 0,0065 g/L, lo que se interpreta como que dicha concentración en el medio de cultivo de las larvas de *Culex quinquefasciatus*, puede causar la muerte del 50% de ellas a las dos horas de exposición.

En la figura 9, se observa la tendencia del porcentaje de la mortalidad estimada de *Culex quinquefasciatus* y la concentración letal media (CL_{50}) mediante la técnica de Probit para las 2 horas de exposición en un medio sin presencia de alimento, en el cual se puede observar que la mortalidad es mínima a menores

concentraciones para luego hacerse exponencial alcanzando máximos valores a menores concentraciones del bioinsecticida; sin embargo, se aprecia que el valor del CL_{50} tiene un valor negativo de -0,0088 mg/L, es decir que dicha concentración del bioinsecticida en el medio de cultivo teóricamente causaría el 50% de mortalidad, lo que a todas luces dicho valor no es real. Dicho valor negativo es consecuencia de que en los tratamientos en los que no incluyen alimento, se registraron mortalidades por encima del 50% (ver figura 7), lo que hace imposible el cálculo correcto del CL_{50} ya que requieren valores que fluctúen entre 0 a 100% de mortalidad, sin embargo, dicho valor negativo nos estaría indicando que bajo dichas condiciones la concentración que causaría teóricamente la muerte del 50% de la larvas expuestas, es sumamente pequeña, incluso por debajo de lo que menciona las especificaciones técnicas del bioinsecticida. Por otro lado en el anexo 6 se muestran los valores de la concentración letal que podrían causar mortalidades que van del 1 al 99% de mortalidad, calculados mediante la técnica Probit. Al comparar los valores del CL_{50} en los tipos de medios, con y sin presencia de alimento se observa que el valor es numéricamente menor en aquellos donde no estuvo presente un alimento alternativo, esto debido a que, bajo estas condiciones, las larvas consumieron solo el formulado comercial, llegando a niveles que les causaron la mortalidad, mientras que en los medios en el cual estuvo presente el alimento alternativo, las larvas tuvieron la posibilidad de ingerir no solamente el formulado sino el otro tipo de alimento que no contenía *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis*.

VI. CONCLUSIONES

1. El *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* bajo la presentación de Vectobac-WG resultó ser muy efectivo para el control de *Culex quinquefasciatus* habiéndose registrado mortalidades que van desde 41,25% hasta 62,50%, en medios con presencia de alimento y de 58,75 a 93,75% en medios sin presencia de alimento donde las concentraciones del bioinsecticida fueron de 0,00113 g/L hasta 0,00904 g/L.
2. Las mortalidades registradas en medios sin presencia de alimento fueron estadísticamente inferiores ($p < 0.05$) a los medios en los que sí estuvo presente, habiéndose registrado los mayores valores para los tratamientos con mayores concentraciones del Vectobac-WG.
3. La concentración letal media calculada de Vectobac-WG (CL_{50}) en los medios en el cual estuvo presente el alimento para las larvas de *Culex quinquefasciatus* fue de 0,0065 g/L, mientras que en los medios en el cual el alimento no estuvo presente fue de -0.0088.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se deben de llevar a cabo trabajos de campo tomando en cuenta los resultados alcanzados en la presente investigación a fin de establecer la real eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en el control poblacional de larvas de no solo *Culex quinquefasciatus*, sino de otras especies importantes en el campo de la salud como *Aedes aegypti*.
2. Realizar el mismo experimento en donde se pruebe Vectobac-WG, bajo diferentes condiciones, tomando en cuenta por ejemplo las variaciones de temperatura del agua, la intensidad de insolación solar, etc.
3. Realizar estudios en el cual se pueda determinar la permanencia del bioinsecticida, es decir determinar el efecto sobre la mortalidad de larvas de zancudos a lo largo del tiempo, una vez aplicado en los criaderos naturales donde se desarrollan dichas larvas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jozan M, Evans R, McLean R, Hall R, Tangredi B, Reed L, et al. Detection of west Nile virus infection in birds in the United States by blocking ELISA. and immunohistochemistry. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003;(3)110-99
2. T.D.R. Progress Report 1991-92. Geneva:WHO; 1993.
3. Fundación Universidad-Empresa de la región de Murcia.Sistemas de control biológico de las poblaciones de mosquitos en Zonas húmedas.Universidad de Murcia .Editorial Novograf,S:A España .ISBN 84-688-2565-4. [Internet] 2005. [acceso 15 de setiembre de 2014].Disponible en: <http://www.carm.es/cma/dgmn/mntuar/Humenda/publica/mosquito.pdf>
4. Adames Arjona E. Evaluación de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* contra larvas (de mosquitos) del género *Culex*. (Diptera : Culicidae) en lagunas de oxidación. Universidad de Panamá. Vicerrectoría de Investigación y Posgrado, Programa de Maestría en Entomología; [Internet] 2009 [acceso 2 de diciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=77890&indexSearch=ID>
5. Corbillón PCO GR. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Cubana de Medicina Tropical* [Internet] 2012 julio-setiembre [acceso 2 de diciembre de 2013]; 64(3). Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602012000300004&script=sci>
6. Gómez Filho U, Da Costa Silva W. Aplicación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* SH-14 contra *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop* [Internet] 2007 setiembre-diciembre [acceso 13 de diciembre de 2013]; 56(3): Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602012000300004&script=sc>
7. Sulaiman S, Pawanchee ZA, Wahab A, Jamal J, Sohadi AR. Field evaluation of Vectobac G, Vectobac 12AS and Bactimos WP against the dengue vector *Aedes albopictus* in tires. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol*. diciembre de 2007;22(2):122-4.
8. King E, Wong LJG, Padilla CR, Luna H, León de N. Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Uanl; 1996.
9. Nazeer S, Malik K, Munir F. *Bacillus thuringiensis*. LAP Lambert Academic Publishing; 2012.
10. *Bacillus thuringiensis*. Wikipedia, la enciclopedia libre. [Internet] 2013 [citado 4 de diciembre de 2013]. Disponible en: http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Bacillus_thuringiensis&oldid=708140
11. Avilla J. El control biológico de plagas y enfermedades. Universitat Jaume I; 2009.
12. Sansinenea E. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer; 2012.
13. Cruz Pineda CA, Montero Lago G, Navarro Ortega A, Morejón Martín PL. Control de culícidos con el empleo de *Bacillus thuringiensis* SH-14 var. *Israelensis* en criaderos permanentes de la localidad de Fomento, provincia Sancti Spíritus, Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. [Internet] 2005 setiembre-diciembre [acceso 7 de diciembre de 2013]; 57(3). Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602012000300004&script=sc>
14. Mayero. Manual de toxicología básica. Ediciones Díaz de Santos; 2000.
15. Gutiérrez JB, Salsamendi AL de C. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ediciones Díaz de Santos; 2001.
16. Mosquitoes and Their Control. Springer; 2010.

17. Gullan PJ, Cranston PS. The Insects: An Outline of Entomology. John Wiley & Sons; 2010.
18. Triplehorn CA, Johnson NF, Borror DJ. Borror and DeLong's introduction to the study of insects. Belmont, CA: Thompson Brooks/Cole; 2005.
19. Salazar MJ, Moncada LI. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. Biomédica. 1 de diciembre de 2004;24(4):385-92.
20. Vargas MV. El mosquito: un enemigo peligroso : biología, control e importancia en la salud humana (Diptera:Culicidae). Editorial Universidad de Costa Rica; 2009.
21. Delgado Puchi N. Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. Entomotropica. 2005. 20(3): 213-233.
22. Ramírez Suero M, Robles Olvera V, Ramirez Lepe M. Spray dried. *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis Formulations for control of *Aedes aegypti* larvae. Journal of Economic entomology. 2005. 98: 1494-1498.
23. Dominic Amalraj D, Sahu S, Jambulingam S, Boopathi Doss P, Das P, Kalyanasundaram M. Vector Control Research Centre, Indian Council of Medical Research, Pondicherry 605 006, India.2006.63:524-325
24. Ramoska W, Pacey C, Econ J, Ramoska, Van Essen ,Hembree y Perich et al. Food availability and period of exposure as factors of *Bacillus sphaericus* efficacy on mosquito larvae.2003. 72(4):523-525.25.
26. Aly C. Feeding behavior of *Aedes vexans* larvae (Diptera: Culicidae) and its influence on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. Bull Soc. Vector Ecol. [Internet] 2005 diciembre [acceso 13 de enero de 2014]; 8(2). Disponible en:
<http://www.sove.org/SOVE%20folder/journal/sovejournal742000/SOVE%201983,%20VOL%208,%20NO%202.pdf#page=30>
27. Aly C, Mulla M, Xu B, Schnetter W. Rate of ingestion by mosquito larvae (Diptera: Culicidae) as a factor in the effectiveness of a bacterial stomach toxin. J Med Entomol [Internet] 1988 mayo [acceso 15 de enero de 2014]; 25(3). Disponible en:
<http://www.doi.org/10.1093/jmedent/25.3.191>
28. Ignoffo C, García C, Kroha M, Fakuda T, Couch T. Laboratory test to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis for use against mosquitoes. Mosq News [Internet] 1988 mayo [acceso 14 de enero de 2014]; 41(1):. Disponible en:
http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MN_V41_N1_P085093.pdf.
29. Cisneros K. Capacidad predatora de *Notonecta* sp.(Hemíptera:Notonectidae) con relación al consumo de larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Chironomus* sp.(Insecta: Díptera). [tesis para titularse, como Bióloga en la especialidad de Recursos Naturales y Ecología]Peru:Universidad Nacional de San Cristóbal de Humanga;2012.
30. Adán Zapata P, Pablo Manrique S, Eduardo A. Rebollar T, Azul Che M. y Felipe Dzul M. Identificación de larvas de mosquitos (Diptera:Culicidae) de Mérida, Yucatán, México y sus principales criaderos. Rev Biomed. [revista en internet] 2007 Enero-Abril [acceso 13 de abril de 2015] 18(10). Disponible en:
<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb071812.pdf>

ANEXOS

21 04

Anexo 1.

Estadísticos descriptivos del porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* en tratamientos resultado de la combinación de cuatro concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) y medios con y sin presencia de alimento

Alimento	Concentración (g/L)	n	Media	D.E.	Mín	Máx
Con alimento	0	4	0	0	0	0
Con alimento	0,00113	4	62,5	35,24	10	85
Con alimento	0,00226	4	60,00	31,36	20	85
Con alimento	0,00452	4	41,25	20,97	20	70
Con alimento	0,00904	4	41,25	18,43	20	65
Sin alimento	0	4	0	0	0	0
Sin alimento	0,00113	4	58,75	38,38	10	100
Sin alimento	0,00226	4	83,75	12,50	70	100
Sin alimento	0,00452	4	92,50	9,57	80	100
Sin alimento	0,00904	4	93,75	7,50	85	100

Anexo 2.

Prueba de Kruskal-Wallis para el porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* causado por *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento

Variable	ALIMENTO	N	Medias	H	p
Mortalidad a las 2 horas	Con alimento	20	41,00	5,29	0,0205
Mortalidad a las 2 horas	Sin alimento	20	65,75		

Trat.	Ranks	
Con alimento	16,25	A
Sin alimento	24,75	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 3.

Prueba de Kruskal-Wallis para el porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* causado por cuatro concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG).

Variable	Concentración (g/L)	N	Medias	H	p
Mortalidad a las 2 horas	0	8	0	19,15	0,0006
Mortalidad a las 2 horas	0,00113	8	60,63		
Mortalidad a las 2 horas	0,00226	8	71,88		
Mortalidad a las 2 horas	0,00452	8	66,88		
Mortalidad a las 2 horas	0,00904	8	67,50		

Trat.	Ranks	
0	4,50	A
0,00113	22,25	B
0,00452	24,75	B
0,00904	25,31	B
0,00226	25,69	B

Anexo 4.

Prueba de Kruskal-Wallis para el porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* según los tratamientos resultado de la combinación de cuatro concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis (Vectobac-WG) con y sin presencia de alimento.

Variable	Alimento	Concentración (g/L)	N	Medias	H	p
Mortalidad a las 2 horas	Con alimento	0	4	0	29,39	0,0005
Mortalidad a las 2 horas	Con alimento	0,00113	4	62,50		
Mortalidad a las 2 horas	Con alimento	0,00226	4	60,00		
Mortalidad a las 2 horas	Con alimento	0,00452	4	41,25		
Mortalidad a las 2 horas	Con alimento	0,00904	4	41,25		
Mortalidad a las 2 horas	Sin alimento	0	4	0		
Mortalidad a las 2 horas	Sin alimento	0,00113	4	58,75		
Mortalidad a las 2 horas	Sin alimento	0,00226	4	83,75		
Mortalidad a las 2 horas	Sin alimento	0,00452	4	92,50		
Mortalidad a las 2 horas	Sin alimento	0,00904	4	93,75		

Trat.	Ranks			
Sin alimento:0,00000	4,50	A		
Con alimento:0,00000	4,50	A		
Con alimento:0,00452	15,88	A	B	
Con alimento:0,00904	16,00	A	B	
Sin alimento:0,00113	22,25		B	C
Con alimento:0,00113	22,25		B	C
Con alimento:0,00226	22,63		B	C
Sin alimento:0,00226	28,75		B	C
Sin alimento:0,00452	33,63			C
Sin alimento:0,00904	34,63			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 5.

Valores de los porcentajes de mortalidad de *Culex quinquefasciatus* a diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en un medio con presencia de alimento.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	IC fiducial de 95,0%	
			Inferior	Superior
1	-0,0253914	0,0066486	-0,0488600	-0,0163502
2	-0,0216435	0,0058025	-0,0421005	-0,0137432
3	-0,0192656	0,0052672	-0,0378147	-0,0120863
4	-0,0174768	0,0048654	-0,0345926	-0,0108379
5	-0,0160217	0,0045394	-0,0319733	-0,0098208
6	-0,0147833	0,0042627	-0,0297452	-0,0089537
7	-0,0136973	0,0040207	-0,0277929	-0,0081921
8	-0,0127250	0,0038046	-0,0260461	-0,0075090
9	-0,0118408	0,0036087	-0,0244586	-0,0068866
10	-0,0110268	0,0034289	-0,0229985	-0,0063125
20	-0,0049783	0,0021248	-0,0122125	-0,0019825
30	-0,0006169	0,0012856	-0,0046470	0,0013517
40	0,0031097	0,0008800	0,0010783	0,0049398
50	0,0065929	0,0011221	0,0047857	0,0099374
60	0,0100761	0,0017336	0,0075777	0,0158504
70	0,0138028	0,0025041	0,0103131	0,0224284
80	0,0181641	0,0034534	0,0134172	0,0302240
90	0,0242126	0,0048003	0,0176612	0,0410959
91	0,0250266	0,0049829	0,0182297	0,0425617
92	0,0259109	0,0051815	0,0188468	0,0441545
93	0,0268832	0,0054002	0,0195248	0,0459064
94	0,0279691	0,0056446	0,0202814	0,0478636
95	0,0292076	0,0059238	0,0211438	0,0500964
96	0,0306626	0,0062521	0,0221562	0,0527204
97	0,0324515	0,0066562	0,0233999	0,0559472
98	0,0348294	0,0071941	0,0250519	0,0602379
99	0,0385773	0,0080430	0,0276534	0,0670030

Anexo 6.

Valores de los porcentajes de mortalidad de *Culex quinquefasciatus* a diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) en un medio sin presencia de alimento.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	IC fiducial de 95,0%	
			Inferior	Superior
1	-0,0408805	0,0102090	-0,0769548	-0,0270121
2	-0,0371326	0,0093604	-0,0701902	-0,0244101
3	-0,0347547	0,0088225	-0,0658995	-0,0227581
4	-0,0329659	0,0084183	-0,0626725	-0,0215147
5	-0,0315108	0,0080898	-0,0600481	-0,0205027
6	-0,0302723	0,0078103	-0,0578147	-0,0196409
7	-0,0291864	0,0075655	-0,0558569	-0,0188849
8	-0,0282141	0,0073465	-0,0541041	-0,0182077
9	-0,0273299	0,0071474	-0,0525104	-0,0175915
10	-0,0265159	0,0069643	-0,0510436	-0,0170241
20	-0,0204674	0,0056086	-0,0401543	-0,0127974
30	-0,0161060	0,0046398	-0,0323194	-0,0097326
40	-0,0123794	0,0038223	-0,0256457	-0,0070929
50	-0,0088962	0,0030742	-0,0194399	-0,0045937
60	-0,0054130	0,0023564	-0,0132964	-0,0020322
70	-0,0016863	0,0016670	-0,0068915	0,0008762
80	0,0026751	0,0011691	-0,0001297	0,0050142
90	0,0087235	0,0016377	0,0061918	0,0138087
91	0,0095375	0,0017747	0,0068570	0,0151777
92	0,0104218	0,0019327	0,0075592	0,0166855
93	0,0113941	0,0021151	0,0083124	0,0183621
94	0,0124800	0,0023268	0,0091363	0,0202521
95	0,0137185	0,0025761	0,0100594	0,0224242
96	0,0151735	0,0028768	0,0111276	0,0249923
97	0,0169624	0,0032548	0,0124238	0,0281666
98	0,0193403	0,0037669	0,0141271	0,0324060
99	0,0230882	0,0045882	0,0167836	0,0391161

Anexo 7.

Registro fotográfico del proceso de investigación



Foto 1. Instalación de baldes de plástico para la colecta de larvas de *Culex Quinquefaciatus*

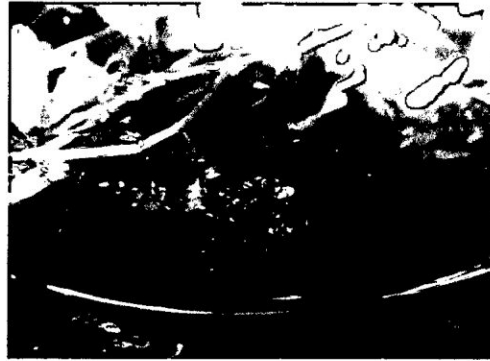


Foto 2. Huevos y larvas de *Culex quinquefasciatus*



Foto 3. Colecta de larvas de *Culex quinquefasciatus*



Foto 4. Colecta de larvas de *Culex quinquefasciatus*

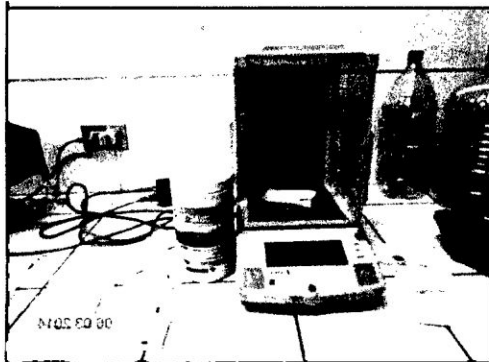


Foto 5. Pesado del producto comercial (vectobac-WG) de las diferentes concentraciones.



Foto 6. Instalación de materiales para pruebas a diferentes concentraciones



Foto 7. Preparación de Vectobac-WG a diferentes concentraciones.



Foto 8. Incorporación del preparado en los envases de prueba.



Foto 9. Medición de la temperatura.



Foto 10. Retirando las larvas muertas después de transcurrida dos horas.

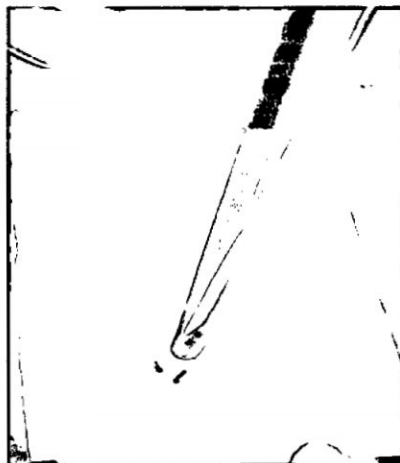


Foto 11. Conteo de larvas muertas

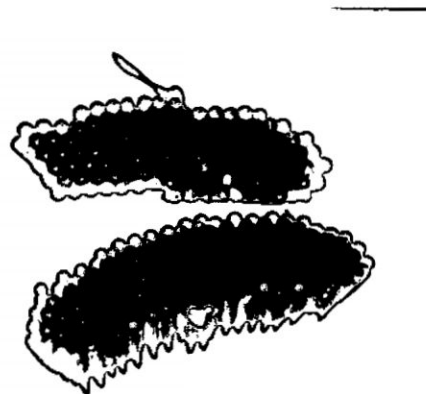


Foto 12. Huevos de *Culex quinquefasciatus*.

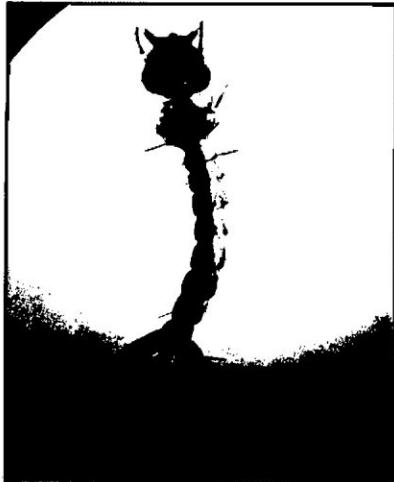
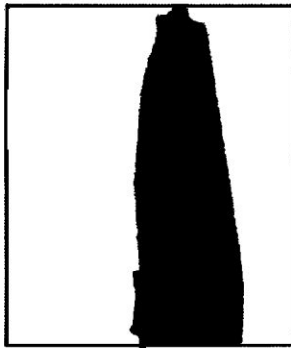


Foto 13. Larva de *Culex quinquefasciatus*.



Foto 14. Estadios larvales de *Culex quinquefasciatus*.



Sifón con cuatro pelos multiramificados



Sifón respiratorio



Pecten

Anexo 8.

Matriz de consistencia

TÍTULO: Efecto toxicológico de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>israelensis</i> (Vectobac-WG) en presencia y ausencia de alimento sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Insecta: Diptera), Ayacucho 2014. AUTOR: DE LA CRUZ QUISPE, EDELMIRA		ASESOR: CARLOS EMILIO CARRASCO BADAJOZ	
PROBLEMA	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>OBJETIVOS</p> <p>Objetivo general Evaluar el efecto toxicológico de cuatro concentraciones crecientes de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>israelensis</i> (Vectobac-WG) y la disponibilidad de alimento, influye en el efecto toxicológico agudo probado en larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de IV estadio?</p> <p>Objetivo específico a. Determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> y sometidos a cuatro Vectobac-WG. b. Comparar el porcentaje de mortalidad de las larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> sometidas a cuatro diferentes concentraciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>israelensis</i> (Vectobac-WG) y en las condiciones de disponibilidad y no disponibilidad de alimento. c. Determinar la concentración letal (CL50) de Vectobac-WG sobre larvas <i>Culex quinquefasciatus</i> bajo las condiciones de disponibilidad y no disponibilidad de alimento.</p>	<p>Evaluar el efecto toxicológico de cuatro concentraciones crecientes de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>israelensis</i> (Vectobac-WG) y la disponibilidad de alimento, en larvas de IV estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p>	<p>Variable independiente a. <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>israelensis</i> (Vectobac-WG) Indicador: Concentración (mg/L) b. Disponibilidad de alimento Indicador: Disponibilidad de alimento (si, no)</p>	<p>MARCO TEÓRICO 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 1.1. Situación taxonómica y clasificación 1.2. Toxinas y mecanismos de acción 2. Larvicia biológico: Vectobac-WG 2.1. Características del larvicia biológico (Vectobac-WG) 3. Toxicidad 4. Orden diptera: familia Culicidae</p>
		<p>INVESTIGACIÓN Básica</p> <p>TIPO DE ESTUDIO Experimental</p> <p>POBLACIÓN Vectobac-WG (Bioinsecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>)</p> <p>MUESTRA 100 g de Vectobac-WG.</p> <p>MUESTREO Aleatorio</p> <p>UNIDAD EXPERIMENTAL Larvas de Simuliidae.</p>	

Efecto toxicológico de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) en presencia y ausencia de alimento sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* (Insecta: Diptera), Ayacucho 2014.

Edelmira De la Cruz Quispe¹; Carlos Carrasco Badajoz¹
Escuela de Formación profesional de Biología¹: UNSCH

RESUMEN

En el control de mosquitos como *Culex quinquefasciatus*, se han utilizado controladores tanto como agentes químicos, como biológicos: depredadores, parasitoides y patógenos. Sin embargo es poco conocido el uso del producto comercial de Vectobac-WG que contiene el formulado de gránulos de *Bacillus thuringiensis*. Con la presente investigación pretendemos contribuir con la información ya que estos mosquitos tienen importancia médica. El objetivo fue evaluar el efecto toxicológico de cuatro concentraciones crecientes de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) bajo tratamiento con y sin presencia de alimento, en larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*, con cuatro repeticiones y un blanco experimental (control). Las larvas de *Culex* fueron colectadas en tres baldes de plástico que actuaron como criaderos de éstos organismos que fueron puestas en un jardín. El efecto toxicológico fue evaluado a las dos horas de aplicado el bioinsecticida, como número de larvas muertas. Se determinó que en pruebas con suministro de alimento la mortalidad de larvas fue de un 41% frente a un 65,7% de mortalidad en medios de tratamiento sin alimento siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$); por otro lado, en el medio de menor concentración que fue de 0,00113 g/L el porcentaje de mortalidad promedio fue de 60,63%; mientras que en el de mayor concentración que fue de 0,00904 g/L la mortalidad alcanzó valores de 67,50%, sin embargo dichos valores son estadísticamente similares entre sí. Los valores de la concentración letal media en condiciones de laboratorio con suministro de alimento fueron de 0,0065 mg/L, mientras que sin presencia de alimento fue -0.0088 mg/L.

Palabras clave: efecto toxicológico, *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG), *Culex quinquefasciatus*.

SUMMARY

In controlling mosquitoes and *Culex quinquefasciatus*, both drivers have been used as chemical agents, and biological: predators, parasites and pathogens. However little is known to use the commercial product of Vectobac-WG formulation containing *Bacillus thuringiensis* granules. With this research we want to contribute information because these mosquitoes have medical importance. The objective was to evaluate the toxicological effects of four increasing concentrations of *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG) under treatment with and without the presence of food in the fourth instar larvae of *Culex quinquefasciatus*, with four replications and experimental white (control). *Culex* larvae were collected in three plastic buckets that served as breeding grounds for these organisms were put in a garden. The toxicological effect was evaluated within two hours of applying the biopesticide, as the number of dead larvae. It was determined that in tests with food supply larval mortality was 41% versus 65,7% mortality in food processing means without being statistically significant difference ($p < 0,05$); on the other hand, in the middle of lower concentration was 0,00113 g/L the average mortality rate was 60,63%; while at higher concentration was 0,00904 g / L the mortality was 67,50% values, however these values are statistically similar. The values of the median lethal concentration under laboratory conditions with food supply were 0,0065 mg/L, whereas without the presence of food was -0.0088 mg/L.

Key words: toxicological effect, *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG), *Culex quinquefasciatus*

INTRODUCCIÓN

De las especies vectores, los culcideos constituyen el grupo más numeroso, siendo responsables de la transmisión de importantes enfermedades al hombre¹ motivo por el cual se han venido empleando productos químicos para su control.

Ante el impacto ecológico provocado sobre la biósfera, la popularidad de los métodos químicos para el control de plagas ha decaído. En su lugar se promueven nuevas soluciones que incluyen el empleo de agentes de control biológico, alternativa que crece rápidamente como estrategia de lucha antivectorial,¹ las estrategias empleadas en el control de larvas de mosquitos como *Culex quinquefasciatus* van desde el uso de agentes químicos hasta los controladores biológicos.² Dentro del control Biológico de insectos de importancia médica, una alternativa es el uso del producto (Vectobac-WG) que es un concentrado de *Bacillus thuringiensis* que es utilizado potencialmente como agente de control en otros países como Panamá y Cuba, ya que son tóxicos para larvas de insectos.

Bacillus thuringiensis var *israelensis* Bti es un entomopatógeno de especificidad para culcideos y simúlidos de importancia médica.³ Son ingeridos por larvas del insecto y al ser tóxicos acaban con la vida de éste, estos microorganismos habitan en el suelo. Por lo señalado, se ha propuesto determinar a qué concentración el producto Vectobac-WG muestra mayor mortalidad con y sin presencia de alimentos.

Por las razones señaladas en el presente trabajo de investigación se ha trazado los siguientes objetivos:

Objetivo General

Evaluar el efecto toxicológico de cuatro concentraciones crecientes de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) con y sin presencia de alimento, en larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*.

Objetivos Específicos

- a. Determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* sometidos a cuatro concentraciones crecientes de Vectobac-WG.
- b. Comparar el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus* sometidas a cuatro diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) en condiciones de disponibilidad o ausencia de alimento.

- c. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de Vectobac-WG sobre larvas *Culex quinquefasciatus* en presencia y ausencia de alimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Producto bioinsecticida en base a *Bacillus thuringiensis* comercializadas en polvo concentrado bajo el nombre de Vectobac-WG

Muestra

Cien mg de del producto comercial Vectobac-WG.

Unidad experimental

Frascos de plástico transparente con capacidad para un litro de agua conteniendo 20 larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Metodología y recolección de datos

Obtención de larvas de *Culex quinquefasciatus*

Para la obtención de larvas del IV instar de *Culex quinquefasciatus* se procedió a la instalación de baldes de plásticos de aproximadamente 20 L en lugares abiertos sin exposición directa a los rayos del sol, a los que se agregó agua hasta la mitad de su capacidad, con la finalidad de generar un ambiente adecuado para la ovoposición de las hembras adultas y la sobrevivencia de las larvas, se agregó un manojito de alfa alfa con la finalidad de incrementar la cantidad de materia orgánica. Se esperó varios días hasta que aparecieran los huevos, las mismas que se presentaron a manera de balsas. Posteriormente se hizo inspecciones minuciosas diarias con la finalidad de determinar el momento en la que se presentan larvas del IV instar que tienen un comportamiento al colgar la cabeza hacia abajo con respecto a la superficie del agua, los cuales fueron establecidos porque presentaban el mayor tamaño. Este hecho determinó la colecta de las larvas con un calcalillo los que fueron colocados en recipientes conteniendo agua fresca las mismas que fueron trasladadas al laboratorio para su empleo en pruebas de toxicidad.

Identificación de *Culex quinquefasciatus*

Las larvas colectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Ecología Biodiversidad y Sistemas de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas, para su posterior identificación, tomando una serie de características morfológicas, como el sifón

respiratorio largo, el cual presenta 4 pelos 1-S multiramificados, además también se observan dientes del pecten ocupando menos del 0,75 de la base del sifón, para el cual se empleó las claves taxonómicas según Zapata *et al.*,⁴

Prueba de laboratorio

Las larvas destinadas para el experimento fueron seleccionadas considerando los de mayor tamaño (IV estadio con un promedio: 1.0 a 1.2 cm de tamaño),⁴ los que fueron mantenidas en un recipiente (acuario) por un tiempo mínimo de 24 horas antes de la prueba de toxicidad.

Las larvas fueron instaladas en recipientes de plástico (unidades de experimentación) conteniendo aproximadamente un litro de agua de clorada en el que se colocó 20 larvas de *Culex quinquefasciatus*. Dichas unidades de crianza fueron distribuidas en cuatro grupos, correspondiendo cada uno a diferentes concentraciones del bioinsecticida con cuatro repeticiones cada grupo, más un recipiente sin el bioinsecticida (blanco).

Se consideró dos grupos similares en los que a un grupo se le suministro alimento balanceado diariamente para peces de acuario; así mismo las unidades de experimento fueron de cuatro repeticiones.

Las soluciones de Vectobac-WG fueron preparados en las concentraciones señaladas, una a dos horas antes de iniciar el bioensayo, porque se consideró la concentración de la proteína cristalizada y las esporas, ya que la formulación del producto dice contener excipientes.

Una vez colocadas las larvas de los dípteros en los recipientes conteniendo las concentraciones respectivas del bioinsecticida, a las dos horas se realizó inspecciones minuciosas con la finalidad de determinar el número de larvas muertas en cada recipiente, con la ayuda de una pipeta se retiró las larvas inmóviles (muertas), de las unidades experimentales.

Tipo de investigación

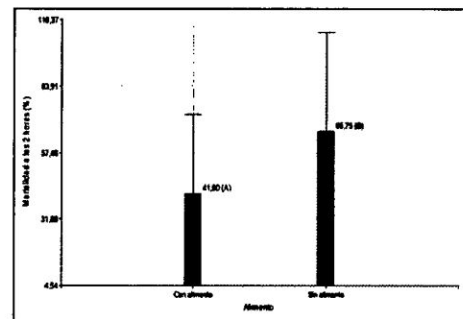
El tipo de investigación realizado fue básica-experimental.

Análisis estadístico

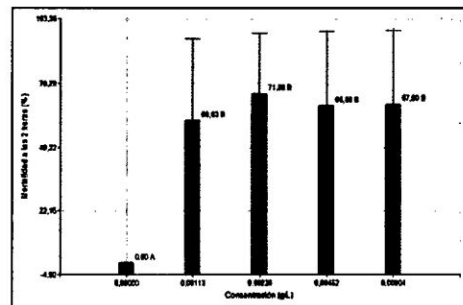
Los datos obtenidos fueron presentados en tablas y figuras quienes mostraron estadísticos de tendencia central y de dispersión. Con la finalidad de comparar las mortalidades registradas en las cuatro

concentraciones del bioinsecticida con y sin presencia de alimento, se empleó el análisis de varianza no paramétrica donde se analizó el efecto de la concentración del Bti y de la presencia de alimento, debido a que los datos no presentaron una distribución normal, así mismo se trabajó con una confiabilidad del 95% ($\alpha = 0.05$). Para la estimación de la Concentración Letal Media, se empleó la metodología de Probit. En todos los casos, se empleó el software SPSS 22 y MINITAB 15 para realizar los análisis estadísticos.

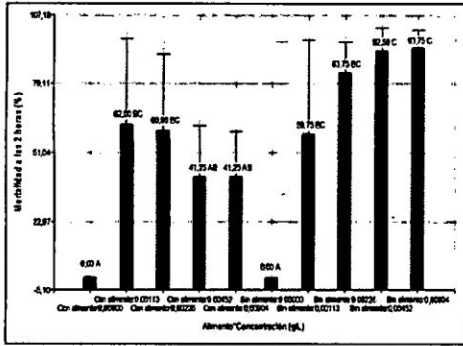
RESULTADOS



Prueba de Kruskal-Wallis: $H = 5,29$; $p = 0,0205$
(A) y (B): Rangos asignados por la prueba estadística
Figura 1. Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.



Prueba de Kruskal-Wallis: $H = 19,15$; $p = 0,0006$
(A) y (B): Rangos asignados por la prueba estadística
Figura 2. Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a cuatro concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.



Prueba de Kruskal-Wallis: $H = 29,39$; $p = 0,00005$
(A) y (B): Rangos asignados

Figura 3. Porcentaje de mortalidad (media + desviación estándar) de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a la combinación de cuatro concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento.

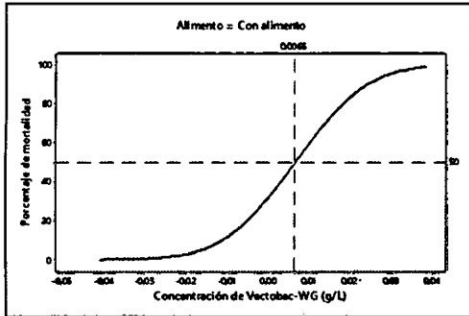


Figura 4. Tendencia del porcentaje de mortalidad estimada y concentración letal media (CL_{50}) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) para larvas de *Culex quinquefasciatus* en un medio con presencia de alimento.

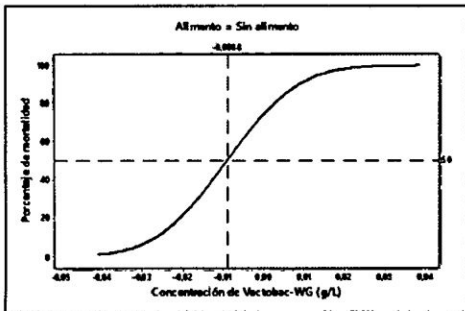


Figura 5. Tendencia del porcentaje de mortalidad estimada y concentración letal media (CL_{50}) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) para larvas de *Culex quinquefasciatus* en un medio sin presencia de alimento.

DISCUSIÓN

Las concentraciones probadas estuvieron de acuerdo a lo recomendado en el producto, esperando que la mortalidad que permita el cálculo del CL_{50} se dé a las 24 horas, sin embargo la mortalidad luego de las dos horas de exposición, en los tratamientos con Vectobac-WG, desde los de menor concentración, fueron del 100%, por lo que los cálculos estadísticos y las interpretaciones respectivas fueron realizados con los datos de mortalidad obtenidos a las dos horas de exposición.

En la figura 1, se muestra el promedio del porcentaje de mortalidad acumulada de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente al tratamiento con *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Vectobac-WG) en medios con y sin presencia de alimento, a las dos horas de exposición. Se observa que el porcentaje de mortalidad promedio en larvas tratadas con Vectobac-WG sin la incorporación de alimento fue superior con 65,75 % de mortalidad, mientras que las larvas tratadas con Vectobac-WG más alimento la mortalidad promedio fue de 41%. Al realizar la prueba estadística de Kruskal-Wallis se halló significancia estadística ($p < 0,05$), lo que se interpreta como que la mortalidad registrada son diferentes en los tipos de tratamiento, siendo el tratamiento sin alimento en el que se registró mayores porcentajes de mortalidad en comparación con el medio en el que si hubo presencia. Estos resultados indican que la presencia de alimento en el medio donde se hallan las larvas, reduce la eficacia del Bti, resultado que concuerda con lo señalado por Delgado,⁵ quien en pruebas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), halló que la velocidad de acción de todas las formulaciones, fue mayor en soluciones sin alimento. De igual manera Corbillón,⁶ concluye que la presencia abundante de alimento también limita la eficacia por un efecto de competencia, ya que es de esperar frente a fuentes de alimentación alternas, estas ingieren las de su preferencia y de las que habitualmente se alimentan en el medio en el cual se hallan. La mortalidad hallada en los tratamientos sin incorporación de alimento se debe a que las larvas al no tener otro tipo de alimento disponible en su medio, lo ingiere en cantidades suficientes para causarle la muerte, además de que la formulación de Vectobac-WG incluye

partículas de almidón y partículas de maíz que encapsula al Bti las mismas que también ejercer un efecto fago estimulante, mejorando el consumo del producto.⁷ Al no haber presencia de alimento más que el formulado las larvas de *Culex quinquefasciatus* consumen lo que está disponible, tal como lo afirma Ramírez Suero *et al.*,⁷ quienes llevaron a cabo la evaluación de un formulado de Bti encapsulado en partículas de maltodextrina, almidón y harina de maíz, para ello prepararon extractos de esporas y cristales, posteriormente los trataron con los distintos agentes para luego obtener un producto sólido. Al aplicar los productos en larvas de tercer instar de *Aedes aegypti* encontraron que, en el caso del almidón la actividad aumentaba alrededor de un 8% respecto a la de la toxina libre, y hasta en un 81% para el caso de la encapsulación en harina de maíz. Estos investigadores atribuyen esta mejoría en la actividad a la posibilidad que las harinas, funcionan como agentes fago estimulantes que mejoran el consumo del preparado por parte de la larva y de esta manera mejoran la llegada de la toxina a su sitio de acción. En el tratamiento con suministro de alimento, los porcentajes de mortalidad fue menor, debido a que las larvas dispusieron de un alimento alternativo a lo provisto como el formulado Vectobac-WG, conllevando a que las larvas de *Culex quinquefasciatus* tenían la posibilidad de consumir alimentos sin la toxina, lo señalado nos permite afirmar que alimentos alternativos al formulado de Vectobac-WG en el medio en el cual se hallan las larvas que se quiere controlar, reduce su efectividad, por lo que para aplicaciones en campo se debe controlar dicho factor.

En la figura 2, se muestra el promedio del porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* frente a cuatro concentraciones crecientes de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG), y un blanco a las dos horas de exposición; se aprecia claramente que existe mayor porcentaje de mortalidad en los medios con presencia de Vectobac-WG con respecto al blanco, por otro lado también que los valores son similares en todas las concentraciones donde se halla presente el Vectobac-WG, así para una concentración de 0,00226 g/L presenta un promedio de 71,88%, seguido de las concentraciones de 0,00904 g/L, 0,00452 g/L, 0,00113 g/L y 0,0000 g/L con porcentajes de mortalidad

promedio de 67,50%, 66,88%, 60,63% y 0,000% respectivamente. Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis se halló significancia estadística ($p < 0,05$) es decir existe diferencia estadística en la mortalidad en las diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (Vectobac-WG), sin embargo es necesario resaltar que dicha diferencia se halla entre el blanco con los medios en el cual estuvo el Vectobac-WG en cuatro concentraciones crecientes, es decir, las mortalidades registradas en las cuatro concentraciones del bioinsecticida fueron iguales. Hecho que nos permite recalcar la eficacia que tiene el para el control de larvas del cuarto instar de *Culex quinquefasciatus*, incluso por lo recomendado en la etiqueta del producto, lo que hace indispensable realizar trabajos de investigación en el que se determine las cantidades mínimas del productos para causar las máximas mortalidades. El uso de este producto de tipo gránulo dispersable en agua el cual contiene esporas y proteínas de *Bacillus thuringiensis* serotipo H - 14, son efectivos frente a larvas de los zancudos ofreciendo múltiples ventajas,⁸ tal como afirma Dominic *et al.*,⁹ quién también realizó pruebas para el control *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi*, mostrando que *C. quinquefasciatus* fue relativamente más susceptible en comparación con resto de especies probadas. La toxicidad de Bti. frente a *Culex quinquefasciatus* y las mortalidades larvales al 100% se producen a partir de las 2 primeras horas de realizadas las aplicaciones, probablemente el comportamiento alimentario de las larvas tiene mucho que ver en la eficacia potencial del Bti. Según Ramoska,¹⁰ dicho comportamiento varía entre géneros y aún entre especies, encontrándose que la baja acumulación de toxina observada en *Anopheles* con respecto a larvas de los géneros *Culex* y *Aedes*, quizás se deba a otros factores como selección ingestiva, eficacia del filtrado u otras características del comportamiento alimentario.¹⁰ Así mismo, el efecto del contenido de materia orgánica, la composición del sedimento y la turbidez, han sido señalados como factores que reducen la eficacia y persistencia del Bti.¹¹

En la figura 3, se muestra el porcentaje promedio de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* en ocho tratamientos producto de la combinación de cuatro

concentraciones de *Bacillus thuringiensis* 0,00113 g/L, 0,00225 g/L, 0,00452 g/L y 0,00904 g/L en medios con y sin alimentos en dos horas de exposición, observándose claramente que los mayores porcentajes de mortalidad fueron registrados en los tratamientos en los que no hay presencia de alimento. Así, los máximos valores de mortalidad registrada fueron en los tratamientos sin alimento con concentraciones de 0,00452 y de 0,00904 g/L del bioinsecticida, con 92,5 y 93,75%, mientras que por otro lado las máximas mortalidades fueron registradas en los tratamientos en los que no estuvo presente el alimento, por ejemplo se registró una mortalidad de 41,25 en los tratamientos con 0,00904 mg/L y 0,00452 mg/L de bioinsecticida. Por otro lado también se puede apreciar que no se registró mortalidad en los blancos (con y sin presencia de alimento). Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las mortalidades de los tratamientos descritos, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), lo que nos quiere decir que por lo menos uno de los tratamientos es diferente, por lo que se procedió a su categorización, del cual resulta que los tratamientos que no incluyen alimento con las máximas concentraciones del bioinsecticida son los que muestran los mayores valores de mortalidad, en comparación con resto de tratamientos. Estos resultados concuerdan con lo señalado por Aly *et al.*,¹² quienes encontraron una reducción en la mortalidad de larvas de *Aedes vexans* y *Anopheles albimanus* tratadas con Bti por efecto de la presencia de alimento.^{11,12} Igualmente, Ramoska *et al.*,¹⁰ obtienen respuestas similares en *Anopheles albimanus* y *Culex quinquefasciatus* Hay tratados con *B. sphaericus*.¹⁰ Sin embargo, Ignoffo *et al.*, señalan resultados contrarios y concluyen que la presencia de alimento en el medio de las larvas actúa como fagoestimulante, favoreciendo la ingesta del Bti, estos resultados diferentes probablemente sea como consecuencia de que cada especie tiene comportamientos alimentarios diferentes, aspecto que en gran parte determina la eficacia de una formulación.^{7,13}

En la figura 4, se muestra la tendencia del porcentaje de la mortalidad estimada de *Culex quinquefasciatus* y la concentración letal media (CL_{50}) mediante la técnica de Probit para las 2 horas de exposición en un medio con presencia de alimento. Se observa

que los porcentajes de mortalidad se incrementan a medida que la concentración del producto también sigue esa tendencia. El CL_{50} Calculado mediante la técnica Probit es de 0,0065 g/L, lo que se interpreta como que dicha concentración en el medio de cultivo de las larvas de *Culex quinquefasciatus*, puede causar la muerte del 50% de ellas a las dos horas de exposición.

En la figura 5, se observa la tendencia del porcentaje de la mortalidad estimada de *Culex quinquefasciatus* y la concentración letal media (CL_{50}) mediante la técnica de Probit para las 2 horas de exposición en un medio sin presencia de alimento, en el cual se puede observar que la mortalidad es mínima a menores concentraciones para luego hacerse exponencial alcanzando máximos valores a menores concentraciones del bioinsecticida; sin embargo, se aprecia que el valor del CL_{50} tiene un valor negativo de -0,0088 mg/L, es decir que dicha concentración del bioinsecticida en el medio de cultivo teóricamente causaría el 50% de mortalidad, lo que a todas luces dicho valor no es real. Dicho valor negativo es consecuencia de que en los tratamientos en los que no incluyen alimento, se registraron mortalidades por encima del 50%, lo que hace imposible el cálculo correcto del CL_{50} ya que requieren valores que fluctúen entre 0 a 100% de mortalidad, sin embargo, dicho valor negativo nos estaría indicando que bajo dichas condiciones la concentración que causaría teóricamente la muerte del 50% de la larvas expuestas, es sumamente pequeña, incluso por debajo de lo que menciona las especificaciones técnicas del bioinsecticida. Al comparar los valores del CL_{50} en los tipos de medios, con y sin presencia de alimento se observa que el valor es numéricamente menor en aquellos donde no estuvo presente un alimento alternativo, esto debido a que, bajo estas condiciones, las larvas consumieron solo el formulado comercial, llegando a niveles que les causaron la mortalidad, mientras que en los medios en el cual estuvo presente el alimento alternativo, las larvas tuvieron la posibilidad de ingerir no solamente el formulado sino el otro tipo de alimento que no contenía *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. T.D.R. Progress Report 1991-92. Geneva:WHO; 1993.
2. Fundación Universidad-Empresa de la región de Murcia.Sistemas de control biológico de las poblaciones de mosquitos en Zonas húmedas.Universidad de Murcia .Editorial Novograf,S:A España .ISBN 84-688-2565-4. [Internet] 2005. [acceso 15 de setiembre de 2014].Disponible en: <http://www.carm.es/cma/dgmn/mntuar/Humendal/publica/mosquito.pdf>
3. Adames Arjona E. Evaluación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas (de mosquitos) del género *Culex*. (Diptera: Culicidae) en lagunas de oxidación. Universidad de Panamá. Vicerrectoría de Investigación y Posgrado, Programa de Maestría en Entomología; [Internet] 2009 [acceso 2 de diciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.bases.bireme.br/cgi-bin/wxis/ind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=77890&indexSearch=ID>
4. Adán Zapata P, Pablo Manrique S, Eduardo A. Rebollar T, Azul Che M. y Felipe Dzul M. Identificación de larvas de mosquitos (Diptera:Culicidae) de Mérida, Yucatán, México y sus principales criaderos. Rev Biomed. [revista en internet] 2007 Enero-Abril [acceso 13 de abril de 2015] 18(10). Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb071812.pdf>.
5. Delgado Puchi N. Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. Entomotropica. 2005. 20(3): 213-233.
6. Corbillón PCO GR. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Cubana de Medicina Tropical [Internet] 2012 julio-setiembre [acceso 2 de diciembre de 2013]; 64(3). Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602012000300004&script=sci>
7. Ramírez Suero M, Robles Olvera V, Ramírez Lepe M. Spray dried. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* Formulations for control of *Aedes aegypti* larvae. Journal of Economic entomology. 2005. 98: 1494-1498.
8. Cruz Pineda CA, Montero Lago G, Navarro Ortega A, Morejón Martín PL. Control de culicidos con el empleo de *Bacillus thuringiensis* SH-14 var. *israelensis* en criaderos permanentes de la localidad de Fomento, provincia Sancti Spiritus, Cuba. Rev Cubana Med Trop. [Internet] 2005 setiembre-diciembre [acceso 7 de diciembre de 2013]; 57(3). Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602012000300004&script=sci>
9. Dominic Amalraj D, Sahu S, Jambulingam S, Boopathi Doss P, Das P, Kalyanasundaram M. Vector Control Research Centre, Indian Council of Medical Research, Pondicherry 605 006, India.2006.63:524-325.
10. Ramoska W, Pacey C, Econ J, Ramoska, Van Essen ,Hembree y Perich et al. Food availability and period of exposure as factors of *Bacillus sphaericus* efficacy on mosquito larvae.2003. 72(4): 523-525.25.
11. Aly C. Feeding behavior of *Aedes vexans* larvae (Diptera: Culicidae) and its influence on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Bull Soc. Vector Ecol. [Internet] 2005 diciembre [acceso 13 de enero de 2014]; 8(2). Disponible en: <http://www.sove.org/SOVE%20folder/journal/sovejournal742000/SOVE%201983,%20VOL%208,%20NO%202.pdf#page=30>.
12. Aly C, Mulla M, Xu B, Schnetter W. Rate of ingestion by mosquito larvae (Diptera: Culicidae) as a factor in the effectiveness of a bacterial stomach toxin. J Med Entomol [Internet] 1988 mayo [acceso 15 de enero de 2014]; 25(3). Disponible en: <http://www.doi.org/10.1093/jmedent/25.3.191>
13. Ignoffo C, García C, Kroha M, Fakuda T, Couch T. Laboratory test to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. Mosq News [Internet] 1988 mayo [acceso 14 de enero de 2014]; 41(1): Disponible en: http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MN_V41_N1_P085093.pdf.

