

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Mortalidad generada por un preparado comercial de
Bacillus thuringiensis H-14 var. *Israelensis* sobre larvas de
Culex quinquefasciatus Say 1823 y *Chironomus calligraphus*
Goeldi 1905. (Insecta: Diptera), Ayacucho 2015.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE ECOLOGÍA Y
RECURSOS NATURALES

Presentado por la:
Bach. CARRASCO AYALA, Yoselyn

AYACUCHO – PERÚ
2018

A mis padres y a todas las personas
que hicieron posible la culminación
de mi carrera profesional

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por acogerme y brindarme sus aulas para mi formación profesional

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por forjar en mi la maravillosa carrera profesional de Biología en el campo de la Ecología.

A los docentes de la Escuela Profesional de Biología, en especial de los de la Especialidad de Ecología y Recursos Naturales, por contribuir en mi formación profesional, con su sapiencia y sobre todo por su capacidad de transmitirla, que no solo aportaron conocimientos, sino que también me enseñaron acerca de la vida real.

Al Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica, por haberme brindado las facilidades para la realización de las pruebas experimentales.

A mi asesor, Dr. Carlos Emilio Carrasco Badajoz por su orientación académica y contribución, que han permitido la elaboración y finalización del presente trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que con su invaluable apoyo contribuyeron en la materialización de la presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
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	8
2.2.1. Toxicología	8
2.2.2. Efecto toxicológico agudo	8
2.2.3. Porcentaje de mortalidad	8
2.2.4. Concentración Letal Media (CL50)	8
2.2.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>Israelensis</i>	8
2.2.6. <i>Culex quinquefasciatus</i> Say	8
2.2.7. Vectobac WG	8
2.3. Bases teóricas	8
2.3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
2.3.2. Larvicida biológico: Vectobac WG	12
2.3.3. Toxicidad	13
2.3.4. Dosis letal media (DL50) y concentración letal media (CL50)	14
2.3.5. Orden Diptera: familia Culicidae	14
2.3.6. Familia Chironomidae	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Ubicación de la zona de estudio	19
3.2. Población y muestra	19
3.2.1. Población	19
3.2.2. Muestra	19
3.2.3. Unidad experimental	19
3.2.4. Muestreo	19
3.3. Metodología y recolección de datos	20

3.3.1. Obtención de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i>	20
3.3.2. Prueba de laboratorio	21
3.4. Tipo de investigación	22
3.5. Análisis estadístico	22
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	35
V. CONCLUSIONES	43
VI. RECOMENDACIONES	45
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Modelo de la etiqueta donde se recomienda los usos y dosis recomendado para el uso de Vectobac WG para el control de plagas	13
Tabla 2. Tratamientos (número de larvas y concentración de Vectobac WG) considerados en la prueba de toxicidad	21
Tabla 3. Mortalidad acumulada promedio de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 y 48 horas de exposición.	27
Tabla 4. Valores de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) y sus intervalos de confianza a para Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi a las 24 y 48 horas de exposición	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mortalidad acumulada promedio y desviación estándar de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi, sometidos a Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>)	28
Figura 2. Mortalidad acumulada promedio y desviación estándar de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 y 48 horas de exposición.	29
Figura 3. Mortalidad acumulada promedio y desviación estándar de larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi, sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 y 48 horas de exposición.	30
Figura 4. Tendencia de la mortalidad acumulada y la concentración letal media calculada mediante Probit de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say sometidos causada por Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 y 48 horas de exposición	31
Figura 5. Tendencia de la mortalidad acumulada y la concentración letal media calculada mediante Probit de larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi causada por Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 y 48 horas de exposición.	32

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilks para la mortalidad acumulada de larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 y 48 horas de exposición.	51
Anexo 2. Resultados de la prueba de Mann-Whitney para las mortalidades acumuladas de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldisometidos a Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 y 48 horas de exposición	52
Anexo 3. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say sometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 horas de exposición.	53
Anexo 4. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say sometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 48 horas de exposición	54
Anexo 5. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldisometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 24 horas de exposición.	55
Anexo 6. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldisometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) a las 48 horas de exposición.	56
Anexo 7. Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) sobre larvas de	57

	<i>Culex quinquefasciatus</i> Say a las 24 horas de exposición	
Anexo 8.	Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say a las 48 horas de exposición	58
Anexo 9.	Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) sobre larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi las 24 horas de exposición.	59
Anexo 10.	Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) sobre larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi las 48 horas de exposición.	60
Anexo 11.	Fotografías del proceso experimental	61
Anexo 12.	Ficha técnica de seguridad y toxicidad de Vectobac WG	63
Anexo 13.	Matriz de consistencia	65

RESUMEN

Muchas especies de dípteros pueden actuar como vectores de enfermedades a partir de efectuar picaduras a personas o animales, es por ello que el hombre se ha preocupado en controlar sus poblaciones, empleado diferentes estrategias, como el uso de plaguicidas químicos, pero lamentablemente dichos productos han causado efectos indeseables en el medio donde son aplicados. Por lo mencionado en estos últimos años se ha introducido los denominados biopesticidas, preparados en base a microorganismos o compuestos orgánicos (bacterias, virus o metabolitos como proteínas tóxicas, etc), que de acuerdo a los fabricantes, solo actúan sobre las poblaciones objeto de control; sin embargo, son pocos los estudios realizados con la finalidad de comprobar dicha afirmación. Es por ello que el presente trabajo de investigación se desarrolló teniendo los siguientes objetivos específicos, determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*), así como cuantificar la concentración letal media (CL₅₀) de Vectobac WG sobre ambas especies, para lo cual se diseñó un experimento con dos variables independientes, especies con dos niveles y concentraciones de Vectobac-WG con cuatro niveles, haciendo un total de ocho tratamientos, los que tuvieron cuatro repeticiones; así mismo se consideró dos blancos (recipientes solo conteniendo agua y larvas de las dos especie) con dos repeticiones, estableciéndose un total de 36 unidades experimentales (recipiente de plástico conteniendo un litro de agua potable declorada y 20 larvas (del IV estadio de *Culex quinquefasciatus* Say o *Chironomus calligraphus* Goeldi, según sea el caso y la concentración respectiva de Vectobac WG). Las determinaciones de la mortalidad generadas en cada recipiente fueron realizadas a las 24 y 48 horas de iniciado el experimento. De los resultados, se determinó que las mortalidades generadas por Vectobac-WG sobre larvas de IV instar de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi, fueron estadísticamente similares ($p>0,05$) alcanzando promedios máximos de 64,7% y de 53,4% respectivamente, a las 48 horas de exposición; por otro lado también se determinó que dichas mortalidades estuvieron directamente relacionadas a las concentraciones probadas, donde la concentración de 0,250 mg/L causó mayor mortalidad en comparación con las concentraciones menores, tanto en *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi, obteniéndose promedios de 98,8% y de 87,5% respectivamente a las 48 horas de exposición. Con respecto a los valores de la concentración letal media (CL₅₀), éstas fueron numéricamente menores para *Culex quinquefasciatus* Say con promedios de 0,1175 y de 0,0721 mg/L en comparación lo hallado para *Chironomus calligraphus* Goeldi que presentó valores promedios de 0,1414 y de 0,1052 mg/L.

Palabras claves: Vectobac-WG, *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*.

I. INTRODUCCIÓN

Ciertos grupos de dípteros, bajo ciertas condiciones ambientales, como temperatura altas, lluvias frecuentes y elevada humedad en el ambiente proliferan en grandes cantidades, tal es el caso de especies que pertenecen a la familia Culicidae, que en su gran mayoría son insectos hematófagos, los que buscan alimentarse de la sangre ya sea humano o de animales, proceso en el cual ocasiona molestias y en el peor de los casos actúan como vector de muchas enfermedades. Por otro lado, con el uso de productos químicos para el control de poblaciones, necesariamente son introducidos en los espacios físicos donde se desarrollan otras especies, con la probabilidad de afectar otras poblaciones. Frente a dicha realidad, se pretende determinar el efecto del Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis*) un preparado comercial sobre larva de *Culex quinquefasciatus* Say y de *Chironomus calligraphus* Goeldi, esto con la finalidad de determinar la posibilidad de su uso, en plantas de tratamiento de aguas residuales. Como se sabe, dichas unidades de tratamiento de agua, son medios excelentes para la cría de “zancudos” o “mosquitos” perteneciente a la familia Culicidae, los que tienen la capacidad de transmitir enfermedades. Además, de determinar también su efecto sobre taxones pertenecientes a la familia Chironomidae, que como principales componentes de la fauna entomológica en dichas plantas, son importantes en la estructura de las lagunas facultativas y de maduración, ya que procesan la materia orgánica presente en ellas. La aplicación de insecticidas y productos químicos similares, eliminan prácticamente a todo el componente insectil y otros organismos del lugar donde son aplicados, debido a que no son selectivos, introduciendo grandes cambios en la comunidad de dichos ecosistemas. Con el empleo de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis*), muchas veces se centra en el control de la población objetivo, no tomándose en cuenta el efecto que podría causar en otros organismos que acompañan a la especie a

controlar, por lo que es importante que los efectos negativos sean mínimos de modo que el resto de componentes no sufra cambios.

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica de la especialidad de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas, durante los meses de octubre a diciembre del 2015. Teniendo en cuenta lo antes señalado y dada la escasa información al respecto, se realizó el presente trabajo de investigación teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la mortalidad generada por un preparado comercial de *Bacillus thuringiensis* var *Israelensis* en cuatro concentraciones crecientes sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi.

Objetivo específico

1. Determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*)
2. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de Vectobac WG sobre *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeld.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Con la finalidad de corroborar la identificación realizada a la especie empleada como modelo biológico como *Chironomus calligraphus Goeldi*, se puede mencionar como antecedente a una investigación llevado a cabo en el Laboratorio de Ecología y Control Ambiental de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la que se probó el efecto toxicológico de tres metales pesados (cadmio, mercurio y plomo), empleándose larvas de dicha especie colectadas de las lagunas facultativas de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”¹, lugar de donde también se colectó para la presente investigación.

En un estudio donde se evaluó los efectos derivados de la exposición a la cepa 344 del *Bacillus thuringiensis* (Bt) en algunos organismos de diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria acuática. Los organismos de prueba estuvieron expuestos a concentraciones correspondientes a más de 1 000 veces la tasa de aplicación efectiva para controlar el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*). El Bt 344 no alteró los patrones de crecimiento de las algas *Pseudokirchneriella subcapitata*. Una tasa de mortalidad significativa equivalente a 8,9%, pero menor que el límite aceptable para el control (10%), se registró para el pez *Hyphessobrycon scholzei*. Sin embargo, la exposición al agente biológico disminuyó la supervivencia de *Daphnia similis* en 44,8%, en comparación con el control, en base a lo que reportan sugieren la existencia de un riesgo para algunas especies acuáticas de invertebrados.²

Se menciona que es necesario el desarrollo de alguna alternativa para combatir las larvas que dan paso a la proliferación del zancudo *Aedes aegypti* que es el vector de la principal enfermedad que afecta a la población hondureña, mediante técnicas que estén al alcance de la población se puede llegar a la eliminación de este estadio del zancudo, siendo una de estas, la elaboración de una

formulación sólida a base de *Bacillus thuringiensis* que permita alcanzar la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*. Esta bacteria produce unas proteínas denominadas Cry y Cyt o delta-endotoxinas, que son altamente tóxicas para matar las larvas del mosquito *Aedes aegypti*. Estas proteínas no contaminan el ambiente ya que son biodegradables y no dañan ningún organismo. Para conocer la eficiencia de esta formulación, se evaluó: tiempo letal medio y tasa de mortalidad de larvas. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que la formulación a base de *Bacillus thuringiensis* tiene un efecto larvicida, con un tiempo letal medio de 72 horas, habiendo una tasa de mortalidad de un 57% de larvas de *Aedes aegypti*.³

Con el objetivo de evaluar la efectividad y residualidad del uso de los biolarvicidas sobre las poblaciones larvales de *Anopheles* sp. en Angola, todos los sitios de cría seleccionados en el municipio de Luanda se trataron con *B. thuringiensis* y *B. sphaericus*, y se monitorearon a los 7, 15, 21 y 30 días postratamiento en busca de presencia de larvas de mosquitos. Las aplicaciones se repitieron mensualmente durante 5 meses (agosto-diciembre, 2014). Se halló que el porcentaje de sitios de cría con larvas 21 días después de la aplicación varió entre el 39,2 % y el 43 % durante los meses que duró la investigación, con un incremento entre el 50,4 % y el 78,1 % a los 30 días. La efectividad de los tratamientos a las 24 y 48 h después de la aplicación osciló entre el 98 % y el 100 %. *Anopheles* sp. se encontró en 136 sitios de cría en todos los meses monitoreados, clasificados en 13 tipos diferentes, principalmente en casas y patios inundados y zanjas de desagües. La residualidad en los sitios de cría como promedio fue de 20,2 días.⁴

Se evaluó la influencia de los factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 contra las larvas de *Aedes aegypti*. Para el cual se realizó un estudio experimental mediante bioensayos de laboratorio, siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud. Se evaluó la influencia de la disponibilidad de alimento, densidad y estadio larvario sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 para *Aedes aegypti*. Se utilizó un biolarvicida comercial (Bactivec, Labiofam) y una cepa de referencia de *Aedes aegypti* (Rockefeller). La eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 fue menor en la medida en que avanzó la densidad y el estadio de desarrollo larvario, lo que puede estar en relación con la conducta de alimentación y la disponibilidad del principio activo. La presencia abundante de alimento también limita la eficacia

por un efecto de competencia. La eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 se afectó por la disponibilidad de alimento, el estadio de desarrollo y la densidad larvaria, por lo que debe tenerse en cuenta esto para las aplicaciones del biolarvícida en el terreno.⁵

En una investigación de 6 años sobre los posibles efectos ecológicos de dos agentes de control de mosquitos, Metopreno (aplicado en forma de gránulos de arena AltosidTM) y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), aplicado en forma de gránulos Vectobac - GTM, el zooplancton, insectos y aves que se reproducen en los humedales del centro de Minnesota, EE.UU., entre los años 1988 a 1993; se halló que las densidades de insectos se redujeron en un 57 al 83%, mientras que en la biomasa la reducción fue de 50 al 83%. Por otro lado, se afirma que el preparado no tiene efectos negativos en las aves y zooplancton. Aunque el período de estudio fue relativamente largo (3 años de tratamiento), en comparación con la mayoría de los estudios ecológicos de los plaguicidas, no puede haber sido el tiempo suficiente para predecir totalmente los efectos de décadas de continua lucha contra los mosquitos.⁶

En Cali, Colombia, los sumideros son uno de los principales criaderos de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* Say que son controlados por la Secretaría de Salud Municipal utilizando el insecticida triflumurón desde 1999, sin embargo se sospecha que dicho tratamiento tienen fallas, por lo que se planteó un trabajo de investigación para evaluar la eficacia del Starycide® (triflumurón) y VectoMax® (mezcla bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Bacillus sphaericus*) en el control de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* en los sumideros y determinar el efecto residual de una única aplicación de VectoMax®, en épocas de alta y baja pluviosidad. La eficacia de los productos fue medida en 60 sumideros de una zona residencial de Cali por un período de 90 días. La media de individuos inmaduros (larvas y pupas de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*) fueron obtenidas quincenalmente de 40 sumideros intervenidos (20 con triflumurón y 20 con VectoMax®) y 20 sin tratamiento (grupo testigo). El efecto residual de la mezcla bacteriana se evaluó quincenalmente en 10 sumideros en cada temporada climática. Se halló que los sumideros tratados con VectoMax® presentaron diferencias en el promedio de estadios inmaduros en ambas especies frente al testigo ($p < 0,01$). En contraste, el tratamiento con triflumurón sólo presentó diferencias en los estadios inmaduros de *A. aegypti* con respecto al testigo ($p < 0,001$). El efecto residual del VectoMax® fue mayor en la época de baja pluviosidad con respecto al testigo ($p < 0,001$).⁷

Al ser considerado que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.) como un entomopatógeno de alta especificidad para culícidos y simúlidos de importancia médica, éste fue evaluado en las lagunas de oxidación (Miraflores, Panamá) contra larvas del género *Culex* de III y IV estadio (L3/4), con el objeto de determinar la formulación y concentración más adecuada para el control de estos mosquitos en dicho ecosistema. En pruebas preliminares de laboratorio se determinó que concentraciones de 1.0 ppm o menores, nunca alcanzaron 100 (por ciento) 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 B.t.i. Los bioensayos en el campo con cuatro formulaciones (ABG-6145, 0.6% i,a - 600AA; Bactimos-briquetas 5% i,a - 800AA; Vectobac-G 0.2% i,a - 200AA y Bactimos-FC 14.3% i,a - 1000AA), 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 (por ciento), 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* sp., pero sí hubo diferencia significativa en los porcentajes de reducción para los días +1; +3 y +7 post-tratamiento. Se concluye que una concentración de 0.28 ml/m² de Bactimos FC 14.3% i,a es la recomendada para el control de *Culex* spp. (III-IV) en las lagunas de oxidación, descargando 2,0 gal.dilución/180m² con un restablecimiento de 34 (por ciento) al séptimo día post-tratamiento (AU).⁸

Con el objetivo de determinar la susceptibilidad de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de *Aedes aegypti* colectados en los municipios de La Habana, Cuba; se emplearon 15 cepas de *Aedes aegypti*, una de cada municipio de La Habana, a partir de larvas y pupas colectadas en 2010 y una cepa de referencia: Rockefeller. Se utilizó *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, en formulación de tipo suspensión acuosa (Bactivec, Labiofam, Cuba). Para la realización de los

bioensayos se siguieron las guías de la Organización Mundial de la Salud para larvicidas bacterianos de uso en salud pública. La mortalidad larvaria se leyó a las 24 h y los resultados se procesaron en el sistema informático estadístico SPSS (11.0) mediante análisis Probit. A partir de lo realizado hallaron que las cepas de mosquitos evaluadas mostraron elevada susceptibilidad al biolarvicida, no se registraron diferencias significativas entre los valores de CL_{50} de las cepas de *Aedes aegypti*, ni de éstas comparadas con la cepa de referencia, por lo que concluyeron que los resultados presentados sugieren que la aplicación de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis sigue siendo una alternativa para el control de poblaciones larvales de *Aedes aegypti* en la provincia de La Habana.⁹

Se afirma que *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti) se utiliza comúnmente para el control selectivo de las poblaciones de larvas de mosquitos en los humedales costeros en Francia. En un estudio de dos años se investigó si tratamientos repetidos con Bti aplicados, ya sea como formulado líquido (VectoBac® 12AS) o como gránulo dispersable en agua (WG VectoBac®) puede afectar a la abundancia y diversidad invertebrados acuáticos no objetivos de control en una marisma. La composición taxonómica de la comunidad de invertebrados hallada en la marisma fue típica de los ecosistemas intermitentes de agua salobre, predominando anélidos, crustáceos y nematoceros. Las condiciones halladas fueron comparadas entre los dos años de la encuesta, tanto en términos de precipitación acumulada anual y distribución de las precipitaciones durante todo el año. Como consecuencia, el período hídrico y algunas otras características ambientales asociados con el secado de la marisma jugaron un papel importante en la dinámica de la comunidad de invertebrados. En el verano de 2006, el secado de la marisma reduce la abundancia del gusano poliqueto *Nereis diversicolor*, del anfípodo *volutator* *Corophium* y de larvas de quironómidos. Estos taxones fueron capaces de recolonizar rápidamente la marisma después de las inundaciones de septiembre de 2006. En 2007, la precipitación se distribuye de manera más regular en todo el año, y las marismas no se secaron. Hidrozoos, Chironomidos y Orthocladiinae y oligoquetos fueron más abundantes en los ambientes tratados que en los ambientes de control, especialmente en aquellas tratadas WG-VectoBac®. Por lo que afirman que no observaron efectos adversos de los tratamientos aplicados en la abundancia de *N. diversicolor*, *C. volutator* y larvas de chironoidos, lo que sugiere que la disponibilidad de estas fuentes de alimento para las aves no se vio afectada negativamente. Por lo que concluyen que en marismas saladas en

el cual se empleó VectoBac® 12AS o VectoBac® WG para el control de larvas de mosquito con Bti, no tuvo un efecto adverso sobre las comunidades que no son objetos de control.¹⁰

2.2. Marco conceptual

2.2.1. 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.

2.2.2. Efecto toxicológico agudo

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

2.2.3. 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

2.2.4. 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

2.2.5. *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*.

2.2.6. *Culex quinquefasciatus* Say

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.

2.2.7. Vectobac WG

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

2.3. Bases teóricas

2.3.1. *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, quimioorganótrofo y con actividad de catalasa. La característica principal de *Bacillus 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 como: baja concentración de nutrientes, pH ácido, disminución de la humedad, reducción del nivel de O₂; la composición química de la cubierta de la spora le confiere termo resistencia, le protege contra desecación en un ambiente adecuado la spora germina y da lugar a la fase vegetativa, simultáneamente a la formación de esporas, se producen cristales proteicos, que varían en su composición, según la variedad (población de organismos de una misma especie, que se pueden diferenciar por su comportamiento, pruebas bioquímicas, etc.) pueden alcanzar hasta el 30% del peso seco de la célula vegetativa.¹¹

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 *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, así como también a los más recientemente descritos *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* y *Bacillus 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.¹²

La clasificación taxonómica es¹³:

Reino	: Eubacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Bacillales

Familia : Bacillaceae
Género : Bacillus
Especie : *thuringiensis* Berliner 1915
Variedad : Israelensis
Serotipo : H-14

b. Toxinas y mecanismos de acción

Investigación sobre la bioquímica de *Bacillus thuringiensis* variedad israelensis, 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 debido que el ambiente es alcalino dentro del intestino, como consecuencia de ellos se genera 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 superviven en casos específicos, como en graneros lo cual provoca epizootia por la invasión masiva de *Bt* en el insecto.¹⁴

c. Proceso de esporulación

Según Sansinenea (2012),¹⁵ el proceso de esporulación comprende las siguientes fases o estadíos:

a. Estadío I:

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

b. Estadío II:

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

c. Estadío 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.

d. Estadío IV:

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

e. Estadío V

Inicia el proceso de formación de la espora.

f. Estadío VI

Culmina la formación del cuerpo paraesporal.

g. Estadío VII

En este estadío 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, *Bacillus 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.¹⁶

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 ó 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 para esporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos ó 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.¹²

2.3.2. Larvicida biológico: Vectobac WG

Larvicida

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.).¹⁷

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:¹⁷

- 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.¹⁴

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

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

b. Aplicación y dosis:

De acuerdo a las indicaciones para el uso del producto, se tiene lo siguiente:

Tabla 1. Modelo de la etiqueta donde se recomienda los usos y dosis recomendado para el uso de Vectobac WG para el control de plagas

USO	PLAGA	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>simuliun erythrocephalum</i>).	250 – 500 g/ha 1000 g/ha en caso de elevada contaminación.

Fuente: Adames (1986)¹⁸

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.¹⁹

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).²⁰

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.²¹

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.²¹

2.3.5. Orden Diptera: familia Culicidae

a. Características morfológicas

Los mosquitos pertenecen a la Familia Culicidae, dentro del Orden Diptera (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.²²

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.²³

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.²⁴

d. Clasificación taxonómica de la familia Culicidae

La clasificación de esta familia de dípteros es la siguiente²⁵:

Dominio	: Eukaryota
Reino	: Animalia
Sub reino	: Metazoa
Filo	: Arthropoda
Clase	: Insecta
Sub clase	: Pterygota
Infra clase	: Neoptera

Super orden : Endopterygota

Orden : Diptera

Sub orden : Nematocera

Infra orden : Culicomorpha

Familia : Culicidae

e. Importancia en la salud pública

El número de especies de mosquitos adaptados al ambiente antrópico (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens pipiens* y *Culex pipiens Culex quinquefasciatus* Say, 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.¹⁴

2.3.6. Familia Chironomidae

a. Características morfológicas

Los quironómidos son dípteros pequeños (de 2 a 10 mm) emparentados con las familias Ceratopogonidae y Simuliidae. Parecidos a mosquitos, se pueden distinguir de éstos por no tener escamas en las alas. Las antenas son plumosas y llamativas en los machos adultos y pilosos en las hembras. La cabeza es pequeña, frecuentemente escondida por el tórax y carece de ocelos. Las patas delanteras son alargadas, y la venación de las alas es más marcada anteriormente que posteriormente. Los adultos pueden ser verdes, blancos, rojos, negros o azules. Los adultos, al emerger, dejan en la superficie del agua las pieles (exuvias) de las pupas, las cuales son sumamente importantes taxonómicamente. Las larvas son generalmente acuáticas, de cuerpo alargado y tubular, con 12 segmentos abdominales bien definidos, cabeza bien desarrollada y pequeña, y sin patas. Dos pares de patas falsas o pseudopodos las ayudan en sus movimientos, aunque uno o ambos pares pueden estar ausentes. Las larvas son de color rojo, morado, azul, verde o blanco. Los especímenes larvales pierden su color al ser introducidos en alcohol.²⁶

b. Ciclo biológico

La mayoría de las especies son acuáticas o semiacuáticas durante los estadíos de vida de larva y pupa, aunque algunas de las especies son terrestres y existe un grupo adaptado a la vida en el mar (subfamilia Telmatogetoninae y la tribu Clunionini de la subfamilia Orthoclaadiinae). Las larvas habitan ríos, arroyos y lagos, aunque se pueden encontrar también en pozos, huecos en las rocas, fitotelmata, heces de animales y prácticamente en cualquier ambiente húmedo alimentándose principalmente de materia orgánica en descomposición. Las larvas generalmente viven en habitáculos parecidos a tubos pegados a piedras que ellos mismo construyen, troncos o en la arena, hechos de gran variedad de materiales. Algunas especies viven libremente en el fondo. Los adultos viven muy poco tiempo, desde sólo unos días hasta varias semanas, y no se alimentan. Los adultos son atraídos a las luces y forman enjambres cerca de lagos y ríos grandes, especialmente al amanecer o atardecer. Los huevos son puestos en el agua en tiras envueltas en mucílago.²⁶

c. Ecología

Las larvas se los pueden encontrar en cuerpos de aguas tanto naturales como artificiales, en aguas someras o profundas, corrientes o estancadas, sobre amplias superficies o en pequeños reservorios (bromeliaceas, axilas de las plantas). También se les encuentra en fango, arena y con abundante materia orgánica en descomposición. Son indicadores de agua mesoeutróficas. Las larvas pueden ser macrófagas (carnívoras), micrófagas o detritívoras.²²

d. Clasificación taxonómica de la familia Chironomidae

Estos insectos se clasifica de la siguiente manera²⁷:

Reino	: Animalia
Filo	: Arthropoda
Sub filo	: Hexapoda
Clase	: Insecta
Sub clase	: Pterygota
Infra clase	: Neoptera
Super orden	: Endopterygota
Orden	: Diptera
Sub orden	: Nematocera
Infra orden	: Culicomorpha
Super familia	: Chironomoidea

Familia : Chironomidae

Género : *Chironomus*

Especie : *calligraphus*

Se calcula que existen unas 1 0000 a 1 5000 especies de quironómidos en el mundo, de las cuales unas 1 500 a 2 000 especies pueden estar en el Neotrópico y por lo menos 1 000 en Centroamérica. Hasta ahora se han descrito unas 400 especies de la región Neotropical.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

El trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica, de la Especialidad de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre a diciembre 2015.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Producto bioinsecticida comercial formulado en base a *Bacillus thuringiensis* (Vectobac-WG), en solución.

3.2.2. Muestra

34 litros de solución de Vectobac-WG preparado en cuatro concentraciones crecientes (0,031, 0,063, 0,125 y 0,250 mg/L)

3.2.3. Unidad experimental

40 frascos de plástico de un litro de capacidad conteniendo 20 larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi, dispuestos de manera independiente, en cuatro concentraciones crecientes de Vectobac-WG, con cuatro repeticiones y cuatro blancos (ver la Tabla 2).

3.2.4. Muestreo

El muestreo fue realizado siguiendo las recomendaciones del tipo aleatorio, realizado en los diferentes procesos:

- Se seleccionó la cantidad de Vectobac-WG a emplear, donde a partir de aproximadamente 100 g, se seleccionó la cantidad a pesar en una balanza siguiendo el procedimiento de cuarteo.
- Para la asignación de larvas a las unidades de muestreo, donde a partir de una bandeja donde se hallaban, se colectó grupos de 20 unidades para ser asignados aleatoriamente a las unidades experimentales.

- Para la ubicación de las unidades experimentales dentro de las 36 unidades experimentales, se procedió a realizar el sorteo según la fila y columna.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Obtención de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus*

Para la obtención de huevos y larvas de *Culex quinquefasciatus* Say se procedió a instalar dos recipientes de agua en un lugar donde no existió incidencia directa de los rayos solares y con abundante vegetación (huerta). A dichos recipientes de aproximadamente 20 L de capacidad, se les agregó aproximadamente 10 L de agua potable declorada y un manojo de aproximadamente 100 g de alfalfa (*Medicago sativa*) con la finalidad de hacer que dicho medio sea atractivo para que las hembras de *Culex quinquefasciatus* puedan ovipositar. Se esperó aproximadamente entre 10 a 15 días hasta la aparición de huevos y larvas del primer instar del zancudo, los cuales fueron colectados con vaso descartable pequeño y trasladados a otros recipientes más pequeños conteniendo aproximadamente 2 L de agua declorada instalados en la misma área, en la que permanecieron por aproximadamente 20 a 30 días, hasta la obtención de larvas del IV estadio. La determinación de las larvas del IV instar estuvo basado en el tamaño, debido a que es un estadio previo a la fase de pupa se caracterizan por ser los más grandes, por lo que fueron seleccionados aquellos individuos que tuvieron una longitud de 0,8 a 1 cm, los cuales fueron trasladados al laboratorio para el empleo en la prueba de toxicidad, aproximadamente en un número de 500. Durante todo el periodo de cría, las larvas fueron alimentadas diariamente con pequeñas cantidades alimento balanceado para peces de acuario (0,25 g). Para la confirmación de la identificación de la especie, se observaron las larvas del IV instar y comparadas con la clave del Ministerio de Salud de Chile.²⁶

Las larvas *Chironomus calligraphus* Goeldi, fueron colectadas en la tercera laguna de maduración de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”, para el cual se empleó una red de abertura circular con un mango de madera de aproximadamente de 1,20 m de largo y teniendo como luz de malla 0,5 mm. Los especímenes capturados fueron seleccionados en base a su tamaño (0,8 a 1,2 mm) en un número aproximado de 500, para luego ser trasladados al laboratorio. El criterio tomado en cuenta para considerar que las larvas fueron del IV instar fue la misma considerada para las larvas de *Culex quinquefasciatus*. El traslado fue realizado en un balde de ocho litros, teniendo

como medio agua de la misma laguna de maduración, para luego ser depositados en un acuario de 30 x 40 cm donde el medio inicial fue reemplazado por agua declorada hasta una altura aproximada de 5 a 10 cm. Las larvas permanecieron en dicho recipiente por aproximadamente siete días, siendo alimentadas con alimento para peces de acuario hasta 24 horas antes de las pruebas de toxicidad.

3.3.2. Prueba de laboratorio

Las larvas colectadas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi fueron mantenidas en un acuario, antes del inicio de la prueba de toxicidad, fueron seleccionados, siendo considerados como posibles candidatos, solo aquellos especímenes que presentaron el tamaño señalado anteriormente y movimientos típicos de su propia de su especie; para el caso de *Culex quinquefasciatus* Say movimientos verticales de emergencia y sumersión en el agua y para *Chironomus calligraphus* Goeldi movimientos ondulantes dentro del agua.

Las larvas fueron instaladas en recipientes de plástico (tapers descartables) conteniendo un litro de agua potable declorada en el que se colocaron 20 larvas, sea de *Culex quinquefasciatus* Say o de *Chironomus calligraphus* Goeldi. De dichas unidades de crianza se tuvo cuatro unidades correspondiendo uno para cada concentración del bioinsecticida, más un recipiente considerado como blanco. Se tuvo cuatro repeticiones para las concentraciones de Vectobac WG y dos para los blancos, tal como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 2. Tratamientos (número de larvas y concentración de Vectobac WG) considerados en la prueba de toxicidad.

Tratamiento	Especie de larvas	Número de repeticiones (frascos)	Nº de larvas	Concentración de Vectobac WG (g/10L)
1	<i>Culex quinquefasciatus</i> Say	4	20	0,00003125
2		4	20	0,00006250
3		4	20	0,00012500
4		4	20	0,00025000
Blanco		2	0	0,0
1	<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	4	20	0,00003125
2		4	20	0,00006250
3		4	20	0,00012500
4		4	20	0,00025000
Blanco		2	20	0,0

En total se tuvieron 36 recipientes para el proceso experimental. Las concentraciones probadas y que son mostradas en la tabla anterior, han sido calculadas en base a lo que señala las recomendaciones presente en la etiqueta del frasco del producto comercial.

Las soluciones de Vectobac WG fueron preparados en las concentraciones señaladas aproximadamente a una hora del iniciado el bioensayo, para el cual se consideró la concentración de la proteína cristalizada y las esporas, y otros componentes, ya que la formulación del producto dice contener excipientes.

Una vez colocados las larvas de los dípteros en los recipientes conteniendo las concentraciones respectivas del bioinsecticida, transcurrido 24 horas, se determinó el número de larvas muertas en cada recipiente, para el cual con la ayuda de un varilla delgada de madera (brocheta) se tocó a las larvas inmóviles, si en caso de seguir en esa condición, fueron considerados como muertos, siendo extraídos de las unidades experimentales. De la misma manera se procedió a las 48 horas.

Las condiciones ambientales en el cual fue llevado a cabo el experimento fueron:

- Bajo sombra.
- Temperatura ambiental fue de $18\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Un fotoperiodo bajo condiciones naturales, siendo aproximadamente de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

3.4. Tipo de investigación

El tipo de investigación realizado fue básica – experimental, ya que la principal contribución es la de generar nuevos conocimientos sobre el efecto de un bioinsecticida sobre organismos acuáticos tomando como modelos al *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi; y experimental porque se manipularon dos variables, la primera fue referida al Vectobac WG (concentraciones crecientes) y la segunda, larvas de dos especies de dípteros.

3.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron presentados en tablas y figuras en cual se muestra estadísticos de tendencia central y de dispersión.

Por otro lado, con la finalidad de comparar las mortalidades registradas en las cuatro concentraciones del bioinsecticida, se empleó la prueba de Mann Whitney, con en el que se analizó de manera independiente el efecto causado por Vectobac WG sobre las dos especies. También se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, para determinar el efecto de las cuatro diferentes

concentraciones del Vectobac en cada una de las dos especies, así como para determinar el efeco de las combinaciones de las especies con las cuatro concentraciones, el uso de dichas pruebas no paramétricas se debió a que los datos no presentaron distribución normal (ver Anexo 1).

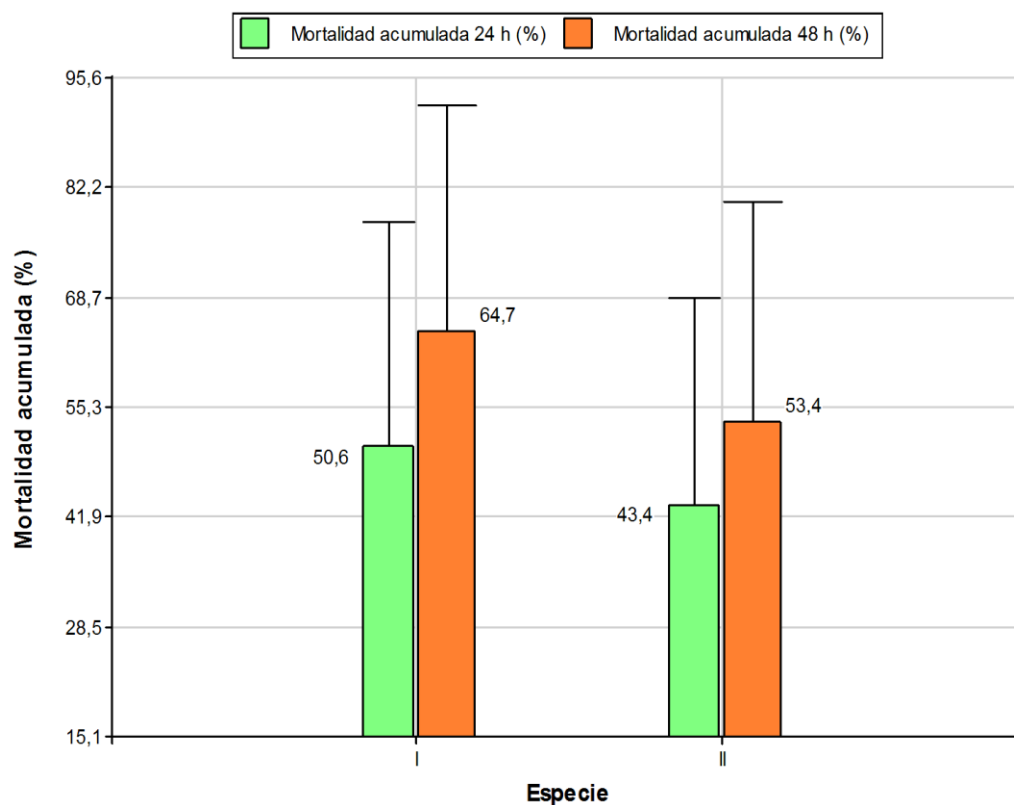
Para la estimación de la Concentración Letal Media (CL_{50}), se empleó la metodología de Probit. En todos los casos, se empleó el software SPSS 24 y MINITAB 18 para realizar los análisis estadísticos, con una confianza del 95% ($\alpha=0,05$).

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Mortalidad acumulada promedio de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición.

Especies	Concentración (mg/L)	Mortalidad acumulada 24 h (nº)	Mortalidad acumulada 48 h (nº)	Mortalidad acumulada 24 h (%)	Mortalidad acumulada 48 h (%)
I	0,00000	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,03125	3,75	6,00	18,75	30,00
	0,06250	6,50	10,00	32,50	50,00
	0,12500	13,25	16,00	66,25	80,00
	0,25000	17,00	19,75	85,00	98,75
	Total	9,00	11,50	45,00	57,50
II	0,00000	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,03125	3,50	5,00	17,50	25,00
	0,06250	6,00	8,25	30,00	41,25
	0,12500	12,00	14,25	60,00	71,25
	0,25000	16,25	18,25	81,25	91,25
	Total	8,39	10,17	41,94	50,83
Total	0,00000	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,03125	3,63	5,50	18,13	27,50
	0,06250	6,25	9,13	31,25	45,63
	0,12500	12,63	15,13	63,13	75,63
	0,25000	16,63	19,00	83,13	95,00
	Total	8,69	10,83	43,47	54,17

Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

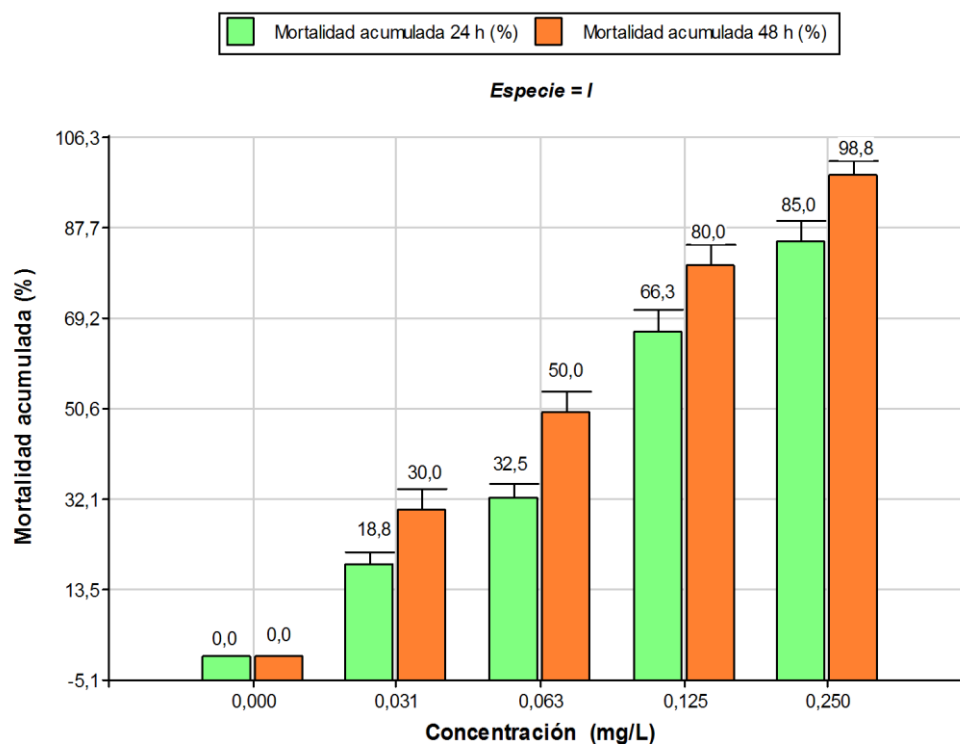


Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Prueba de Mann-Whitney (24 horas): $p = 0,3.67$

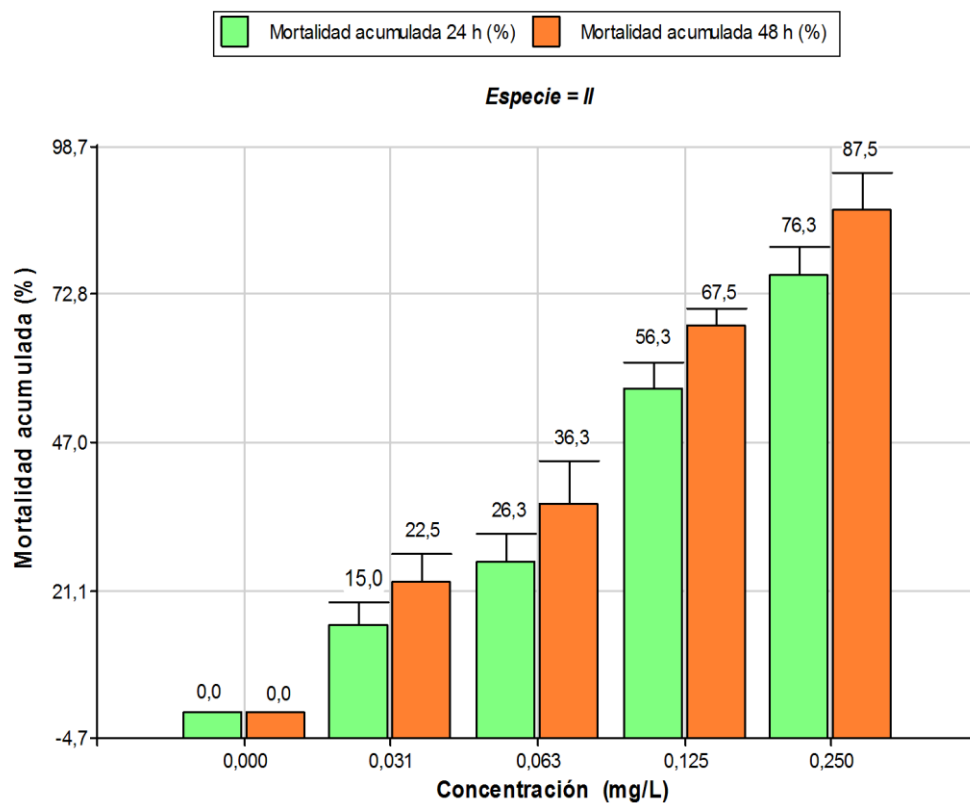
Prueba de Mann-Whitney (48 horas): $p = 0,1735$

Figura 1. Mortalidad acumulada promedio y desviación estándar de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi, sometidos a Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*)



Prueba de Kruskal Wallis (24 horas): $p = 0,0025$
 Prueba de Kruskal Wallis (48 horas): $p = 0,0025$

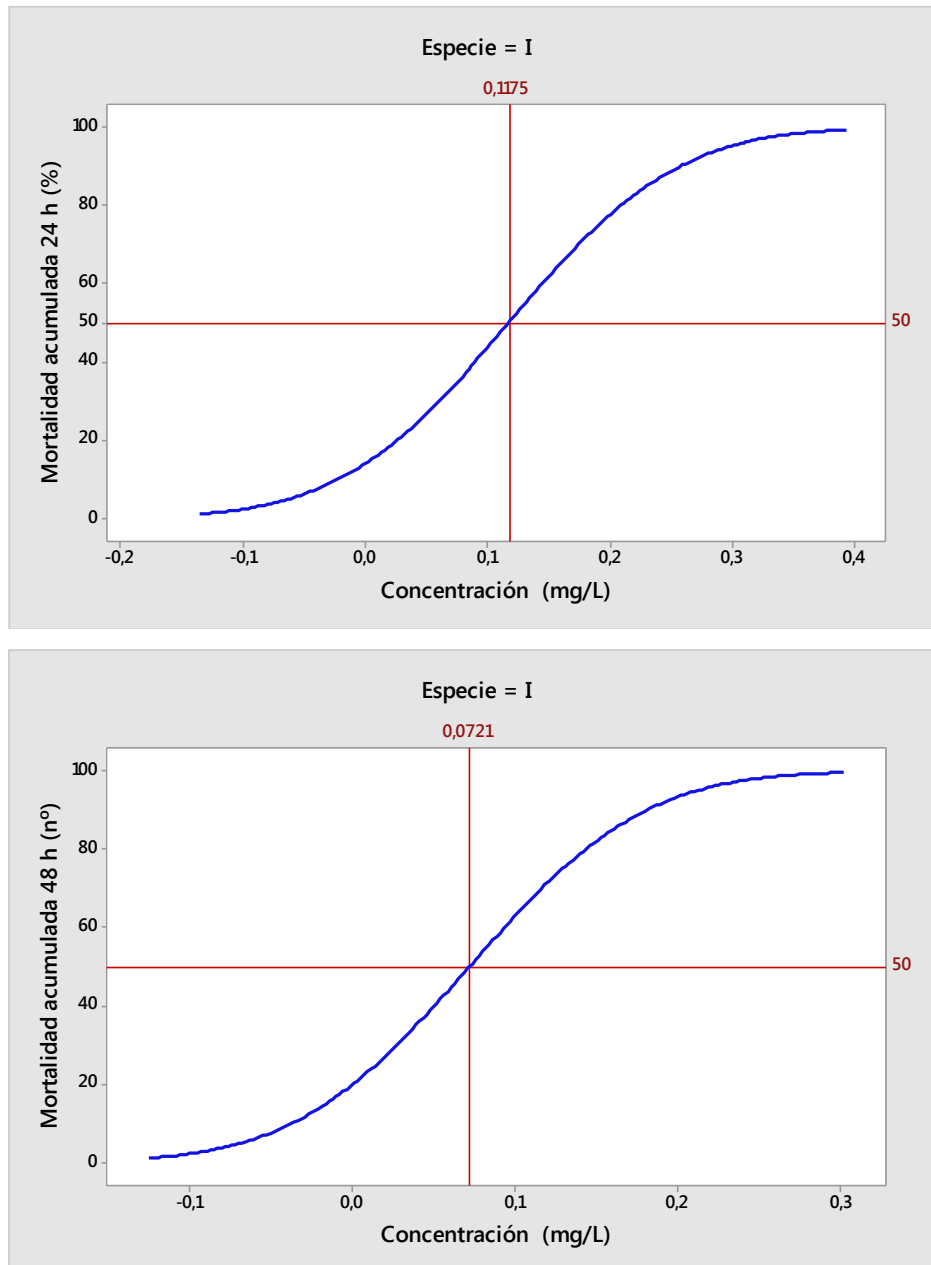
Figura 2. Mortalidad acumulada promedio y desviación estándar de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición.



Prueba de Kruskal Wallis (24 horas): $p = 0,0027$

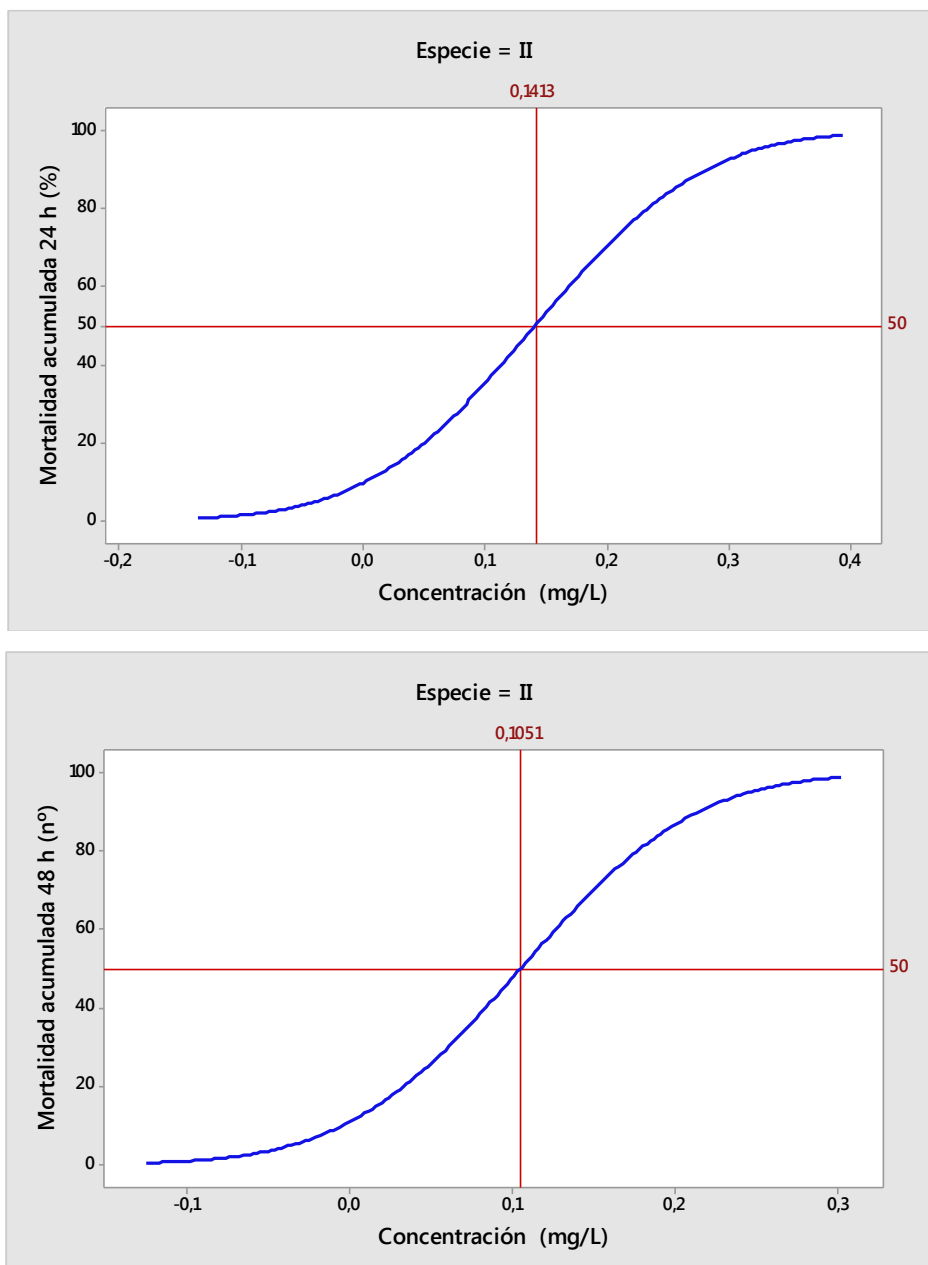
Prueba de Kruskal Wallis (48 horas): $p = 0,0025$

Figura 3. Mortalidad acumulada promedio y desviación estándar de larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi, sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición.



Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Figura.4. Tendencia de la mortalidad acumulada y la concentración letal media calculada mediante Probit de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say sometidos causada por Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición.



Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Figura.5. Tendencia de la mortalidad acumulada y la concentración letal media calculada mediante Probit de larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi causada por Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición.

Tabla 4. Valores de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y sus intervalos de confianza a para Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi a las 24 y 48 horas de exposición.

Especie	Tiempo de exposición (h)	CL ₅₀ (mg/L)	Intervalo de Confianza (95%)	
			Inferior	Superior
I	24	0,1175	0,1018	0,1340
	48	0,0721	0,0591	0,0851
II	24	0,1414	0,1253	0,1587
	48	0,1052	0,0924	0,1185

CL₅₀: Concentración Letal Media

Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

V. DISCUSIÓN

En la Tabla 3, se muestra los promedios de las mortalidades acumuladas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición, expresadas como frecuencias absolutas y porcentajes, se observa en forma general que las mortalidades en *Chironomus calligraphus* Goeldi son relativamente menores a las que se halló en *Culex quinquefasciatus* Say, Así mismo que dichas mortalidades se incrementan a medida con la concentración del producto probado y el tiempo de exposición.

En la Figura 1, se observa los valores promedios y la desviación típica de la mortalidad acumulada de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) para las 24 y 48 horas exposición. A las 24 horas de exposición las mortalidades fueron de 50,6% y de 43,4% para *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi respectivamente; mientras que a las 48 horas fue de 64,7% y de 53,4%. Dentro de los resultados hallados es importante resaltar lo siguiente; primero, con respecto a la magnitud registrada de la mortalidad en los dos tiempos de exposición, se observa que la mayor mortalidad ocurrió dentro de las 24 horas en comparación con la que ocurrió tiempo después, así por ejemplo para el caso de la *Culex quinquefasciatus* Say la mortalidad fue del orden de 50,6%, mientras que luego de ese tiempo la mortalidad llegó a ser del orden del 14,1%, los que sumados llegan a un valor de 64,7%; segundo, con respecto a las dos especies, numéricamente las mayores mortalidades son registradas para *Culex quinquefasciatus* Say en comparación con *Chironomus calligraphus* Goeldi, así se registraron mortalidades del orden de 50,6% para *Culex quinquefasciatus* Say y de 43,4% para *Chironomus calligraphus* Goeldi a las 24 horas y de 64,7% y de 53,4% para las 48 horas, con la finalidad de determinar si las diferencias numéricas son estadísticamente significativas entre las dos

especies, se realizó la prueba de Mann Whitey tanto para las 24 y 48 horas de exposición, la que se observa en el anexo 2, en ambos casos no se halló significancia ($p < 0,05$), lo que quiere decir que las dos especies, son igualmente afectadas por el Vectobac-WG. Lo hallado se explicaría debido a que, una población frente a la presencia de una sustancia tóxica, las mortalidades generadas van a ser producto, en primer lugar, de la naturaleza de dicha sustancia (existen unas más o menos tóxicas), en segundo lugar de la concentración de la misma y en tercer lugar de aquellos factores inherentes al organismo, cómo por ejemplo el tamaño, peso, variabilidad genética, etc., es por ello que seguramente las mayores mortalidades en el periodo de la experimentación ocurre dentro de las 24 horas, en la que muy probablemente los más susceptibles son las que mueren, mientras que en periodos posteriores lo hacen aquellos que tienen características diferentes a los primeros mencionados.²¹ Los porcentajes promedios de mortalidad registrados en el lapso del tiempo del experimento (48 horas) muestran que se alcanzó mortalidades menores a 65%, para el caso de *Culex quiquefasciatus* Say, siendo comparativamente dichos valores menores a lo hallado por Sulaiman *et al.*,¹⁹ cabe mencionar que las mortalidades registradas fueron en especies del género Aedes, que pese a pertenecer a la misma familia que Culex, dichas diferencias posiblemente se deban a que son diferentes especies y por otro lado, no comparten hábitats que tengan las mismas características, siendo Aedes más exígete con ellas, mientras que larvas de *Culex quinquefasciatus* Say pueden ser hallados en ambientes muy variado. Por otro lado, las mayores mortalidades, pese a que son estadísticamente similares, son menores en *Chironomus calligraphus* Goeldi, probablemente a que dicha especie se los halla en ambientes con abundante materia orgánica en descomposición (las empleadas en este trabajo de investigación fueron colectadas en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales PTAR “La Totorá) donde están en contacto permanente con sustancias tóxicas y patógenos, generando en ellos cierto nivel de resistencia; así mismo es importante mencionar que el producto comercial probado (VectoBac WG) ha sido formulado para controlar a especies que pertenecen a la familia Culicidae, sin embargo se está demostrando que también afecta en igual medida a otra especie emparentada (Diptera, Chironomidae) que comparten en muchos casos el mismo hábitat que *Culex quiquefasciatus* Say, este aspecto es necesario resaltar en el sentido de que *Chironomus calligraphus*

Goeldi que pese a no ser un vector que puede transmitir enfermedades, cumple un papel muy importante en la descomposición de la materia orgánica en los ecosistemas acuáticos, ya que se alimenta de ellos, por otro lado es una fuente de alimento de organismos acuáticos como peces (cuando se hallan en larva) y de aves, quirópteros, anfibios cuando se hallan en el estadio adulto²⁸. Se menciona que el formulado comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* es muy específico, demostrando niveles tóxicos muy bajos para otras especies como peces y otros organismos similares, tal como se especifica en la descripción técnica del producto (Anexo 11); pero para especies de una misma taxa (Diptera) no existe información, tal como se observa en dicho anexo, siendo necesario generar información al respecto, por lo que a luces de lo hallado, se puede afirmar que el preparado comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* afecta de manera similar a *Chironomus calligraphus* Goeldi siendo muy tóxica para dicha especie, de lo afirmado, el uso de dicho producto, necesariamente se tiene que realizar con el cuidado respectivo, tal vez de manera similar al uso de otros plaguicidas; en este aspecto, lo hallado es respaldado por la investigación desarrollada por Niemi *et al.*⁶ los que reportan que el empleo de Vectobac WG en un humedal dulceacuícola, redujo en un 57 a 83% la densidad de los insectos en los ambientes en el cual fue aplicado; por otro lado Caquet *et al.*¹⁰ afirman que al emplearse el producto Vectobac WG en un marisma, no se observaron efectos negativos en la presencia de insectos en el grupo de los Chironomidos, probablemente dichos resultados contradictorios se deba que se probaron en ambientes diferentes en muchos aspectos y principalmente en la concentración de sales. Por otro lado, se observa que las magnitudes de la desviación típica son elevadas, asumiendo valores muy próximos a los valores medios, esto ocurre debido a que las dos especies fueron sometidos a diferentes concentraciones del producto (así se diseñó el experimento).

En la Figura 2, se observa los valores promedios y desviación estándar de la mortalidad acumulada de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) más un blanco, a las 24 y 48 horas de exposición. En forma general se observa que los porcentajes de mortalidad se incrementan a medida que la concentración del Vectobac-WG también se incrementa, por ello que a concentraciones de 0,031 mg/L las mortalidades fueron del orden de 18,8% y de

30% para las 24 y 48 horas de exposición, similar comportamiento se observa en la máxima concentración empleada que fue de 0,250 mg/L, sin embargo la magnitud de la mortalidad fue mayor, siendo de 85% y de 98,8% para las 24 y 48 horas respectivamente. Al realizar la comparación de las mortalidades, registrada a las 24 horas de exposición, según las concentraciones de Vectobac-WG empleadas y un blanco mediante la prueba de Kruskal Wallis, la que se observa en el Anexo 3, se tiene como resultado la existencia de significancia estadística ($p < 0,05$), a partir del cual se afirma que las mortalidades originadas por el producto, son diferentes según la concentración, es por ello que se procedió a la jerarquización, la que se observa en el mismo anexo, donde se nota claramente que la concentración de 0,25 mg/L causó la mayor mortalidad y la concentración de 0,031 mg/L, la menor, resaltando también que en el blanco no se registró mortalidad alguna. Los resultados hallados son similares a los porcentajes de mortalidad registrados a las 48 horas (Anexo 4), donde la mayor concentración del producto originó mayor mortalidad, la que es estadísticamente diferente al resto de las concentraciones probadas, realidad opuesta es la mortalidad que originó la menor concentración la que es catalogada de menor efecto. De acuerdo a la comparación con lo hallado por Adames,⁸ los resultados de esta investigación muestran que bajo las condiciones en la cual se llevó a cabo el experimento, existió una mayor efectividad del Vectobac WG sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus* Say, ya que afirma que concentraciones de un producto similar, en este caso de 1 mg/L, produjeron mortalidades de menos 100%, mientras que para el caso del presente trabajo de investigación la una concentración de 0,250 mg/L (una cuarta parte), produjo mortalidades de 85% y 98,8% a las 24 y 48 horas de exposición; así mismo dicho investigador menciona también que concentraciones de 3 mg/L produjeron mortalidades del 100%, concentración que no se probó; lo descrito probablemente se deba a que las condiciones ambientales en la cual se llevaron a cabo son diferentes, además de que en el caso del trabajo de Adames no hace mención a que especie corresponde las larvas con el cual realizaron las pruebas de toxicidad. Por otro lado también es importante mencionar que la mayor mortalidad de larvas producida a mayores concentraciones de Vectobac WG, se debe a que al existir una mayor presencia del producto existe mayores probabilidades de que las larvas puedan ingerirla en las cantidades mínimas que pueda generar mortalidad, de modo que esa respuesta está función de su concentración, tal como lo afirma Entwistle.²⁹

En la Figura 3, se observa los valores promedios y desviación estándar de la mortalidad acumulada de larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones del biopreparado comercial Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) y un blanco sometidos a dos tiempos de exposición (24 y 48 horas). Se observa la tendencia de que los porcentajes de mortalidad se incrementan a medida que la concentración del Vectobac-WG también se incrementa, donde la concentración de 0,031 mg/L las mortalidades fueron del orden de 15% y de 22,5% para las 24 y 48 horas de exposición, similar comportamiento se observa en la máxima concentración empleada que fue de 0,250 mg/L, donde la magnitud de la mortalidad fue mayor, siendo de 76,3% y de 87,58% para las 24 y 48 horas respectivamente. Al realizar la comparación de las mortalidades, registrada a las 24 horas de exposición, según las concentraciones de Vectobac-WG empleadas y un blanco mediante la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 5) se halló la existencia de significancia estadística ($p < 0,05$), a partir del cual se afirma que las mortalidades originadas por el producto, son diferentes según la concentración, al realizar la jerarquización, la que se observa en el mismo Anexo, se nota claramente que la concentración de 0,25 mg/L causó la mayor mortalidad y la concentración de 0,031 mg/L, la menor, considerando también que en el blanco no se registró mortalidad alguna. Los resultados hallados son similares al aplicarse la prueba de Kruskal Wallis a los porcentajes de mortalidad registrados a las 48 horas (Anexo 6), donde la mayor concentración del producto originó mayor mortalidad, la que es estadísticamente diferente al resto de las concentraciones probadas, realidad opuesta es la mortalidad que originó la menor concentración la que es catalogada de menor efecto. Respecto a los resultados hallados, donde *Chironomus calligraphus* Goeldi, es afectado por el preparado comercial Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*), no se ha podido hallar trabajos de investigación similares donde se cuantifique las mortalidades que se generan en dichas larvas por acción del producto, sin embargo Niemi,⁶ menciona que la aplicación de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* bajo la formas del producto gránulos Vectobac – GTM, produjo una reducción de 57% a 83% en la población de insectos en aquellos lugares donde fueron aplicados; por otro lado Jonsson *et al.*,² menciona que la aplicación de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911), cepa 344, sobre algunas especies de organismos acuáticos no generó efectos negativos en organismos como peces, sin embargo si afectó a

invertebrados como *Daphnia similis*, por lo que sugieren que el uso de dichos biopesticidas pueden generar riesgos sobre algunas especies acuáticas. Los resultados de las dos investigaciones citadas, coinciden con los resultados hallados donde el Vectobac WG, causa niveles de mortalidades importantes en *Chironomus calligraphus* Goeldi, especie que se halla compartiendo el mismo hábitat que *Culex quinquefasciatus* Say, por lo que podemos afirmar que al aplicar Vectobac WG, se debe hacer teniendo en cuenta las recomendaciones que se siguen para los plaguicidas.

En la Figura 4, se observa la tendencia de la mortalidad acumulada y la concentración letal media calculada mediante la técnica de Probit de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say sometidos causada por Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición, en la que se observa que el porcentaje de mortalidad de las larvas de dicho insecto de incrementa gradualmente a medida que la concentración del producto Vectobac-WG también se incrementa, en la curva se observa que existe una primera etapa en la cual la mortalidad es mínima en la que se podría afirmar que la concentración no llega a ser la necesaria para que genere mortalidad; para luego incrementarse rápidamente a partir de cierta concentración. Por otro lado, en la figura mencionada se observa que la concentración letal media (CL_{50}) para un tiempo de exposición de 24 horas es de 0,1175 mg/L y para las 48 horas de 0,0721 mg/L, lo que se interpreta que teóricamente son las concentraciones en la que las larvas de *Culex quinquefasciatus* Say deben ser sometido, para que el 50% de ellas mueran, por otro lado en el Anexo 7 y 8, se observa que la concentración calculada teóricamente que debería emplearse para garantizar el 99% de las larvas es de 0,3694 mg/L para las 24 horas y de 0,0721 para las 49 horas.

En la Figura 5, se muestra la tendencia de la mortalidad acumulada y la concentración letal media calculada mediante Probit de larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi causada por Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición. Las características de la tendencia son similares a lo observado en la figura anterior, en la que resalta que existe una concentración en la cual la mortalidad de dichas larvas se incrementa ostensiblemente. Por otro lado, también se muestra los valores de la concentración letal media (CL_{50}) para un tiempo de exposición de 24 y 48 horas, siendo dichos valores de 0,1413 mg/L y de 0,1051mg/L respectivamente; es

decir son las concentraciones en donde se espera que el 50% de las larvas sometidas a su acción deben de morir por la acción de VectoBac WG. De la misma manera en el Anexo 9 y 10 se observa que la concentración del preparado comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* a emplear en la que se estima que van a morir el 99% de mortalidad de las larvas es de 0,3932 y de 0,3021 mg/L a las 24 y 48 horas de exposición, dichas concentraciones son mayores a los hallados como CL₅₀, ya que estas generan un mayor porcentaje de mortalidad, también es necesario señalar que la cuanto mayor es el tiempo de exposición a un tóxico mayor es su efecto.

En la Tabla 4, se muestra los Valores de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y sus intervalos de confianza a para Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi a las 24 y 48 horas de exposición. Comparativamente se observa que a las 24 y 48 horas los valores de la concentración letal media (CL₅₀) presentan un valor menor para las larvas de *Culex quinquefasciatus* Say en comparación con *Chironomus calligraphus* Goeldi, lo que quiere decir que sería necesario una mayor concentración de VectoBac WG para que larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi presenten una igual mortalidad que *Culex quinquefasciatus* Say. También se observa que los valores de la concentración letal media son menores a mayor tiempo de exposición, lo que se interpreta como que a mayor tiempo de estar en contacto con el producto comercial preparado en base a *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* mayor será su efecto sobre la mortalidad de las larvas. Respecto a valores de la concentración letal media (CL₅₀) de Vectobac WG sobre invertebrados acuáticos como las dos especies probadas *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi, no se ha podido hallar información específica, excepto para organismos con los que no se hallan estrechamente emparentados, tal como se muestra en la ficha técnica de seguridad y toxicidad del producto (Anexo 11), donde se hace mención de que el CL₅₀ para *Daphnia magna* es de más de 50 mg/L, valor que es muy superior a los valores hallados para *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi que es de 0,0721 y de 0,1052 mg/L a las 48 horas de exposición, lo que quiere decir que el efecto tóxico de Vectobac WG es mucho mayor para los dos Díptera probados, dichos resultados son respaldados por las afirmaciones de King *et al*,¹¹ Lacey y Kaya,³⁰ los que afirman que *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* es una variedad muy específica que causa

mortalidad en los llamados moscas y mosquitos (Orden Diptera), razón por el cual los valores del CL_{50} son mucho más pequeñas en dichos organismos en comparación con lo determinado para cladóceros.

VI. CONCLUSIONES

1. Los porcentajes de mortalidad generados por Vectobac-WG tanto para las larvas de IV instar de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi fueron estadísticamente similares ($p>0,05$). Siendo las mortalidades directamente relacionadas a las concentraciones probadas, a mayor concentración mayor mortalidad, alcanzando niveles de 98,8% para *Culex quinquefasciatus* Say y 87,5% para *Chironomus calligraphus* Goeldi, a las 48 horas de exposición.
2. La concentración letal media (CL_{50}) promedio para *Culex quinquefasciatus* Say fue 0,1175 y 0,0721 mg/L a las 24 y 48 horas de exposición, respectivamente; mientras que para *Chironomus calligraphus* Goeldi fue 0,1414 y 0,1052 mg/L para los mismo tiempos de exposición.

V. RECOMENDACIONES

1. Realizar indagaciones sobre el efecto de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) sobre otros organismos que comparten el mismo hábitat de aquellos organismos que se pretende controlar con bioinsecticidas, como es el caso de Vectobac WG, con la finalidad de generar información sobre su efecto sobre el ecosistema en general donde se aplica.
2. Realizar investigaciones del efecto de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) en condiciones de campo con la finalidad de identificar los factores ambientales que disminuyen la efectividad del producto y determinar las concentraciones adecuadas que garanticen el control de los organismos blanco.
3. Generar información sobre la residualidad de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) en condiciones de campo y determinar con ello la frecuencia con la cual debe ser aplicada en los criaderos naturales de las especies que se quiere controlar.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marin, R. Efecto toxicológico de cadmio, mercurio y plomo en larvas de *Chironomus calligraphus*. Ayacucho 2014. Univ. Nac. San Cristóbal Huamanga (2014).
2. Jonsson, C., Nunes, A. de H., Fontana, D. & Carballo, O. Efecto del bioplaguicida *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911), cepa 344, en organismos indicadores del compartimiento acuático. (2011). Available at: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/906689>. (Accessed: 12th November 2016)
3. Ordoñez, E. J. L. & Marroquín, L. C. Formulación sólida a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de larvas de *Aedes aegypti*. *Portal Cienc.* **4**, 38–44 (2015).
4. Nuviola, D. L., Flores, Y. H. & Fernández, M. del C. M. Ensayo de campo con Bactivec® (*Bacillus thuringiensis*) y Griselesf® (*Bacillus sphaericus*) en sitios de cría de *Anopheles sp.* en Luanda, Angola. *Rev. Cubana Med. Trop.* **69**, (2017).
5. Corbillón Porraspita, C. O. et al. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Cubana Med. Trop.* **64**, 235–243 (2012).
6. Niemi, G. J. et al. Ecological effects of mosquito control on zooplankton, insects, and birds. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 549–559 (1999).
7. Pérez Flórez, M., Calderón, G., I, G., Morales, C. A. & Ocampo, C. B. Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali, Colombia. *Rev. Bioméd.* (2015).
8. 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, 1986).
9. Menéndez Díaz, Z. et al. Susceptibilidad de cepas de *Aedes aegypti* (L.) a *Bacillus thuringiensis* var. israelensis en La Habana. *Rev. Cubana Med. Trop.* **64**, 324–329 (2012).
10. Caquet, T., Roucaute, M., Le Goff, P. & Lagadic, L. Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on non-target saltmarsh invertebrates in Atlantic coastal wetlands. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 1122–1130 (2011).
11. King, E., Wong, L., Padilla, C. & Luna-Olvera, H. H. *Avances recientes en la biotecnología en Bacillus thuringiensis*. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 1996).
12. Nazeer, S., Malik, K. & Munir, F. *Bacillus Thuringiensis*. (LAP Lambert Academic Publishing, 2012).
13. *Bacillus thuringiensis*. Wikipedia, la enciclopedia libre (2013).
14. Avilla, J. *El control biológico de plagas y enfermedades*. (Universitat Jaume I, 2005).
15. Sansinenea, E. *Bacillus thuringiensis Biotechnology*. (Springer, 2012).
16. Corbillón PCO, G. R. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) - medigraphic.com. Available at: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=38035>. (Accessed: 2nd December 2013)

17. Gomes de Assumpção Filho, U. & da Costa Silva, W. Aplicación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis SH-14 contra *Aedes* (S) *aegypti*. *Rev. Cubana Med. Trop.* **56**, 163–166 (2004).
18. 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, 1986).
19. Sulaiman, S., Pawanche, Z., Wahab, A., Jamal, J. & Sohadi, A. 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.* **22**, 122–124 (1997).
20. Mayero. *Manual de toxicología básica*. (Ediciones Díaz de Santos, 2000).
21. Gutiérrez, J. B. & Salsamendi, A. L. de C. *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. (Ediciones Díaz de Santos, 2001).
22. Triplehorn, C. A., Johnson, N. F. & Borror, D. J. *Borror and DeLong's introduction to the study of insects*. (Thompson Brooks/Cole, 2005).
23. Capinera, J. L. *Encyclopedia of Entomology*. (Springer, 2008).
24. Gullan, P. J. & Cranston, P. S. *The Insects: An Outline of Entomology*. (John Wiley & Sons, 2010).
25. González, C. *et al.* Manual de Culícidos (Diptera: Culicidae). Ministerio de Salud de Chile. (2016).
26. Domínguez, E. *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: sistemática y biología*. (Fundación Miguel Lillo, 2009).
27. Domínguez, E. & Fernández, H. *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. Sistemática y Biología*. (Centro de información Geo-Biológico del Noreste de Argentina., 2009).
28. Roldán, G. & Ramírez, J. J. R. *Fundamentos de limnología neotropical*. (Universidad de Antioquia, 2008).
29. Entwistle, P. F. *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide: theory and practice*. (John Wiley & Sons, 1993).
30. Lacey, L. A. & Kaya, H. K. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests*. (Springer, 2007).

ANEXOS

Anexo 1

Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilks para la mortalidad acumulada de larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Mortalidad acumulada 24 h ..	36	41,81	28,86	0,88	0,0017
Mortalidad acumulada 48 h ..	36	52,5	31,93	0,9	0,005

Anexo 2.

Resultados de la prueba de Mann-Whitney para las mortalidades acumuladas de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 y 48 horas de exposición.

Variable	Grupo 1	Grupo 2	Media(1)	Media(2)	W	p(2 colas)
Mortalidad acumulada 24 h	I	II	50,63	43,44	291	0,3067
Mortalidad acumulada 48 h	I	II	64,69	53,44	300	0,1735

Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Anexo 3.

Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say sometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 horas de exposición.

Especie	Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	H	p
I	Mortalidad acumulada 24 h	0	2	0	16,28	0,0025
I	Mortalidad acumulada 24 h	0,031	4	18,75		
I	Mortalidad acumulada 24 h	0,063	4	32,50		
I	Mortalidad acumulada 24 h	0,125	4	66,25		
I	Mortalidad acumulada 24 h	0,250	4	85,00		

Trat.	Ranks			
0	1,5	A		
0,031	4,5	A		
0,063	8,5	A	B	
0,125	12,5		B	C
0,250	16,5			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)
 Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Anexo 4.

Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say sometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 48 horas de exposición.

Especie	Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	H	P
I	Mortalidad acumulada 48 h	0	2	0	16,28	0,0025
I	Mortalidad acumulada 48 h	0,031	4	30,00		
I	Mortalidad acumulada 48 h	0,063	4	50,00		
I	Mortalidad acumulada 48 h	0,125	4	80,00		
I	Mortalidad acumulada 48 h	0,250	4	98,75		

Trat.	Ranks			
0	1,5	A		
0,031	4,5	A		
0,063	8,5	A	B	
0,125	12,5		B	C
0,25	16,5			C

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

Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Anexo 5.

Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 24 horas de exposición.

Especie	Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	H	p
II	Mortalidad acumulada 24 h	0	2	0	16,14	0,0027
II	Mortalidad acumulada 24 h	0,031	4	15,00		
II	Mortalidad acumulada 24 h	0,063	4	26,25		
II	Mortalidad acumulada 24 h	0,125	4	56,25		
II	Mortalidad acumulada 24 h	0,250	4	76,25		

Trat.	Ranks			
0	1,5	A		
0,031	4,63	A		
0,063	8,38	A	B	
0,125	12,5		B	C
0,250	16,5			C

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

Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Anexo 6.

Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para las mortalidades acumuladas de larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi sometidos a cuatro concentraciones de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) a las 48 horas de exposición.

Especie	Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	H	p
II	Mortalidad acumulada 48 h	0	2	0	16,28	0,0025
II	Mortalidad acumulada 48 h	0,031	4	22,5		
II	Mortalidad acumulada 48 h	0,063	4	36,25		
II	Mortalidad acumulada 48 h	0,125	4	67,5		
II	Mortalidad acumulada 48 h	0,250	4	87,5		

Trat.	Ranks			
0	1,5	A		
0,031	4,5	A		
0,063	8,5	A	B	
0,125	12,5		B	C
0,25	16,5			C

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

Especies; I: *Culex quinquefasciatus* Say; II: *Chironomus calligraphus* Goeldi

Anexo 7.

Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say a las 24 horas de exposición.

Porcentaje	Percentiles	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
1	-0,1343	0,0185	-0,1759	-0,1020
2	-0,1048	0,0167	-0,1421	-0,0756
3	-0,0861	0,0155	-0,1207	-0,0588
4	-0,0720	0,0147	-0,1046	-0,0462
5	-0,0605	0,0140	-0,0916	-0,0359
6	-0,0508	0,0134	-0,0805	-0,0270
7	-0,0422	0,0129	-0,0708	-0,0193
8	-0,0346	0,0125	-0,0622	-0,0123
9	-0,0276	0,0121	-0,0543	-0,0060
10	-0,0212	0,0118	-0,0471	-0,0001
20	0,0264	0,0096	0,0059	0,0440
30	0,0608	0,0085	0,0431	0,0769
40	0,0901	0,0081	0,0739	0,1059
50	0,1175	0,0081	0,1018	0,1340
60	0,1450	0,0087	0,1287	0,1630
70	0,1743	0,0096	0,1567	0,1949
80	0,2087	0,0112	0,1886	0,2330
90	0,2563	0,0137	0,2320	0,2868
91	0,2627	0,0141	0,2378	0,2940
92	0,2697	0,0145	0,2441	0,3020
93	0,2773	0,0150	0,2510	0,3107
94	0,2859	0,0155	0,2587	0,3204
95	0,2956	0,0161	0,2674	0,3316
96	0,3071	0,0168	0,2777	0,3447
97	0,3212	0,0177	0,2903	0,3608
98	0,3399	0,0189	0,3070	0,3823
99	0,3694	0,0208	0,3332	0,4163

Anexo 8.

Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say a las 48 horas de exposición.

Porcentaje	Percentiles	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
1	-0,1248	0,0155	-0,1597	-0,0977
2	-0,1017	0,0141	-0,1332	-0,0771
3	-0,0871	0,0132	-0,1165	-0,0640
4	-0,0760	0,0125	-0,1039	-0,0541
5	-0,0671	0,0119	-0,0937	-0,0461
6	-0,0595	0,0115	-0,0850	-0,0392
7	-0,0528	0,0111	-0,0774	-0,0331
8	-0,0468	0,0108	-0,0706	-0,0277
9	-0,0414	0,0105	-0,0645	-0,0228
10	-0,0363	0,0102	-0,0588	-0,0182
20	0,0009	0,0084	-0,0171	0,0161
30	0,0277	0,0073	0,0123	0,0414
40	0,0507	0,0068	0,0368	0,0637
50	0,0721	0,0066	0,0591	0,0851
60	0,0936	0,0067	0,0806	0,1073
70	0,1165	0,0073	0,1030	0,1318
80	0,1434	0,0083	0,1283	0,1612
90	0,1806	0,0101	0,1627	0,2028
91	0,1856	0,0104	0,1672	0,2084
92	0,1911	0,0107	0,1722	0,2146
93	0,1970	0,0110	0,1776	0,2214
94	0,2037	0,0114	0,1836	0,2290
95	0,2113	0,0118	0,1905	0,2376
96	0,2203	0,0124	0,1986	0,2478
97	0,2313	0,0130	0,2085	0,2604
98	0,2460	0,0139	0,2216	0,2772
99	0,2690	0,0154	0,2422	0,3036

Anexo 9.

Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) sobre larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi a las 24 horas de exposición.

Porcentaje	Percentiles	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
1	-0,1105	0,0177	-0,1502	-0,0795
2	-0,0809	0,0159	-0,1164	-0,0531
3	-0,0622	0,0147	-0,0950	-0,0363
4	-0,0481	0,0139	-0,0790	-0,0236
5	-0,0367	0,0133	-0,0660	-0,0132
6	-0,0269	0,0127	-0,0550	-0,0043
7	-0,0184	0,0123	-0,0453	0,0035
8	-0,0107	0,0119	-0,0367	0,0105
9	-0,0038	0,0115	-0,0289	0,0169
10	0,0026	0,0112	-0,0217	0,0227
20	0,0503	0,0092	0,0308	0,0673
30	0,0846	0,0083	0,0676	0,1006
40	0,1140	0,0081	0,0979	0,1301
50	0,1414	0,0084	0,1253	0,1587
60	0,1688	0,0091	0,1519	0,1881
70	0,1982	0,0103	0,1795	0,2203
80	0,2325	0,0119	0,2112	0,2586
90	0,2801	0,0146	0,2545	0,3125
91	0,2865	0,0150	0,2602	0,3198
92	0,2935	0,0154	0,2665	0,3278
93	0,3012	0,0158	0,2734	0,3365
94	0,3097	0,0164	0,2810	0,3463
95	0,3195	0,0170	0,2898	0,3575
96	0,3309	0,0177	0,3000	0,3706
97	0,3450	0,0186	0,3126	0,3867
98	0,3637	0,0198	0,3293	0,4083
99	0,3932	0,0217	0,3555	0,4422

Anexo 10.

Resultados de la prueba de Probit expresados como percentiles (concentración letal en mg/L) de Vectobac-WG (*Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*) sobre larvas de *Chironomus calligraphus* Goeldi a las 48 horas de exposición.

Porcentaje	Percentiles	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
1	-0,0917	0,0146	-0,1245	-0,0662
2	-0,0686	0,0132	-0,0981	-0,0456
3	-0,0540	0,0123	-0,0813	-0,0325
4	-0,0430	0,0116	-0,0688	-0,0225
5	-0,0340	0,0111	-0,0586	-0,0144
6	-0,0264	0,0107	-0,0500	-0,0075
7	-0,0197	0,0103	-0,0424	-0,0015
8	-0,0137	0,0100	-0,0356	0,0040
9	-0,0083	0,0097	-0,0295	0,0090
10	-0,0033	0,0094	-0,0239	0,0135
20	0,0340	0,0077	0,0175	0,0481
30	0,0608	0,0069	0,0465	0,0738
40	0,0837	0,0065	0,0706	0,0965
50	0,1052	0,0066	0,0924	0,1185
60	0,1266	0,0070	0,1135	0,1411
70	0,1496	0,0077	0,1355	0,1660
80	0,1764	0,0088	0,1605	0,1957
90	0,2137	0,0108	0,1945	0,2376
91	0,2187	0,0111	0,1991	0,2433
92	0,2241	0,0114	0,2040	0,2495
93	0,2301	0,0118	0,2094	0,2563
94	0,2368	0,0122	0,2154	0,2639
95	0,2444	0,0126	0,2222	0,2726
96	0,2534	0,0132	0,2303	0,2828
97	0,2644	0,0139	0,2401	0,2954
98	0,2790	0,0148	0,2532	0,3122
99	0,3021	0,0163	0,2738	0,3387

Anexo 11.

Fotografías del proceso experimental



Seleccionando y contabilizando larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi para su disposición en las unidades experimentales.



Aislando larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Chironomus calligraphus* Goeldi para su disposición en las unidades experimentales



Preparando las unidades experimentales

Anexo 12.

Ficha técnica de seguridad y toxicidad de Vectobac WG



FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD
Reglamento (UE) 1907/2006 y Reglamento (UE) 453/2010

VECTOBAC WG

10.2 Estabilidad química:

Estable por un mínimo de 2 años, a 20 °C como máximo, bajo las condiciones recomendadas de almacenaje y manipulación en su envase original cerrado. ("Ver Sección 7").

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas:

Ninguna conocida.

10.4 Condiciones que deben evitarse:

Temperaturas altas, luz y humedad. Las sustancias alcalinas inactivan el producto.

10.5 Materiales incompatibles:

Agentes oxidantes.

10.6 Productos de descomposición peligrosos:

Puede emitir humos tóxicos e irritantes en caso de incendio ("Ver Sección 5").

11. Información toxicológica

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos:

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis*, 3000 UTI/mg - Granulado Dispersable en Agua (WG)

Toxicidad aguda:

DL ₅₀ oral - rata	>5000 mg/kg (OECD 401)
DL ₅₀ dermal - conejo	>5000 mg/kg (OECD 402)
CL ₅₀ inhalación - rata, 4 horas	>0.014 mg/l (sólo hocico; concentración máxima alcanzable) (OECD 403)

Iritación de la piel Moderadamente irritante (no irritante en el sentido de la 2001/59/CE) (OECD 404)

Iritación de los ojos Ligeramente irritante (no irritante en el sentido de la 2001/59/CE) (OECD 406)

Sensibilización No sensibilizante (test de Maximización) (OECD 406)

Otra información toxicológica:

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (cepa AM 65-52, Serotipo H-14) - Ingrediente Activo Técnico

Genotoxicidad: no se dispone de métodos validados para microorganismos.

Según los datos disponibles, los criterios de clasificación coinciden en que no precisa ser clasificado para ninguna clase de peligro.

Información sobre las rutas más probables de exposición:

Las rutas más probables de exposición son vía cutánea o por inhalación.

12. Información ecológica

12.1 Toxicidad:

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis*, 3000 UTI/mg - Granulado Dispersable en Agua (WG)

Toxicidad acuática:

Peces

CL₅₀ (96 h) *Oncorhynchus mykiss* >1000 mg/l (OECD 203)

Toxicidad terrestre:

Abejas

DL₅₀ (48 h) *Apis mellifera*, oral: >108.04 µg/abeja (OECD 213)

DL₅₀ (48 h) *Apis mellifera*, contacto: >100 µg/abeja (OECD 214)



VECTOBAC WG

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (cepa AM 85-52, Serotipo H-14) - Ingrediente Activo Técnico

Toxicidad acuática:

CL ₅₀ (96 h) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	>370 mg/l (EPA-860/3-75-009)
CL ₅₀ (96 h) <i>Lepomis macrochirus</i>	>600 mg/l (EPA-860/3-75-009)
CL ₅₀ (10 d) <i>Daphnia magna</i>	>50 mg/l (OPPTS 885-4240)
NOEC (21 d) <i>Daphnia magna</i>	5 mg/l (OECD 211)

Toxicidad terrestre:

Aves

CL ₅₀ (5 d) Codorniz	>3077 mg/kg (FIFRA 154A-16)
CL ₅₀ (5 d) Anade real	>3077 mg/kg (FIFRA 154A-16)

Lombrices

CL ₅₀ (30 d)	>1000 mg/kg suelo seco (OECD 207)
-------------------------	-----------------------------------

Microorganismos del suelo

No se ha observado ni actividad bactericida ni actividad como antibiótico.

12.2 Persistencia y degradabilidad:

Degradación biótica: No aplicable

Degradación abiótica: Se degrada rápidamente en el suelo expuesto a la luz.

12.3 Potencial de bioacumulación:

Bioacumulación: No aplicable; la sustancia no es patógena para los organismos no objetivo y tampoco se ha visto que se reproduzca en los organismos no objetivo.

12.4 Movilidad en el suelo:

Valores de absorción K_{FOC}: no aplicable a sustancias de origen microbiano.

Valores de desabsorción K_{FOC-des}: no aplicable a sustancias de origen microbiano.

Los *Bacillus thuringiensis* se fijan rápidamente a las partículas de arcilla por lo que no son móviles en el suelo.

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB:

No requerido.

12.6 Otros efectos adversos:

No se conocen otros efectos adversos para el medio ambiente.

13. Consideraciones relativas a la eliminación

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos:

No contaminar el agua, piensos, alimentos o semillas en la eliminación. Está prohibido el vertido o la quema libre de este producto o de sus envases.

Debido a que los métodos aceptables de eliminación y los requisitos legales pueden variar según los países, debe contactarse con los organismos oficiales apropiados antes de la eliminación.

En caso de derrame, ver sección 8.

No realizar vertidos de las aguas residuales.

Gestión de envases:

Enjuague energicamente tres veces cada envase que utilice, vertiendo el agua de lavado al equipo de aplicación. Este envase, una vez vacío después de utilizar su contenido, es un residuo peligroso por lo que el usuario está obligado a entregarlo a gestionarlo a través de un gestor de residuos peligrosos debidamente autorizado.

Anexo 12.

Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Mortalidad generada por un preparado comercial de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>Israelensis</i> sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi. (Insecta: Diptera), Ayacucho 2015	¿Cuál es la mortalidad generada por un preparado comercial de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>Israelensis</i> sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi?	Objetivo general Evaluar la mortalidad generada por un preparado comercial de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>Israelensis</i> en cuatro concentraciones crecientes sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi. Objetivo específico a. Determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi sometidos a 4 diferentes concentraciones de Vectobac-WG (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>) b. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de Vectobac-WG sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi.	<i>Bacillus thuringiensis</i> Es una bacteria que tiene la capacidad de sintetizar toxinas. Larvicida biológico: Vectobac-WG Compuesto proteico sintetizado por una bacteria, el <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>Israelensis</i>. Insecto díptera: Simuliidae Las moscas negras es un volador poderoso adaptado para alimentarse de sangre y es una plaga de animales doméstico, silvestre, afectando a todo animal que viva en la intemperie.	La mortalidad generada por un preparado comercial de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>Israelensis</i> (Vectobac-WG) probado en cuatro concentraciones crecientes sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi (Insecta: Diptera), es diferenciada y se incrementa en relación directa a la concentración del bioinsecticida	a. Variable independiente. Preparado comercial de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 var. <i>Israelensis</i> Indicador: Concentración (mg/L) Larvas de insectos Indicador: Especies (<i>Culex quinquefasciatus</i> Say y de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi) b. Variable dependiente Mortalidad de larvas Indicadores: • Mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say y de <i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi. • Concentración letal media (CL₅₀) a las 24 y 48 horas de exposición	INVESTIGACIÓN Básica TIPO DE ESTUDIO Experimental POBLACIÓN Vectobac-WG (Bioinsecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>) MUESTRA 100 g de Vectobac - WG. MUESTREO Aleatorio UNIDAD EXPERIMENTAL Recipientes de plástico conteniendo un litro de agua con diferentes concentraciones de Vectobac -WG..