

Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela

Nereida Delgado Puchi

Instituto de Zootología Agrícola, Facultad de Agronomía, Apdo. 4579. Universidad Central de Venezuela. Maracay, 2101-A. Aragua. Venezuela. E-mail: musiu11@gmail.com

Resumen

DELGADO PUCHI N. 2005. Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. ENTOMOTROPICA 20(3): 213-233.

Se evaluaron en condiciones de laboratorio, la eficacia y persistencia de cuatro formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis*. Las formulaciones fueron: Vectobac-G (0,2 %, Abbott), Vectobac-AS (0,6 %, Abbott), Teknar (1,6 %, Zéneca) y una formulación experimental microencapsulada M-Bti (0,1 %, J. Margalit, Harvard Univ.). La formulación Microencapsulada requirió de las menores CL_{50} y CL_{95} (0,006 y 0,05 ppm, respectivamente), y Vectobac-G requirió la mayor CL_{50} (0,48 ppm) y CL_{95} (4,8 ppm) para larvas de cuarto instar temprano de *An. aquasalis*. Sin embargo el TL_{50} fue menor para Vectobac-G (3,7 h) y la formulación Microencapsulada requirió del mayor TL_{50} (6,7 h). El incremento en la densidad larval y la edad de las larvas redujo la eficacia del M-Bti, mientras que Teknar fue la formulación menos afectada por la densidad larval, la edad de las larvas, el tipo de agua y la radiación solar. Estos resultados sugieren la necesidad de evaluar el efecto de factores extrínsecos e intrínsecos a las formulaciones de Bti, con la finalidad de utilizar aquellas que sean las más eficaces, en función de las características del criadero y de la especie a controlar.

Palabras clave adicionales: Control Biológico, Control de vectores, formulaciones, mosquitos.

Abstract

DELGADO PUCHI N. 2005. Factors affecting the efficiency and persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), a malaria vector in Venezuela. ENTOMOTROPICA 20(3): 213-233.

The efficacy and persistence of four commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against early fourth instar larvae of *Anopheles aquasalis*, were evaluated in laboratory conditions. The formulations were: Vectobac-G (0.2%, Abbott), Vectobac-AS (0.6%, Abbott), Teknar (1.6%, Zéneca) and an experimental microencapsulated formulation M-Bti (0.1%, J. Margalit, Harvard Univ.). The microencapsulated formulation required the smallest LC_{50} and LC_{95} (0.006 and 0.05 ppm, respectively); Vectobac-G required the largest LC_{50} and LC_{95} for fourth instar larvae of *An. aquasalis* (0.48 ppm and 4.8 ppm, respectively). However, LT_{50} was shortest for Vectobac-G (3.7 h) and the longest for M-Bti (6.7 h). Increment of larval density and larval age reduced the M-Bti efficacy. Teknar was the formulation least affected by larval density, larval age, water type, and sunlight radiation. These results suggest the need to evaluate the effect of extrinsic and intrinsic factors on Bti formulations, in order to use those formulations most effective, according to breeding sites characteristics and species to be controlled.

Additional key words: Biological Control, formulations, mosquitoes, vector control.

Introducción

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* serotipo H-14

de Barjac, es altamente específico para larvas de culícidos y simúlidos vectores de enfermedades endémicas como el dengue, la fiebre amarilla, la

malaria y la oncocercosis. La alta especificidad de esta bacteria garantiza la integridad de la fauna de los criaderos, lo cual no siempre sucede con la aplicación de insecticidas químicos.

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* fue aislado por primera vez por Goldberg y Margalit (1977) de sedimento de lagunas, mostrando una considerable actividad larvicida contra especies de mosquitos. Posteriormente, de Barjac (1978), reconoció a este patógeno como un nuevo serotipo (H-14) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). Durante la esporulación, esta bacteria gram-positiva, produce cristales proteicos conocidos como cuerpos paraesporales constituidos por δ -endotoxinas (Margalit 1989). La bacteria, al estar suspendida en el agua es ingerida por la larva durante el proceso de alimentación. En *Anopheles* spp., este proceso se produce casi exclusivamente mediante la filtración de alimentos o partículas suspendidas en la superficie del agua (Jones 1960, Dahl 1988), por lo que la eficacia o el efecto letal de la toxina bacteriana sobre la larva dependerá básicamente de la cantidad de toxina ingerida en un tiempo determinado (WHO 1989).

Estudios sobre el modo de acción de la bacteria, revelan que el órgano de ataque primario es el epitelio del intestino medio, donde los sistemas enzimáticos (proteasas), favorecidos por las condiciones altamente alcalinas, transforman la protoxina en toxina verdadera (Lacey 1985); esto provoca una hipertrofia y alteración de la integridad de la membrana plasmática con la consecuente lisis de las células que conforman el tejido epitelial (Margalit 1989). Estudios histopatológicos demuestran que la acción del Bti provoca inicialmente una hipertrofia de las células del epitelio y vacuolizan el citoplasma; al continuar la patogénesis, se produce la lisis de las células y la desintegración completa de la monocapa epitelial, ruptura de la membrana peritrófica y dispersión del contenido del estómago en el lumen del insecto (Lahkim-Tsrer et al. 1983).

Las inclusiones paraesporales del Bti contienen al menos cuatro proteínas (toxinas) diferentes, denominadas CryIVA, CryIVB, CryIVD y CytA, las cuales poseen toxicidad diferencial sobre varias especies de mosquitos (Gill et al. 1992). Estas toxinas

son activadas por proteasas presentes en el intestino medio (tripsina, quimiotripsina y termolisinas) (Gill 1995), importantes en la digestión del material vegetal y los microorganismos ingeridos por la larva (Jones 1960). Por efecto de la acción de las proteasas, la toxina queda fragmentada en dos partes: un fragmento estructural conformado por la región C-terminal y un fragmento activo constituido por la región N-terminal de la toxina. Este último a su vez, posee dos regiones o dominios ("domain"); el primero tiene que ver con el enlace a la célula receptora y el segundo dominio posee la actividad tóxica (Gill et al. 1992, Gill 1995).

Una vez que la toxina es activada, ésta compete por enlazarse a la proteína receptora de las células columnares que conforman el epitelio del intestino medio. El éxito de enlace, dependerá en gran parte del grado de afinidad y número de receptores presentes en las células. Así, diferentes tipos de toxinas se enlazan con diferentes tipos de receptores. Luego de la inserción, las moléculas de la toxina se oligomerizan en la bicapa lipídica de la membrana; a consecuencia de esto, se forma un poro que permite el paso de iones y pequeñas moléculas, lo cual provoca el desbalance osmótico de las células columnares (Gill et al. 1992, Gill 1995).

Este modelo, explica el modo de acción de bacterias tóxicas a larvas de Lepidoptera, como *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). Por su parte, Chilcott et al. (1990) señalan que muchos procesos del mecanismo de acción del Bti todavía no están claros, pero coinciden con Gill et al. (1992) y Gill (1995), en que debe producirse un enlace inicial de la toxina con la célula receptora, la oligomerización de la toxina en la bicapa lipídica de la membrana y la consecuente formación del poro por el cual se producirá el desbalance osmótico y la muerte posterior de larva.

Además del grado de afinidad de la toxina con los receptores y del número de éstos presentes en el tejido epitelial, la toxicidad de la bacteria depende de la acción sinérgica entre las diferentes toxinas que se encuentran en el cristal (Wu y Chang 1985). Así, la presencia de las cuatro endotoxinas es esencial para la toxicidad de la bacteria, ya que estudios recientes han demostrado que la toxicidad

del cristal intacto es mayor que la suma de la toxicidad de cada toxina actuando individualmente (Tabashink 1992).

La eficacia potencial del Bti depende además de factores ambientales, de factores intrínsecos de la especie a controlar y de la formulación en la cual se presente la bacteria. Dentro de los factores ambientales que afectan la eficacia del Bti están la temperatura (Panbangred et al. 1979, Ignoffo et al. 1981; Wraight et al. 1981), la radiación solar (Mulla 1990, Mulla et al. 1990, Becker et al. 1992) y el pH del agua (Ignoffo et al. 1981, Margalit 1985). Igualmente, el comportamiento alimentario de las larvas puede afectar la eficacia potencial del Bti. Dicho comportamiento varía entre géneros y aún entre especies, encontrándose que la baja acumulación de toxina observada en *Anopheles* con respecto a larvas de los géneros *Culex* y *Aedes*, quizás se deba a otros factores como selección ingestiva, eficacia del filtrado u otras características del comportamiento alimentario (Ramoska y Pacey 1979, Ramoska y Hopkins 1981, Aly 1983, Kawhaled et al. 1988, 1989). Así mismo, el efecto del contenido de materia orgánica, la composición del sedimento y la turbidez, han sido señalados como factores que reducen la eficacia y persistencia del Bti (Ramoska et al. 1982, Van Essen y Hembree 1982, Perich et al. 1989).

Una de las desventajas de la incorporación de insecticidas biológicos para el control de insectos vectores, es la baja persistencia que presentan las formulaciones al ser evaluadas en el campo, probablemente debido a una alta tasa de sedimentación de las partículas tóxicas. La mayoría de las formulaciones desarrolladas se presentan en forma de gránulos, suspensión acuosa o polvo mojable; sin embargo, buena parte de las investigaciones que se realizan actualmente se han orientado hacia el desarrollo y evaluación de nuevas formulaciones con mayor flotabilidad, a fin de mantener por largos períodos el ingrediente activo del Bti en las zonas de alimentación primaria de las larvas (Cheung y Hammock 1985, Aly et al. 1987, Mullen y Hinkle 1988, WHO 1989).

A este respecto, se han tratado de desarrollar formulaciones microencapsuladas que aparentemente aumentarían la eficacia del

Bti sobre larvas del género *Anopheles* (Margalit et al. 1984); sin embargo Mulla (1990) señala que se necesitan muchos estudios de laboratorio y campo a fin de obtener la información necesaria para mejorar y optimizar dichas formulaciones y obtener un alto nivel de actividad contra este género.

A nivel mundial el Bti ha sido utilizado con muy buenos resultados en Asia, África, Europa y Estados Unidos para controlar poblaciones de culícidos de importancia médica, pero es en las últimas décadas que algunos países de Centro y Sur América han comenzado a realizar investigaciones de este tipo, como México, Colombia, Brasil y Perú. En Venezuela, las primeras evaluaciones de Bti sobre Culicidae fueron realizadas por Molina (1985), Saume (1986) y Saume y Hernández (1990). Posteriormente Delgado et al. (1998), realizaron evaluaciones en condiciones de campo. Más recientemente, Gómez (2001) y Herrera et al. (2003), evaluaron el efecto de la salinidad sobre la eficacia del Bti contra *An. aquasalis* en condiciones de laboratorio. Sin embargo, otras variables que pueden afectar la eficacia y persistencia de estas formulaciones no han sido evaluadas, tales como edad de las larvas, densidad larval, tipo de agua, radiación solar, tiempo de preparación de las soluciones, etc., En vista de ello, en el presente trabajo se presentan los resultados de la evaluación en condiciones de laboratorio, del efecto de las variables antes mencionadas sobre la efectividad de tres formulaciones comerciales de Bti (granulada y suspensión acuosa) y de una formulación microencapsulada experimental, contra *An. aquasalis*, principal vector de malaria en el estado Sucre (Venezuela).

Materiales y Métodos

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio para Estudios sobre Malaria, adscrito al Instituto de Altos Estudios en Salud (MSDS), en Maracay, estado Aragua. Las condiciones ambientales para la cría de larvas y para todos los bioensayos fueron: $30,2 \pm 2,5$ °C, $75,0 \pm 10,0$ % HR y fotoperíodo de 12:12 h.

Se utilizaron larvas de *An. aquasalis* de 4to instar temprano (entre 0 - 16 h después de la muda), las cuales se obtuvieron de la cría de progenie

de hembras capturadas en el campo (Caño Rico, adyacente al Lago de Valencia, a 30 km de la ciudad de Maracay). Para la cría de larvas y la preparación de las soluciones se utilizó agua de tubería reposada en estanques, ya que con agua destilada se obtuvieron altos valores de mortalidad durante la cría de *An. aquasalis* (Delgado 1998); el alimento suministrado fue una mezcla de Ictiosan® (alimento para peces, 55,0 %), levadura (15,0 %), avena (7,5 %), germen de trigo (7,5 %) e hígado molido (15,0 %) (J González, com pers).

Las formulaciones evaluadas fueron: Microencapsulado Experimental al 0,1% (J. Margalit y E. Zomer, Escuela de Salud Pública - Universidad de Harvard), Vectobac-G (granulado, al 0,2%) (Abbott), Vectobac-AS (suspensión acuosa al 0,6%) (Abbott) y Teknar (suspensión acuosa, al 1,6 %) (Zéneca). La formulación Vectobac-AS no se evaluó en todos los bioensayos debido a que para el momento en que éstos se realizaron, no se disponía aún del producto.

Estimación de las CL_{50} y CL_{95} . Se realizaron diluciones seriadas para obtener un mínimo de cinco concentraciones por producto, a fin de garantizar al menos dos concentraciones por encima y dos por debajo de la CL_{50} . Se prepararon cuatro repeticiones por concentración, por producto, con sus respectivos controles; se emplearon vasos plásticos de 500 ml, colocándose en cada uno 25 larvas de temprano 4to instar, en un volumen final de solución de 100 ml. La mortalidad fue observada a las 24 y 48 h de exposición, la cual fue corregida con la mortalidad del control en los casos en que ésta excedió del 5 %, según la fórmula de Abbott (1925):

% Mortalidad corregida = $(X - Y / X) \times 100$, donde

X = Porcentaje de larvas vivas en el control

Y = Porcentaje de larvas vivas en el tratamiento.

Este bioensayo se repitió en tres ocasiones diferentes, con intervalo de un mes entre cada uno a fin de corregir las posibles variaciones que por efecto de la manipulación y el método de cría de larvas, se pudieran producir (Mulla 1990). Los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron sometidos al análisis Probit (Finney 1971), utilizando el Probit

Analysis Program (Raymond 1985). Se calculó la relación CL_{95}/CL_{50} , a fin de conocer cuántas veces es necesario incrementar la CL_{50} para obtener la CL_{95} , lo cual se utiliza como un indicativo de la eficiencia de la formulación sobre la especie a evaluar (Lacey y Singer 1982).

Los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron transformados a arcoseno ($\sqrt{\text{mortalidad}/100}$) a fin de normalizar los datos y aplicar las pruebas estadísticas paramétricas correspondientes. Para verificar la normalidad de los datos transformados, se aplicó la prueba de Wilk y Shapiro mediante el paquete estadístico Statistix a un nivel de confiabilidad del 5 % (Steel y Torrie 1960).

Estimación de los TL_{50} y TL_{95} . Se aplicó la CL_{95} estimada previamente para cada formulación, colocándose 25 larvas de temprano 4to instar en 100 ml de solución. Cada tratamiento se repitió por cuadruplicado más el respectivo control, observándose el porcentaje de mortalidad después de 1, 3, 5, 15, 20 y 24 h de exposición. Los tiempos letales 50 y 95 fueron calculados a partir de la regresión: log tiempo exposición - % mortalidad; la significancia de dicha regresión se determinó mediante la prueba de Ji-Cuadrado ($P < 0,05$), siguiendo el método del análisis Probit utilizado previamente a través del Probit Analysis Program (Finney 1971, Raymond 1985).

En los bioensayos siguientes, se utilizó la CL_{95} de cada formulación y se aplicó el mismo diseño experimental señalado anteriormente: 25 larvas de temprano 4to instar (0-16 h de edad) en 100 ml de solución, cuatro repeticiones por tratamiento más el respectivo control. Se aplicó alimento en todos los bioensayos.

Efecto de la interrupción en el tiempo de exposición sobre la eficacia. Larvas de temprano 4to instar fueron mantenidas en solución con dosis igual a la CL_{95} de cada producto durante 1, 3 y 5 horas. Transcurrido este tiempo, las larvas sobrevivientes fueron colocadas cuidadosamente en un tul y lavadas con agua destilada, para posteriormente ser colocadas en envases con 100 ml de agua de estanque más alimento. Se observó mortalidad a las 24 y 48 h de ser colocadas en agua limpia. Para determinar diferencias en la sobrevivencia por efecto de diferentes tiempos de

exposición, se realizó un ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan a un nivel de significancia del 5 % (Sokal y Rohlf 1979, Steel y Torrie 1960), mediante el paquete estadístico Statistix 7 for Windows (Analytical Software 2000).

Efecto de la duración del 4to. instar sobre la eficacia. Se evaluó la eficacia del Microencapsulado, Vectobac-G y Teknar, sobre larvas de temprano 4to instar (edad entre 0 y 16 horas) y sobre larvas de 4to instar tardío (edad entre 20 y 30 horas después de la muda). Se establecieron cuatro repeticiones por edad, por formulación más el control, estimándose el porcentaje de mortalidad a las 24 y 48 h post-tratamiento. Para determinar el efecto de la edad de las larvas sobre la eficacia de cada formulación se aplicó una Prueba t de Student por formulación, por tiempo de exposición, con un nivel de significancia del 5 % (Sokal y Rohlf, 1979).

Actividad larvicida en el tiempo (persistencia) en condiciones de laboratorio. Se evaluó la persistencia del Microencapsulado, Vectobac-G y Teknar. Se prepararon dos tipos de soluciones: Una filtrada 1 h después de preparada (solución A) y otra que se mantuvo sin filtrar durante el período de reposo correspondiente (solución B). Es importante aclarar que en los demás bioensayos las soluciones siempre fueron preparadas al momento y agitadas fuertemente durante 5 min, pero no filtradas. Se estimó, a las 24 h post-tratamiento, el porcentaje de mortalidad obtenido con soluciones mantenidas en reposo durante 0, 1, 2, 5, 15 días. Estos valores fueron transformados a $\arcseno(\sqrt{p})$ y analizados mediante una ANOVA de tres vías. Se aplicó la prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan con un nivel de significancia del 5 % (Sokal y Rohlf 1979).

Efecto de la presencia de alimento sobre la eficacia. Por cada formulación (Microencapsulado, Vectobac-G y Teknar), y a la CL_{50} y CL_{95} , se prepararon ocho envases, cada uno con 20 larvas de temprano 4^{to} instar y 100 ml de solución. Cuatro de las ocho repeticiones no recibieron alimento. Se prepararon ocho grupos testigo (sin Bti), cuatro con alimento y cuatro sin alimento. Se determinó el porcentaje de mortalidad a las 0,5, 1, 3, 5, 10, 15 y 24 h postratamiento. Se estimó el efecto

de la presencia de alimento sobre los TL_{50} por concentración. La determinación de los tiempos letales se realizó mediante el análisis de regresión Log Tiempo - % mortalidad, utilizando el Probit Analysis Program (Raymond 1985). Las diferencias entre los Tiempos Letales se consideraron como significativas en los casos en los que no se observó solapamiento entre los Límites de Confianza calculados al 95 % (Lacey y Singer 1982).

Efecto de la variación en la densidad de las larvas sobre la eficacia. Las formulaciones evaluadas fueron Microencapsulado, Vectobac-G, Vectobac-AS y Teknar. La estimación de las CL_{50} y CL_{95} se realizó en función de 20 larvas por envase, en una superficie de 95,0 cm², es decir, utilizando una densidad de 0,21 larvas/cm². En este ensayo se emplearon por formulación, 20, 25, 30, 40 y 50 larvas por envase, a fin de obtener densidades entre 0,21 y 0,53 larvas/cm². La mortalidad fue observada a las 24 y 48 h post-tratamiento. El efecto de la densidad de las larvas sobre la eficacia por producto, se estimó mediante un ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan a un nivel de confiabilidad del 95 % (Sokal y Rohlf 1979).

Efecto del tipo de agua sobre la eficacia. Los tipos de agua utilizados fueron: destilada, tubería, estanque y de criadero (Caño Rico, estado Aragua), a los cuales se les realizó un análisis físico-químico: salinidad, pH, CO₂, alcalinidad, dureza total y oxígeno disuelto (Kit Standard La Motte, La Motte Chemical Products Company, Chestertown-Maryland). Para realizar los bioensayos, se utilizaron dos concentraciones por formulación (CL_{50} y CL_{95}), determinándose la mortalidad a las 24 h. Se aplicó un análisis factorial 3×4×2, y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (P<0,05) para establecer las diferencias entre medias. (Steel y Tome 1960, Sokal y Rohlf 1979).

Efecto de la radiación solar sobre la eficacia. Se evaluó el efecto de la radiación solar sobre la eficacia del Microencapsulado, Vectobac-G y Teknar, a la CL_{50} y CL_{95} . Un grupo se mantuvo expuesto a la radiación solar durante 3 h (9:00 a 11:00 am) al igual que los testigos (sin Bti); otro grupo se mantuvo a la sombra por igual período de

tiempo. La temperatura del agua fue estimada antes y después del tiempo de exposición al sol. Luego de este período, todos los envases fueron trasladados al laboratorio, determinándose el porcentaje de mortalidad 24 h después de suspendida la exposición. Para establecer el efecto de la radiación sobre la eficacia, se aplicó por formulación y por concentración, una ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan a un nivel de confiabilidad del 95 % (Sokal y Rohlf 1979).

Resultados y Discusión

Estimación de las CL_{50} y CL_{95} . Los resultados del Análisis Probit muestran que el Microencapsulado requirió de las menores CL_{50} y CL_{95} (0,006 y 0,05 ppm respectivamente), mientras que con Vectobac-G se requirieron las mayores CL_{50} y CL_{95} (0,48 y 4,8 ppm) (Cuadro 1). Al analizar las pendientes de las rectas de regresión log concentración-unidades probit (Prueba de Paralelismo, Raymond 1985), no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes obtenidas para el Microencapsulado ($2,02 \pm 0,15$) y Vectobac-AS ($1,87 \pm 0,19$) ($P > 0,05$). Sin embargo, estas pendientes fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) que las estimadas para Vectobac-G ($1,55 \pm 0,11$) y Teknar ($1,37 \pm 0,10$). Esto indica que las larvas tratadas con Microencapsulado y Vectobac-AS presentaron una respuesta más homogénea al larvicida que se traduce en una mayor eficiencia, ya que para alcanzar el 95 % de mortalidad es necesario incrementar la CL_{50} 6,7 y 7,7 veces respectivamente (Cuadro 1). Mientras que con Vectobac-G y Teknar este mismo nivel de mortalidad se puede alcanzar aumentando la CL_{50} 10,0 y 16,0 veces respectivamente (Cuadro 1).

Molina (1985) al evaluar Vectobac-G sobre larvas de 4to instar de *Ae. aegypti* determinó menores CL_{50} y CL_{95} (0,38 y 1,05 ppm respectivamente) que las estimadas en este trabajo para *An. aquasalis*. Estos resultados concuerdan con los señalados por de Barjac y Coz (1979), Tyrell et al. (1979), Mulla et al. (1980) y Aly et al. (1988); estos últimos concluyen que las larvas de *Anopheles* sp. necesitan dosis de Bti 30 ó 40 veces más altas que las suministradas a *Culex* o *Aedes* debido a que la zona de alimentación primaria de *Anopheles* se encuentra básicamente en

la superficie del agua, mientras que *Culex* y *Aedes* se alimentan en toda la columna de agua.

Estimación de los Tiempos Letales. Debido a que la concentración utilizada en este bioensayo fue la CL_{95} de cada formulación, a las 24 h de exposición el porcentaje de mortalidad provocado por cada una, se corresponde con el nivel esperado (95 %) (Cuadro 2). Los resultados de la regresión lineal tiempo de exposición - % mortalidad, indicaron que bajo las condiciones del bioensayo descritas y a una concentración igual a la CL_{95} , el Microencapsulado y Vectobac-AS producen el 50% de mortalidad a las 6,7 y 7,2 h de exposición continua, mientras que el TL_{50} de Vectobac-G y Teknar fue de 3,7 y 4,2 h respectivamente. Ambos valores fueron menores que los estimados para Microencapsulado y Vectobac-AS (Cuadro 2).

Efecto de la interrupción en el tiempo de exposición sobre la eficacia. Mediante este ensayo, se pretendió simular el efecto de la disminución de la concentración de bacteria o de la eliminación total de ésta, poco tiempo después de haber sido aplicado el producto, lo cual pudiera ser causado en condiciones naturales por alguna variable ambiental, como la lluvia. Así, en el Cuadro 3 se presentan, el número promedio de larvas sobrevivientes después de 1, 3 y 5 h de exposición continua y el porcentaje de estas larvas que murieron 24 h después de ser retiradas del tratamiento con Bti. A pesar que después de 1 h de exposición el 100 % de las larvas sobrevivieron a los cuatro productos, se observó mortalidad en éstas, 24 h después de haber sido colocadas en agua limpia. Después de 1 h de exposición a la CL_{95} de Vectobac-G y Teknar, se observó $51,7 \pm 2,9$ y $55,0 \pm 8,1$ % de mortalidad respectivamente, 24 h después de haber sido suspendido el tratamiento (Cuadro 3); este mismo tiempo de exposición al Microencapsulado y Vectobac-AS produjo una menor mortalidad ($25,0 \pm 13,2$ % y $30,0 \pm 8,6$ % ; $P < 0,05$).

Después de 3 h de exposición, el número de larvas sobrevivientes a Vectobac-G ($13,0 \pm 1,7$) y Teknar ($12,7 \pm 1,2$) fue similar y menor al número de larvas que sobrevivieron al Microencapsulado ($15,7 \pm 0,6$) y Vectobac-AS ($19,0 \pm 1,0$) ($P < 0,05$), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el para estimar tiempos letales. A pesar de que a las 3 h

Cuadro 1. Análisis Probit para cuatro formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* evaluadas sobre larvas de cuarto instar temprano de *Anopheles aquasalis* (Finney 1971, Raymond 1985).

Parámetros	Formulación			
	Microencapsulado	Vectobac-AS	Vectobac-G	Teknar
Pendiente ± D.S. *	2,02 ± 0,15 a	1,87 ± 0,19 a	1,55 ± 0,11 b	1,37 ± 0,10 b
CL ₅₀ (ppm)	0,006	0,013	0,48	0,10
Lím. Conf. 95 %	0,005 – 0,007	0,011 – 0,014	0,41 – 0,54	0,07 – 0,11
CL ₉₅ (ppm)	0,05	0,10	4,80	1,60
Lím. Conf. 95 %	0,03 – 0,06	0,08 – 0,13	4,10 – 8,10	1,00 – 2,10
Eficiencia (CL ₉₅ /CL ₅₀)	6,7	7,7	10,0	16,0

* Pendientes con letras iguales no difieren significativamente (P>0,05). Prueba de Paralelismo (Raymond 1985).

Cuadro 2. Estimación de los Tiempos Letales para cuatro formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* evaluadas sobre larvas de cuarto instar temprano de *Anopheles aquasalis*. Concentración equivalente a la CL₉₅ de cada formulación (Finney 1971, Raymond 1985).

Parámetros	Formulación			
	Microencapsulado	Vectobac-AS	Vectobac-G	Teknar
Pendiente ± D.S. *	2,63 ± 0,12 b	3,03 ± 0,14 a	1,83 ± 0,13 c	2,61 ± 0,07 b
TL ₅₀ (h)	6,7	7,2	3,7	4,1
Lím. Conf. 95 %	6,1 – 7,2	6,6 – 7,6	3,1 – 4,2	3,6 – 4,6
TL ₉₅ (h)	28,1	25,1	29,1	17,5
Lím. Conf. 95 %	24,7 – 32,6	22,4 – 28,6	23,9 – 37,5	14,3 – 22,7
Eficiencia (CL ₉₅ /CL ₅₀)	4,2	3,5	8,0	4,3

* Pendientes con letras iguales no difieren significativamente (P>0,05). Prueba de Paralelismo (Raymond 1985).

de exposición no hubo diferencias en el número de larvas que sobrevivieron al tratamiento con Vectobac-G y Teknar (Cuadro 3), 24 h después de ser retiradas del tratamiento se observó un mayor porcentaje de mortalidad en larvas tratadas con Teknar (98,3 ± 2,9 %) con respecto a la mortalidad de larvas tratadas con Vectobac-G (85,0 ± 0,0 %) (P<0,05). El porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con Microencapsulado fue 66,7 %, lo cual evidencia aún más su baja efectividad con respecto a las otras dos formulaciones, ya que este porcentaje fue calculado en base a un mayor número de larvas sobrevivientes (Cuadro 3). Con respecto a Vectobac-

AS, no se observaron diferencias en el número de larvas que sobrevivieron a 1 ó 3 h de exposición; sin embargo, a las 24 h después de suspendido el tratamiento, el porcentaje de mortalidad fue mayor en las larvas expuestas al Bti durante 3 h (Cuadro 3).

A las 5 h de exposición, el promedio de larvas sobrevivientes al tratamiento con Teknar y Vectobac-G (6,3 ± 1,2 y 6,3 ± 2,1) fue significativamente menor al número de larvas que sobrevivieron al tratamiento con Microencapsulado (13,0 ± 1,7) y Vectobac-AS (13,0 ± 1,7 ; P<0,05); observándose, a las 24 h, 100 % de mortalidad

Cuadro 3. Efecto de la interrupción en el tiempo de exposición de cuatro formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de cuarto instar temprano de *Anopheles aquasalis*. CL₉₅ de cada formulación.

Tiempo Máximo de Exposición (h)	Formulación	Larvas sobrevivientes (Total=20/repetición)	Mortalidad (%)	
			Instantánea	24 h
1.0	Microencapsulado	20,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 d	25,0 ± 13,2 f
	Vectobac-G	20,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 d	51,7 ± 2,9 e
	Vectobac-AS	20,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 d	30,0 ± 8,6 f
	Teknar	20,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 d	55,0 ± 8,1 e
	Control	20,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 g
3.0	Microencapsulado	15,7 ± 0,6 b	23,3 ± 2,9 c	66,7 ± 16,1 d
	Vectobac-G	13,0 ± 1,7 c	35,0 ± 8,7 b	85,0 ± 0,0 c
	Vectobac-AS	19,0 ± 1,0 a	5,0 ± 5,0 d	58,3 ± 15,3 de
	Teknar	12,7 ± 1,2 c	36,7 ± 5,8 b	98,3 ± 2,9 a
	Control	20,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 d	1,7 ± 2,9 g
5.0	Microencapsulado	13,0 ± 1,7 c	35,0 ± 8,9 b	66,7 ± 15,3 de
	Vectobac-G	6,3 ± 1,2 d	68,3 ± 5,6 a	100,0 ± 0,0 a
	Vectobac-AS	13,0 ± 1,7 c	35,0 ± 8,7 b	91,7 ± 7,6 b
	Teknar	6,3 ± 2,1 d	68,3 ± 10,4 a	98,3 ± 2,9 a
	Control	20,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 g

Promedios ± D.S. con base a cuatro repeticiones, por formulación y tiempo de exposición. Valores dentro de cada columna con letras iguales, no difieren significativamente. (P>0,05). Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan).

en las larvas tratadas con Vectobac-G y 98,3 % de mortalidad en las tratadas con Teknar. El tratamiento con Microencapsulado provocó 66,7 ± 15,3 % de mortalidad a las 24 h. La sobrevivencia de larvas tratadas con Vectobac-AS fue similar a la observada con el Microencapsulado ; sin embargo, el porcentaje de mortalidad observado a las 24 h en larvas expuestas durante 5 h fue mayor que el provocado por el Microencapsulado (98,3 ± 2,9) (Cuadro 3).

Como puede observarse, Teknar y Vectobac-G a la CL₉₅ requirieron un máximo de 3 h de exposición continua para provocar posteriormente más de 80 %, mientras que larvas tratadas con Microencapsulado o Vectobac-AS necesitaron un mayor tiempo de exposición continua para lograr altos porcentajes de mortalidad. Esta información es de gran utilidad para fines prácticos, ya que es importante conocer qué tan rápido puede actuar una formulación al ser aplicada en el campo, sobre todo si se sabe que el o los criaderos pudieran ser inestables. Por otra parte, Aly et al. (1988), señalan que la tasa de ingestión juega un importante papel en

la actividad y efectividad de las toxinas estomacales, añadiendo además, que existen mecanismos de defensa en los organismos atacados que eliminan una cierta cantidad de toxina por unidad de tiempo y mecanismos de autobalance que reparan cierta cantidad de efectos dañinos por unidad de tiempo. Así, una dosis de toxina dada (peso/larva), puede ser letal si es ingerida rápidamente, pero ser subletal si es dividida en pequeñas cantidades al ser ingerida en un período de tiempo más largo. Con base a los resultados de este ensayo, podemos afirmar que más del 80 % de las larvas tratadas con Vectobac-G y/o Teknar tuvieron una mayor tasa de ingestión de toxina que las tratadas con Vectobac-As y/o Microencapsulado.

Efecto de la duración del 4to instar sobre la eficacia. En el cuadro 4 se presentan los porcentajes de mortalidad promedio de larvas de 4to instar temprano (0-16 h) y tardío (20-30 h), obtenidos después de 24 y 48 h de exposición continua a tres formulaciones de Bti (Microencapsulado, Vectobac-G y Teknar). En ensayos previos, se determinó que este instar es el más prolongado de

Cuadro 4. Efecto de la duración del 4to instar de *Anopheles aquasalis* sobre la eficacia de tres formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Formulación	Edad	Mortalidad (%) ¹	
	(horas)	24 h	48 h
Microencapsulado	0-16	90,0 ± 8,2 **	100,0 ± 0,0 **
	20-30	66,3 ± 4,5	81,3 ± 4,8
Vectobac-G	0-16	95,0 ± 5,0 **	100,0 ± 0,0 **
	20-30	50,0 ± 13,2	93,3 ± 5,8
Teknar	0-16	97,3 ± 2,6 **	100,0 ± 0,0 **
	20-30	73,3 ± 5,8	96,7 ± 2,9
Control	0-16	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	20-30	1,3 ± 2,8	1,3 ± 2,8

¹Promedios ± D:S con base a cuatro repeticiones por tratamiento

**Diferencias altamente significativas entre edades (P<0,01), Student t Test (Sokal and Rolhf 1979).

todos, (3,8 ± 0,9 días a 30,0 ± 2,5 °C) (Delgado 1998), observándose que el período de pre-pupa debe ser bastante corto ya que las larvas siguen alimentándose pocos minutos antes de pupar, lo cual asegura que el período de exposición a la bacteria no va a estar afectado por un prolongado período de pre-pupa.

Debido a que la concentración utilizada fue la CL₉₅ de cada formulación, los porcentajes de mortalidad observados en larvas de temprano 4to instar (0-16 h) se corresponden con los esperados para esa concentración. A las 24 h de exposición en larvas de 20-30 horas, se observó una reducción altamente significativa en la mortalidad (P<0,01) en los tres productos utilizados, con respecto a la mortalidad en larvas de 0-16 h, bajando hasta el 66,3 ± 4,5 % en el caso de Microencapsulado, 50,0 ± 13,2 % para Vectobac-G y 73,3 ± 5,8 % con Teknar (Cuadro 4). A las 48 h, los porcentajes de mortalidad observados en larvas de 20-30 h son los esperados para la concentración utilizada (alrededor del 95 %), salvo el obtenido con el Microencapsulado (81,3 ± 4,8%), el cual se mantuvo significativamente inferior al observado en larvas de 0 - 16 horas (100,0 ± 0,0 %). Esto indica que las larvas más jóvenes ingieren las partículas del agua a una velocidad mayor que las larvas de 20-30 horas, ya que a las 24 h de exposición se puede observar aproximadamente el 95 % de mortalidad en larvas

de temprano 4to instar, mientras que para obtener este nivel de mortalidad en larvas de 4to instar tardío se necesitan 48 h de exposición continua.

El efecto del instar sobre la eficacia del Bti ha sido señalado por otros autores, encontrándose siempre una relación inversa entre la edad y la susceptibilidad de las larvas de culícidos al Bti. Igual relación ha sido señalada también para *Bacillus sphaericus* Neide (Panbangred et al. 1979, Wraight et al. 1981, Mian y Mulla 1983, Gharib y Hilsenoff, 1988). Rashed y Mulla (1989) determinaron que existen diferencias en la velocidad de ingestión de partículas entre larvas de 1er y 4to instar de *An. albimanus* Wiedemann, y aseguran que la alta tasa de ingestión de los instares jóvenes probablemente contribuye a que los primeros instares larvarios presenten una mayor susceptibilidad a toxinas de bacterias estomacales. Mediante este ensayo se evidencia que se pueden producir diferentes niveles de mortalidad aun en individuos del mismo instar, lo cual podría explicar la alta variabilidad observada en algunas ocasiones, en los promedios de los porcentajes de mortalidad de los bioensayos realizados. De allí la necesidad de asegurar utilizar larvas de 4to instar temprano y no una mezcla de ella, al momento de realizar bioensayos de evaluación de susceptibilidad a larvicidas que actúen por ingestión.

Actividad larvicida en el tiempo (persistencia) en condiciones de laboratorio. En el Cuadro 5,

Cuadro 5. Actividad larvicida de tres formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis*. Soluciones filtradas y no filtradas a la CL₉₅ de cada formulación.

Formulación	Solución *	Mortalidad (%) ± D.S				
		Tiempo de Reposo de la Solución (días)				
		0	1	2	5	15
Microencapsulado	SF	86,3 ± 4,8 b	30,0 ± 9,1 f	47,5 ± 5,0 e	47,5 ± 5,0 e	100,0 ± 0,0 a
	F	86,3 ± 4,8 b	31,3 ± 6,3 f	46,3 ± 11,0 e	12,5 ± 3,2 g	28,8 ± 3,3 f
Vectobac-G	SF	96,3 ± 4,8 a	100,0 ± 0,0 a	97,5 ± 2,8 a	97,5 ± 2,8 a	97,5 ± 5,0 a
	F	93,8 ± 5,8 ab	83,8 ± 2,5 b	82,5 ± 8,7 b	92,5 ± 6,1 ab	68,8 ± 8,5 d
Teknar	SF	90,0 ± 6,0 b	96,3 ± 4,8 a	91,3 ± 8,5 ab	91,5 ± 8,5 ab	78,5 ± 5,8 bc
	F	87,5 ± 2,9 b	85,7 ± 6,5 b	72,5 ± 8,7 cd	73,8 ± 3,2 c	73,8 ± 2,5 c

* SF=Sin Filtrar; F=Filtrada. Promedios calculados con base a 6 repeticiones por formulación y tratamiento. Promedios con letras iguales no difieren significativamente. Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan (P>0,05).

se observan los porcentajes de mortalidad a las 24 h de exposición de larvas tratadas con la CL₉₅ de tres formulaciones de Bti filtradas y no filtradas y mantenidas en reposo durante 0, 1, 2, 5 y 15 días. La mortalidad producida por el Microencapsulado se redujo significativamente en soluciones filtradas y no filtradas con 1, 2 y 5 días de reposo, observándose una tendencia similar y totalmente irregular en ambos tratamientos (Cuadro 5).

En el tratamiento con Vectobac-G y Teknar, se observó una reducción significativa en la mortalidad por efecto del tiempo y del filtrado, aunque este efecto fue mayor en Teknar que en Vectobac-G. En el tratamiento con Vectobac-G el tiempo de reposo de la solución no afectó la eficacia de la solución no filtrada, ya que no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad. Las soluciones no filtradas de Teknar produjeron altos e iguales valores de mortalidad que los observados para Vectobac-G, con soluciones de 0 hasta 5 días (90,0 – 96,3 %);

La tendencia en la respuesta de larvas tratadas con soluciones no filtradas del Microencapsulado fue diferente a la observada con Vectobac-G y Teknar. Soluciones de 1, 2 y 5 días provocaron porcentajes de mortalidad significativamente menores (entre 30,0 y 47,5 %), que los obtenidos con soluciones de Vectobac-G y Teknar del mismo tiempo de preparación (Cuadro 5).

En soluciones filtradas, Vectobac-G fue la formulación más estable y persistente. El efecto del filtrado se evidenció más drásticamente en la formulación microencapsulada, ya que los porcentajes de mortalidad obtenidos con este tratamiento fueron siempre menores que los observados con las soluciones filtradas de Vectobac-G y Teknar. Es importante destacar además, que independientemente del filtrado, la formulación microencapsulada presentó una baja efectividad a las 24 y 48 h después de preparada, en comparación con la eficacia de Vectobac-G y Teknar (Cuadro 5), lo cual podría sugerir que la tasa de liberación de la bacteria en esta formulación es rápida inicialmente (86,3 % de mortalidad con soluciones de 0 días de reposo), pero su efectividad decae luego de las primeras 48 h después de preparada la solución.

Un aspecto que pudo afectar la persistencia del Microencapsulado, fue el método de preparación de las soluciones. Estas fueron agitadas fuertemente durante 5 min y luego mantenidas en reposo hasta el momento del ensayo. Guillet et al. (1985), han demostrado que el uso de agitadores para preparar suspensiones acuosas de Bti puede reducir la toxicidad del mismo, lo cual había sido señalado previamente por Undeen y Lacey (1982). Los resultados de Guillet et al. (1985) indican la necesidad de evitar métodos de mezcla que produzcan impacto mecánico entre los cristales de Bti. Aparentemente, el principal factor responsable

Cuadro 6. Efecto de la presencia de alimento sobre la eficacia de tres formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis* (CL₉₅ y CL₅₀ de cada formulación). N=4 repeticiones por tratamiento

Formulación	Concentración Letal (ppm)	Tratamiento	Mortalidad Acumulada (%)					
			Tiempo (horas)					
			0,5	1,0	3,0	5,0	10,0	24,0
CL₉₅								
		C/A	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	20,0 ± 5,0 b	36,4 ± 5,2 c	60,0 ± 5,0 d	93,8 ± 3,0 f
Microencapsulado	0,05	S/A	3,3 ± 2,9 a	3,3 ± 2,9 a	76,7 ± 5,8 de	78,5 ± 3,2 e	85,9 ± 2,9 f	100,0 ± 0,0 g
		C/A	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 2,9 a	31,7 ± 2,9 c	64,5 ± 2,9 d	75,7 ± 6,1 de	100,0 ± 0,0 g
Vectobac-G	4,80	S/A	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 2,9 a	95,0 ± 0,0	95,0 ± 0,0 g	98,2 ± 2,9 g	100,0 ± 0,0 g
		C/A	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	1,7 ± 2,9 a	68,5 ± 5,1 d	77,5 ± 6,0 de	96,7 ± 3,1 g
Teknar	1,6	S/A	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 2,9 a	90,0 ± 5,0 f	92,3 ± 3,9 f	95,0 ± 5,0 g	100,0 ± 0,0 g
CL₅₀								
		C/A	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	1,7 ± 2,9 a	3,3 ± 2,5 a	10,0 ± 2,9 b	53,3 ± 1,5 fg
Microencapsulado	0,006	S/A	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 3,8 a	9,0 ± 2,9 b	25,3 ± 3,5 d	70,0 ± 5,0
		C/A	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	5,0 ± 2,9 ab	10,0 ± 0,0 b	19,0 ± 2,9 c	47,7 ± 5,2 f
Vectobac-G	0,48	S/A	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 2,9 a	28,3 ± 7,4	33,0 ± 3,1 e	46,0 ± 5,0 f	81,1 ± 8,8 h
		C/A	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	5,0 ± 2,9 ab	18,3 ± 3,1 c	56,3 ± 2,5 g
Teknar	0,10	S/A	1,7 ± 2,9 a	3,3 ± 2,9 a	21,7 ± 7,6 c	30,5 ± 3,1 e	45,0 ± 5,0 f	86,7 ± 2,9 h

C/A=Con Alimento; S/A= Sin Alimento. Mortalidad en el Control a las 24 h : C/A= 0,0 ± 0,0 %; S/A: 2,3 ± 2,9 % . Promedios dentro de cada CL, seguidos de letras iguales, no difieren significativamente. Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan (P>0,05).

de la pérdida de actividad larvicida pudiera ser la activación, por efecto de una fuerte agitación, de proteasas presentes en la formulación las cuales degradarían la toxina.

En consecuencia, se podría afirmar que la gran inestabilidad observada en la formulación microencapsulada se debe básicamente defectos en la formulación misma; esta respuesta fluctuante en la persistencia del Microencapsulado, es la respuesta típica de una formulación experimental, lo cual debería servir de base para el posterior mejoramiento de la misma.

Efecto de la presencia de alimento sobre la eficacia. En todos los bioensayos realizados, se suministró alimento a las larvas a fin de asegurar que la bacteria sea ingerida a pesar de la presencia de otro tipo de partículas en la solución, tal y como sucede en forma natural en los criaderos. En este ensayo, la velocidad de acción de todas las formulaciones a la CL₉₅, fue mayor en soluciones sin alimento (Cuadro 6). Es decir, a las tres horas

de exposición, el porcentaje de mortalidad en larvas tratadas con la CL₉₅ de cada formulación de Bti mantenidas sin alimento fue superior al 75 %, mientras que en larvas tratadas con Bti más alimento, la mortalidad a las 3 h de exposición osciló entre 20 y 52 % para las tres formulaciones (Cuadro 6).

A bajas concentraciones (CL₅₀ de cada formulación), la ausencia de alimento también aumentó la eficacia, observándose mayor mortalidad en larvas tratadas con Bti mantenidas sin alimento. (Cuadro 6). Al igual que a altas concentraciones, el Microencapsulado mostró una menor efectividad en larvas sin alimento, en comparación con el mismo tratamiento más Vectobac-G ó Teknar. A las 5 h de exposición, el porcentaje de mortalidad en larvas sin alimento tratadas con Microencapsulado fue 9,0 ± 2,9 %, menor que la mortalidad de larvas tratadas con Vectobac-G (33,0 ± 3,1 %) y Teknar (30,0 ± 3,1 %) (P<0.05). A las 24 h de exposición a la CL₅₀ de cada formulación, la mortalidad en

Cuadro 7. Efecto de la presencia de alimento sobre el TL₅₀ de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis*. CL₅₀ y CL₉₅ de cada formulación.

Formulación	CL ₅₀ CL ₉₅ (ppm)	Tiempo Letal 50 (horas) ¹			
		Sin Alimento		Con Alimento	
Microencapsulado	0,006	16,1	(14,0 - 19,0) ²	23,9	(20,1 - 30,0)
	0,05	3,2	(1,6 - 1,4)	7,0	(6,2 - 7,9)
Vectobac-G	0,40	8,7	(7,4 - 10,4)	26,3	(20,5 - 37,6)
	4,80	Regresión n.s.		4,4	(3,2 - 4,1)
Teknar	0,10	8,7	(7,4 - 10,3)	21,3	(18,0 - 26,5)
	1,60	Regresión n.s. (P>0,05)		4,1	(3,6 - 4,6)

¹ TL₅₀ estimado mediante Probit Analysis Program (Raymond 1985).

² (Intervalo de confianza al 95 %.)

larvas con alimento osciló alrededor del 50 %, tal y como se esperaba para este tratamiento. En larvas sin alimento, la mortalidad fue significativamente mayor, siendo esta diferencia de 16,7 % para el Microencapsulado (Cuadro 6), de 33,4 % para Vectobac-G (Cuadro 13) y de 30,4 % para Teknar (Cuadro 6).

Los resultados del Análisis Probit para estimar los TL₉₅ a altas y bajas concentraciones de Bti en ausencia y presencia de alimento, se muestran en el cuadro 15. A bajas concentraciones y sin alimento, Vectobac-G y Teknar necesitaron 8,7 h de exposición para lograr el 50 % de mortalidad, mientras que el Microencapsulado requirió 16,1 h de exposición para lograr esta misma mortalidad. Sin embargo, a bajas concentraciones y con alimento, el TL₅₀ fue el mismo para las tres formulaciones, tal y como lo indica el solapamiento entre los límites fiduciales de los TL (Cuadro 7).

Es importante destacar que a la CL₉₅ no se pudieron estimar los TL₅₀ para larvas sin alimento tratadas con Vectobac-G y Teknar debido a que ya a las 3 h de exposición, el porcentaje de mortalidad en ambos casos se incrementó de 3,3 ± 2,0 (1 h de exposición) a 95,0 y 90,0 % respectivamente (Cuadro 6); esto indica que la CL₉₅ empleada (calculada en presencia de alimento), resultó demasiado alta para calcular los TL₅₀ en larvas sin alimento tratadas con Vectobac-G y Teknar.

Estos resultados indican que la presencia de alimento reduce la eficacia del Bti, lo cual concuerda con lo señalado por Aly (1983) y Aly et al. (1988), quienes encontraron una reducción en

la mortalidad de larvas de *Aedes vexans* (Meigen) y *An. albimanus* tratadas con Bti por efecto de la presencia de alimento. Igualmente, Ramoska y Pacey (1979), obtienen respuestas similares en *An. albimanus* y *Culex quinquefasciatus* Say tratados con *B. sphaericus*. Sin embargo, Ignoffo et al. (1981) señalan resultados contrarios y concluyen que la presencia de alimento actúa como fagoestimulante, favoreciendo la ingesta del Bti. Probablemente cada especie tiene comportamientos alimentarios diferentes, aspecto que en gran parte determina la eficacia de una formulación.

Independientemente de la presencia o no de alimento, la velocidad de acción del Microencapsulado a la CL₅₀ y CL₉₅, siempre fue menor que la velocidad de acción observada para Vectobac-G y Teknar a esa misma concentración; esto nos confirma que la menor eficacia del Microencapsulado en comparación con Vectobac-G y Teknar, se debe en este caso, más a defectos en la formulación misma, que a una posible ingestión selectiva de partículas, aspecto señalado por Aly et al. (1988), para explicar la baja susceptibilidad de *Anopheles* spp. al Bti en comparación con especies de los géneros *Culex* y *Aedes*.

Efecto de la variación en la densidad de larvas sobre la eficacia. La densidad establecida para realizar todos los bioensayos fue de 0,21 larvas/cm² ó 20 larvas/envase. Al aumentar la densidad de 0,21 hasta 0,53 larvas/cm² (50 larvas/envase), el porcentaje de mortalidad 24 h postratamiento, provocado por la CL₉₅ de cada formulación, disminuyó con respecto a la mortalidad observada a

Cuadro 8. Efecto de la densidad larval sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis*. CL₉₅ de cada formulación.

Formulación	Densidad		Mortalidad (%) ¹	
	Larvas/repetición	Larvas/cm ²	24 h	48 h
Microencapsulado	20	0,21	95,0 ± 5,0 a 2	96,7 ± 2,9 a
	25	0,26	93,3 ± 6,1 a	98,7 ± 2,3 a
	30	0,32	73,3 ± 8,8 b	84,2 ± 1,4 b
	40	0,42	73,3 ± 2,4 b	77,8 ± 3,9 c
	50	0,53	50,7 ± 3,1 c	63,3 ± 3,1 d
Vectobac-G	20	0,21	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
	25	0,26	90,7 ± 9,2 ab	98,7 ± 2,3 a
	30	0,32	96,7 ± 3,3 a	100,0 ± 0,0 a
	40	0,42	78,3 ± 5,8 b	98,3 ± 1,4 ab
	50	0,53	73,0 ± 2,7 b	91,3 ± 5,8 a
Vectobac-AS	20	0,21	96,3 ± 2,5 a	100,0 ± 0,0 a
	25	0,26	90,0 ± 5,0 a	98,5 ± 2,9 a
	30	0,32	76,7 ± 4,7 b	87,3 ± 5,1 b
	40	0,42	83,8 ± 5,3 ab	94,6 ± 3,3 a
	50	0,53	95,0 ± 1,4 a	100,0 ± 0,0 a
Teknar	20	0,21	98,3 ± 2,9 a	100,0 ± 0,0 a
	25	0,26	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
	30	0,32	98,9 ± 1,9 a	100,0 ± 0,0 a
	40	0,42	91,5 ± 0,0 b	100,0 ± 0,0 a
	50	0,53	86,0 ± 4,7 b	97,3 ± 3,1 a
Control	20	0,21	0,0 ± 0,0 f	1,3 ± 2,8 f
	25	0,26	1,3 ± 2,8 c	1,3 ± 2,8 f
	30	0,32	2,2 ± 1,9 c	3,3 ± 2,9 ef
	40	0,42	0,0 ± 0,0 f	4,6 ± 1,2 e
	50	0,53	4,4 ± 0,0 c	4,0 ± 0,0 e

¹Promedios con base a cuatro repeticiones por formulación y densidad²Valores dentro de una columna con la misma letra, no son significativamente diferentes (P>0,05). Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan.

0,21 larvas/cm². Tal reducción en la mortalidad fue significativa a densidades de 40 y 50 larvas/envase en los tratamientos con Vectobac-G y Teknar, llegando al 73,0 ± 2,7 % y 86,0 ± 4,7 % respectivamente, aunque éstos siguen siendo valores de mortalidad relativamente altos (Cuadro 8). En larvas tratadas con Microencapsulado, se observó una reducción significativa en el porcentaje de mortalidad a partir de 30 larvas/envase (0,32 larvas/cm²), bajando de 95,0 ± 5,0 % (0,21 larvas/cm²) hasta 50,7 ± 3,1 % de mortalidad cuando la densidad fue de 0,50 larvas/cm² (Cuadro 8). A las 48 h postratamiento, en larvas tratadas con Vectobac-G y Teknar no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y los porcentajes de mortalidad

se acercaron al 100 % independientemente de la densidad; estos resultados no se obtuvieron con el Microencapsulado, ya que se observó un incremento en la mortalidad por efecto del tiempo de exposición a las 48 h, pero manteniéndose la tendencia de reducción de la mortalidad por efecto del incremento en la densidad a partir de 30 larvas por envase (Cuadro 8). El aumento en la densidad no produjo un efecto lineal e inverso sobre la eficacia de Vectobac-AS, ya que los porcentajes de mortalidad fluctuaron independientemente de la densidad (Cuadro 8).

Al realizar la regresión entre el log de la densidad (larvas/cm²) y la mortalidad a las 24 h de exposición, ésta fue significativa (P<0,05) para el

Microencapsulado, Vectobac-G y Teknar, pero no se encontró dependencia de la mortalidad con la densidad en larvas tratadas con Vectobac-AS (Cuadro 9). Así, la Densidad Letal 50 ($DenL_{50}$) utilizando la CL_{95} , de cada formulación, fue 0,55 larvas/cm² para el Microencapsulado, 0,73 larvas/cm² para Vectobac-G y para Teknar 1,0 larvas/cm² (Cuadro 9). Igualmente, este mismo análisis de regresión permitió calcular la mortalidad esperada a la densidad de 1 larva/cm² (95 larvas/envase). A esta densidad y utilizando la CL_{95} de cada formulación, se esperaría un 20 % de mortalidad en larvas tratadas con Microencapsulado, 30 % en larvas tratadas con Vectobac-G y 50 % de mortalidad en larvas tratadas con Teknar (Cuadro 9), evidenciándose así que ésta última formulación es la menos afectada por el incremento en la densidad de larvas.

El efecto de la variación en la densidad larval sobre la eficacia del Bti y de *B. sphaericus* ha sido estudiado para varias especies de mosquitos. Mulla et al. (1990) obtienen resultados similares a los señalados aquí, al evaluar el efecto del aumento de la densidad de larvas de *Cx. quinquefasciatus* sobre la eficacia de Bactimos (3.000 uti/mg). Igualmente, Aly et al. (1988) encuentran una disminución en la mortalidad de larvas de *An. albimanus*, *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* tratadas con Bti a medida que aumenta la densidad. Becker et al. (1992, 1993), al evaluar el efecto de la densidad utilizando *Ae. vexans* y *Culex pipiens* L., señalan que esta relación inversa entre la densidad y la eficacia, es lineal y se cumple tanto para el Bti como para *B. sphaericus*.

Efecto del tipo de agua sobre la eficacia. Las características físico-químicas del agua de chorro, estanque y del agua en las bandejas de cría fueron muy similares entre sí, salvo por el aumento en el pH y la alcalinidad total observados en el agua utilizada para la cría. Con respecto al agua de criadero, ésta presenta un mayor pH, menor contenido de oxígeno disuelto y ausencia de CO₂, así como valores de alcalinidad y dureza total extremadamente altos.

En el cuadro 10 se muestran los valores de mortalidad (24 h post-tratamiento), obtenidos en larvas tratadas con dos concentraciones del Microencapsulado, Vectobac-G y Teknar,

preparadas con cuatro tipos de agua diferentes. Estos valores de mortalidad fueron corregidos para los tratamientos agua de chorro, destilada y de criadero (Abbott 1925), ya que la mortalidad en los respectivos controles excedió del 5 %.

Al utilizar concentraciones equivalentes a la CL_{95} de cada producto, no se observaron efectos del tipo de agua sobre el porcentaje de mortalidad esperado (95 %), en larvas tratadas con Vectobac-G y Teknar (Cuadro 10). Sin embargo, se observó una reducción significativa en la mortalidad de larvas tratadas con Microencapsulado y agua de criadero con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 10).

Al aplicar la CL_{50} , disminuyó el porcentaje de mortalidad en larvas tratadas con Microencapsulado y agua de chorro ($54,6 \pm 13,7$ %) o de criadero ($51,8 \pm 9,3$ %), con respecto a la mortalidad en el tratamiento Microencapsulado-agua de estanque ($71,7 \pm 2,9$ % ; $P < 0,05$) (Cuadro 10). En larvas tratadas con Teknar a baja concentración (0,16 ppm), sólo se observó reducción en la eficacia de soluciones preparadas con agua de criadero con respecto a los tres tratamientos restantes (Cuadro 10). Por otra parte, los valores de mortalidad encontrados en larvas tratadas con Vectobac-G (1,0 ppm) son bastante variables, aunque se observó una mayor mortalidad en larvas tratadas con agua de criadero ($82,1 \pm 13,4$ %), en comparación con la mortalidad observada en soluciones preparadas con agua de chorro ($45,5 \pm 9,5$ %) o agua destilada ($53,3 \pm 14,4$ %; $P < 0,05$), entre las cuales no hubo diferencias. (Cuadro 10).

Contrario a lo señalado por otros autores, (Ignoffo et al. 1981, Margalit y Bobroglo 1984, Dulmage et al. 1990, Mulla et al. 1990), no se encontraron diferencias significativas en la eficacia de las soluciones de las tres formulaciones preparadas con agua destilada, en comparación con las preparadas con agua de estanque a altas o bajas concentraciones, a excepción del Microencapsulado a 0,02 ppm donde la mortalidad fue significativamente menor en el agua de estanque ($71,7 \pm 2,9$ %) que en el agua destilada ($76,7 \pm 0,4$ %) (Cuadro 10). Es importante esta acotación, ya que una de las objeciones que pudieran hacerse a este trabajo, es la no utilización de agua destilada en los bioensayos, a diferencia de lo recomendado por de Barjac y

Cuadro 9. Regresión Log Densidad Larval - % Mortalidad para evaluar la eficacia de cuatro formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis*. CL₉₅ de cada formulación.

Formulación	Pendiente ± DS	Densidad Letal 50		Mortalidad Esperada a 1 larva/cm ² (%)
		larvas/cm ²		
Microencapsulado	- 3,90 ± 0,43	0,55	(0,49-0,65) b	20,0
Vectobac-G	- 3,79 ± 0,60	0,74	(0,62-1,00)	30,0
Teknar	- 3,83 ± 0,88	1,01	(0,75-2,12)	50,0
Vectobac-AS	Regresión n. s. (P>0,05)			--

a (P<0,05). Probit Analysis Program (Raymond 1985).

b (Intervalo de confianza al 95 %.)

Cuadro 10. Efecto del tipo de agua sobre la eficacia de tres formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis*. CL₉₅ de cada formulación.

Formulación	Mortalidad Promedio después de 24 h (%) ¹			
	Tipo de Agua			
	Destilada	Tubería	Estanque	Criadero
CL95				
Microencapsulado	93,3 ± 5,8 a	96,2 ± 6,1 a	98,3 ± 2,9 a	75,0 ± 13,5 b
Vectobac-G	95,0 ± 5,0 a	92,9 ± 8,4 a	91,7 ± 2,9 a	98,0 ± 13,4 a
Teknar	98,3 ± 2,9 b	99,7 ± 0,0 b	100,0 ± 0,0 a	99,7 ± 0,0 b
Control *	5,5 ± 0,0 b	8,3 ± 7,6 b	0,0 ± 0,0 c	8,3 ± 7,6 b
CL50				
Microencapsulado	76,7 ± 0,4 a	54,6 ± 13,7 ab	71,7 ± 2,9 b	51,8 ± 9,3 c
Vectobac-G	53,3 ± 14,4 b	45,5 ± 9,5 b	65,0 ± 13,2 ab	82,1 ± 13,4 a
Teknar	91,7 ± 2,9 a	92,8 ± 3,2 a	96,7 ± 5,8 a	48,2 ± 3,1 b
Control *	5,5 ± 0,0 c	8,3 ± 7,6 b	0,0 ± 0,0 d	8,3 ± 7,6 b

(1) Promedios calculados con base a cuatro repeticiones por tipo de agua y formulación. Columnas con la misma letra no difieren significativamente (P>0,05) (Test de Comparaciones Múltiples de Duncan). *Las mortalidades en los tratamientos Bti más agua destilada, tubería o de cría, fueron corregidas mediante la fórmula de Abbott (Abbott 1925).

Larget (1979) y la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1981). Sin embargo, las razones por las cuales se utilizó agua de estanque reposada fueron explicadas previamente en la metodología y se confirmaron en este bioensayo, ya que 24 h de exposición al agua destilada fueron suficientes para producir más del 5 % de mortalidad en el control, lo cual nunca se observó en ninguno de los bioensayos realizados con agua de estanque, ni en los controles con agua de estanque utilizados en este experimento (Cuadro 10).

En resumen, puede decirse que a altas concentraciones Vectobac-G y Teknar provocaron el nivel de mortalidad esperado independientemente del tipo de agua, mientras que la efectividad del Microencapsulado sí se afectó por el agua de criadero, obteniéndose porcentajes de mortalidad menores a los esperados para las dos concentraciones

utilizadas. A bajas concentraciones, el efecto del tipo de agua fue más evidente para todas las formulaciones, ya que cuando se observaron diferencias significativas de otros tratamientos con respecto al tratamiento con agua de estanque, la magnitud de estas diferencias fue mucho mayor que la encontrada a altas concentraciones (Cuadro 10). Resultados similares son señalados por Mulligan et al. (1980) e Ignoffo et al. (1981) al evaluar el efecto del agua de criadero sobre la efectividad de varias concentraciones letales de Bti. Es decir, la eficacia de la bacteria se reducirá de manera proporcional a como ocurra la reducción de la concentración de Bti; pero en presencia de aguas de poca calidad (alto contenido de microorganismos, partículas coloidales, etc), la reducción de la eficacia es mucho más acentuada a medida que disminuye dicha concentración. Es importante aclarar que un

incremento en el contenido de materia orgánica, es equivalente a aumentar la disponibilidad de alimento en la solución, de manera que se reduce la proporción de toxina con respecto al total de partículas ingeribles por la larva.

Efecto de la radiación solar sobre la eficacia.

Después de un período de exposición de 3 h, la radiación solar afectó la eficacia de las tres formulaciones evaluadas, a altas y bajas concentraciones (Cuadro 11). La mortalidad en larvas tratadas con Microencapsulado o Vectobac-G a la CL_{95} y expuestas a la radiación solar, fue significativamente menor ($67,5 \pm 15,6$ y $70,5 \pm 10,8$ % respectivamente), que la mortalidad en larvas mantenidas a la sombra ($92,5 \pm 6,5$ y $90,0 \pm 8,7$ % ; $P < 0,05$). En larvas tratadas con Teknar a la CL_{95} , la mortalidad fue del 100,0 % en los dos tratamientos (luz y sombra) (Cuadro 11).

A bajas concentraciones de Bti CL_{50} , se observó una reducción altamente significativa ($P < 0,01$) en la mortalidad de larvas expuestas a la radiación con respecto a las mantenidas en la sombra para las tres formulaciones evaluadas. (Cuadro 11). La reducción en la mortalidad por efecto de la radiación solar fue más acentuada a bajas concentraciones de Bti, ya que la diferencia de los valores obtenidos con respecto al tratamiento con sombra fue aproximadamente del 35 %, mientras que a altas concentraciones esta diferencia no excedió del 25 %, en los tratamientos con Microencapsulado y Vectobac-G (Cuadro 11).

Durante el tiempo de permanencia a la intemperie, la temperatura de las soluciones se incrementó de $25,0 \pm 0,2$ °C (temperatura inicial de todos los tratamientos preparados en el laboratorio) a $28,0 \pm 0,5$ °C, tanto en los tratamientos al sol como a la sombra (temperatura después de 3 h de exposición al sol). Sin embargo, los porcentajes de mortalidad observados a las 24 h en los tratamientos que se mantuvieron a la sombra, no fueron diferentes a los esperados para esas concentraciones, las cuales fueron establecidas previamente en condiciones de laboratorio. De esta manera, se puede asumir que la mayor tasa de ingestión de toxina en larvas mantenidas a la sombra, no estuvo influenciada por un incremento en la temperatura del agua, tal y como ha sido ampliamente señalado por

García y Desrochers (1979), Wraight et al. (1981), Kramer (1990), Mulla (1990), Tousignant et al. (1992), y Becker et al. (1992, 1993), tanto para *B. thuringiensis* como para *B. sphaericus*.

La inactivación del *B. thuringiensis* por efecto de la radiación fue tempranamente señalada por Cantwel y Franklin (1967) y Burges et al. (1975) y luego por Becker et al. (1993) y Consoli et al. (1995) en *B. sphaericus*. Igualmente, Cohen et al. (1991) y Putzai et al. (1991) mencionan el mismo efecto de la radiación solar sobre *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), aunque se desconocen los mecanismos por los cuales ésta se produce. Putzai et al. (1991) y Cohen et al. (1991), al realizar estudios detallados de la fotoestabilidad del Btk, formulan diferentes razones para explicar el mecanismo de fotoinactivación de la bacteria, pero coinciden en relacionar a un proceso de destrucción de los residuos de triptófano en los cristales de la δ -endotoxina con una menor eficacia del Btk sobre *Heliothis armigera* (Hübner) y *Bombyx mori* L. Sin embargo, prácticamente no existe información acerca del mecanismo de inactivación del Bti por efecto de la radiación. Probablemente la radiación solar actúe de distinta manera, tomando en cuenta que el Bti se encuentra sobre la interfase agua-aire o más internamente dentro de la columna de agua de los criaderos, mientras que el Btk está más expuesto, ya que se aplica directamente en la superficie de las hojas donde se alimenta la larva.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que el Bti Microencapsulado fue la formulación que requirió las menores concentraciones para provocar el 50 y 95 % de mortalidad, además de generar la respuesta más homogénea en las larvas tratadas. Sin embargo, la persistencia de esta formulación fue menor que la observada para Vectobac-G y Teknar durante casi todos los días de evaluación y además mostró una lenta velocidad de acción durante las primeras 24 h de exposición. Al suspender la ingestión de toxina, el efecto residual en las larvas tratadas con la CL_{95} de Vectobac-G y Teknar, fue más acentuado que la residualidad mostrada por el Microencapsulado y Vectobac-AS a la misma concentración letal. Igualmente, el Bti Microencapsulado fue la formulación menos favorecida por la ausencia de alimento y la más

Cuadro 11. Efecto de la radiación solar sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Anopheles aquasalis*.

Formulación	Concentración CL ₅₀ - CL ₉₅ (ppm)	Mortalidad (%) ¹	
		Luz	Sombra
Microencapsulado	0,006	11,3 ± 7,5 e	50,0 ± 5,0 d
	0,050	67,5 ± 15,6 c	92,5 ± 6,5 b
Vectobac-G	0,48	15,0 ± 4,7 e	56,7 ± 2,9 cd
	4,80	70,5 ± 10,8 c	90,2 ± 8,7 b
Teknar	0,10	13,8 ± 4,8 e	51,6 ± 10,4 cd
	1,60	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
Control		0,0 ± 0,0 f	0,0 ± 0,0 f

(1) Mortalidad promedio ± D.S. estimada 24 h después de culminar el periodo de exposición a la radiación solar (3 h). Valores con letras iguales no difieren significativamente ($P > 0,05$) (Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan).

afectada por el aumento en la edad y densidad de las larvas. Así mismo, el Microencapsulado fue afectado por la radiación solar al mismo nivel que Vectobac-G y Teknar, cuando fue aplicado a bajas concentraciones.

Vectobac-AS presentó un comportamiento similar al mostrado por el Microencapsulado, en relación a los tiempos letales obtenidos y a la mayor homogeneidad observada en las rectas dosis-respuesta que permitieron determinar las concentraciones letales; sin embargo, la variación en la densidad larvaria no produjo una tendencia definida en la mortalidad de las larvas tratadas con esta formulación.

Vectobac-G y Teknar, a pesar de ser dos formulaciones diferentes (granulada y suspensión acuosa respectivamente), provocaron respuestas similares en larvas de *An. aquasalis* con respecto a los tiempos letales, suspensión del tiempo de exposición y presencia-ausencia de alimento. Vectobac-G, requirió de las mayores CL₅₀ y CL₉₅ y presentó la menor pendiente de las rectas dosis-respuesta obtenidas, pero fue la formulación con la mayor persistencia. Por su parte, Teknar fue la menos afectada por el aumento en la edad y densidad larvaria, la variación en el tipo de agua y cuando fue aplicada a altas concentraciones, por la radiación solar.

En general, los factores biológicos, ambientales y aquellos propios de la formulación evaluados en este trabajo, afectaron la eficacia y persistencia

de las cuatro formulaciones. Sin embargo, la reducción de la efectividad se observó más drásticamente cuando los factores introducidos modificaron el comportamiento alimentario de las larvas, tales como el incremento en la edad de las larvas, la interrupción en el tiempo de exposición, la variación en la densidad larval y la presencia o ausencia de alimento.

En todos los casos, se afectó el tipo, cantidad y velocidad de ingestión de las partículas. Las larvas de la mayoría de las especies de *Anopheles* son colectoras-filtradoras; es decir, al alimentarse, remueven partículas finas de material orgánico (entre 0,45 μm hasta 1,0 mm) de la interfase aire-agua, a través de batidos los de los cepillos laterales de la cavidad pre-oral (Merritt et al. 1992). Sin embargo, todo parece indicar que existe una ingestión selectiva de partículas en función del tamaño (Dahl et al. 1993), y de la presencia de fagoestimulantes que pueden ser reconocidos, señalando el potencial o la calidad de alimento que posee una partícula (Dadd et al. 1982, Rashed y Mulla 1989, Merritt et al. 1992). Otro aspecto a tomar en cuenta, es la duración y frecuencia de la ingestión de alimento. A este respecto, Merritt et al. (1992), señalan que la tasa de batido no cambia en presencia de fagoestimulantes, sino la proporción del tiempo de batido. Por otra parte, la cantidad de partícula ingerida por individuo, no es afectada por la densidad larval, sino por la concentración de partículas del mismo tipo que se encuentren en

solución (Dadd 1971, Aly et al. 1988, Rashed y Mulla 1989).

De esta manera, la velocidad de ingestión de toxina estuvo influenciada por las diferentes tasas de alimentación observadas en larvas del mismo instar y por las características propias de cada formulación tales como: tasa de liberación de la bacteria, tamaño y densidad de las partículas, presencia de fagoestimulantes y tasa de sedimentación.

Al suspender la exposición a la bacteria y verificar el efecto residual 24 h después, el Microencapsulado y Vectobac-AS fueron menos efectivos a pesar de que fueron suministrados a altas concentraciones (CL_{95}). Resultados similares se obtuvieron al evaluar el efecto de la ausencia de alimento a altas y bajas concentraciones de Bti. Esto significa que en larvas tratadas con Vectobac-AS y Microencapsulado hubo una baja tasa de ingestión, bien sea porque las formulaciones poseen una baja tasa de liberación de toxina o porque éstas no ofrecen fagoestimulantes apropiados que incrementen la tasa de ingestión de la bacteria. De esta manera, y tomando en cuenta que existen mecanismos que pueden eliminar una cierta cantidad de toxina por unidad de tiempo, una dosis puede ser letal si es ingerida de una vez, pero subletal si es dividida en pequeñas cantidades durante un largo período de tiempo (Aly et al. 1988).

La tasa de liberación de toxina y el patrón de distribución de las bacterias adheridas al material inerte, pueden ser inferidas al analizar los resultados del ensayo de persistencia en soluciones filtradas y no filtradas; al filtrar, se eliminaron partículas de tamaño superior a las $0,43 \mu$ constituidas básicamente por material inerte más bacterias esporuladas y cristales libres. El efecto del filtrado en el Microencapsulado se observó a partir de soluciones de cinco días, lo cual indica que la liberación inicial de bacterias tanto en soluciones filtradas como no filtradas, se produjo de partículas de material inerte con tamaño menor a las $0,43 \mu$. Vectobac-G filtrado produjo una menor mortalidad sólo durante las primeras 48 h post-preparación y luego en soluciones de 15 días; esto sugiere que la liberación de la bacteria se produjo inicialmente en partículas de más de $0,43 \mu$. El efecto del filtrado en Teknar (compuesto por material inerte

y cristales libres), sólo fue evidente en soluciones de dos y cinco días, por lo que probablemente los cristales son liberados inicialmente (0-24 h post-preparación), de partículas con tamaño superior a las $0,43 \mu$.

De esta manera, conocer la dinámica de liberación del Bti y el tamaño de las partículas a las cuales se encuentra adherido, es de suma importancia ya que buena parte de la efectividad de una formulación depende de estas características; sobre todo, tomando en cuenta que las especies de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*, poseen hábitos alimentarios distintos que se manifiestan en una selección diferencial del tamaño de partículas (Dahl 1988, Merrit et al. 1992).

Por otra parte, al variar la densidad larval se produjo una reducción en la eficacia de las formulaciones evaluadas, debido probablemente a un rápido agotamiento de la disponibilidad de la toxina. Aly (1988), en un estudio comparativo sobre la tasa de filtración de estos tres géneros, señalan que la tasa de ingestión de partículas no varía con el incremento en la densidad larval, sino en función de la concentración de partículas en suspensión. Así, mientras mayor es esta concentración, mayor es la tasa de ingestión. Luego, al determinar la DL50 es decir, la cantidad de toxina que produce el 50 % de mortalidad en larvas si ésta es ingerida de una sola vez (Aly et al. 1988), se podría establecer la cantidad exacta de toxina que debe aplicarse, tomando en cuenta la densidad larval y no la superficie del criadero, como normalmente se realiza en las aplicaciones de Bti a gran escala.

En consecuencia, se hacen necesarios estudios sobre el comportamiento alimentario de larvas de *An. aquasalis* a fin de establecer qué tipo y en qué proporción son ingeridas las partículas alimenticias y cómo es el ritmo o dinámica de ingestión diaria tomando en cuenta factores como el tipo o composición del alimento, temperatura del agua, hora del día, luminosidad y densidad o estado de agregación larval. Delgado (1998), señaló la importancia del comportamiento gregario para la sobrevivencia de larvas de *An. aquasalis*. Observaciones personales sobre el modo de alimentación en larvas de esta especie, sugieren que la frecuencia de ingestión de partículas por

larva, muchas veces es el resultado de una reacción en cadena que se produce cuando las larvas están muy próximas entre sí. Es decir, cuando una de las larvas de un grupo comienza a alimentarse, las más próximas hacen lo mismo, observándose el típico movimiento de rotación de la cabeza en 180° y los batidos de los cepillos laterales de la cavidad pre-oral, tal y como ha sido descrito para el género *Anopheles* por Jones (1960). Sin embargo éste es otro aspecto del comportamiento alimentario el cual debe ser estudiado con detenimiento, no sólo en *An. aquasalis* sino también para otras especies de culícidos de importancia médica.

Agradecimientos

Al Dr. Robert H. Zimmerman (University of Florida), por su apoyo y orientación permanente. Al Dr. Jesús Berti (IAES; MSDS), por facilitar las instalaciones del Laboratorio de Estudios sobre Malaria para realizar todo el proceso experimental de este trabajo. Al Insp. en Salud Pública Julio González por toda la colaboración y ayuda prestada.

Referencias

ABBOTT WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265-267.

ALY C. 1983. Feeding behavior of *Aedes vexans* larvae (Diptera: Culicidae) and its influence on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Bull Soc Vector Ecol* 8(2):94-100.

ALY C, MULLA M, SCHNETTER W, XU B. 1987. Floating bait formulations increase effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles* larvae. *J Am Mosq Control Assoc* 3:583-588.

ALY C, MULLA M, XU B, SCHNETTER W. 1988. Rate of ingestion by mosquito larvae (Diptera: Culicidae) as a factor in the effectiveness of a bacterial stomach toxin. *J Med Entomol* 25(3):191-96.

BECKER N, ZGOMBA M, LUDWING M, PETRIC D, RETTICH F. 1992. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. *J Am Mosq Control Assoc* 8(3): 285-289.

BECKER N, LUDWING M, BECK M, ZGOMBA M. 1993. The impact of environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* against *Culex pipiens*. *Bull Soc Vector Ecol* 18(1):61-66.

BERTI J, ZIMMERMAN R, AMARISTA J. 1993. Spatial and temporal distribution of Anopheline larvae in two malarious areas in Sucre State, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88(3): 353-362.

BURGES H, HILLYER S, CHANTER D. 1975. Effect of ultraviolet and gamma rays on the activity of δ -endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 25:5-9.

CANTWELL G, FRANKLIN BA. 1967. Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 8:256-258.

CHEUNG P, HAMMOCK B. 1985. Micro-lipid droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxin for control of mosquito larvae. *Appl Env Microbiol* 50(4):984-988.

CHILCOTT CH, KNOWLES D, ELLAR D, DROBNIENSKI F. 1990. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* parasporal body. In: Bacterial control of mosquitoes & black flies. H. de Barjac and D. Sutherland Editors. Rutgers Univ. Press. p: 45-65.

COHEN E, ROZEN H, JOSEPH T, BRAUN S, MARGULIES L. 1991. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* from ultraviolet radiation. *J Invertebr Pathol* 57:343-351.

DADD R. 1971. Effects of size and concentration of particles on rates of ingestion of latex particulates by mosquito larvae. *Ann Entomol Soc Am* 64(3):687-692.

DADD R, KLEINJAN J, MERRILL L. 1982. Phagostimulant effects of simple nutrients on larvae *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am* 75:605-612.

DAHL C. 1988. Control potentials in feeding mechanisms of mosquito larvae. *Bull Soc Vector Ecol* 13(2):295-303.

DAHL C, SAHLEN G, GRAWE J, JOHANNISSON A, AMNERS H. 1993. Differential particle uptake by larvae of three mosquito species (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 30:537-543.

DE BARJAC H. 1978. Un nouveau candidat a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Entomophaga* 23(4):309-319

DE BARJAC H, COZ J. 1979. Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Bull Org Mon Santé* 57(1): 139-141.

DE BARJAC H, LARGET I. 1979. Proposals for the adoption of standardized bioassay method for the evaluation of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. WHO/VBC/79.744.

DELGADO N. 1998. Parámetros demográficos de las fases inmaduras de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) bajo condiciones de laboratorio. *Bol Entomol Venez* 13(1):27-43.

- DELGADO N, BERTI J, GONZÁLEZ D, GONZÁLEZ J, AMARISTA J. 1998. Estudio biosistemático y ecológico de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) y sus implicaciones para el control de la malaria en el estado Sucre: III. Control biológico y manejo integrado. Bol Dir Malarial Sanearm Amb 38(1):47-62.
- DULMAGE H, CORREA J, GALLEGOS-MORALES G. 1990. Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development. In: Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies. H. de Barjac and D. Sutherland Eds. Rutgers Univ. Press. p: 110-133.
- FINNEY D. 1971. Probit Analysis. The Syndics of the Cambridge University Press. 400 p.
- GHARIB A, HILSENHOFF W. 1988. Efficacy of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against *Aedes vexans* and safety to non-target macroinvertebrates. J Am Mosq Control Assoc 4(3):252-255.
- GILL S. 1995. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. Mem Inst Oswaldo Cruz 90(1):69-74.
- GILL S, COWLES E, PIETRANTONIO P. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann Rev Entomol 37:615-636.
- GOLDBERG J, MARGALIT J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq News 37:355-358.
- GÓMEZ C. 2001. Efecto de diferentes concentraciones de salinidad sobre una formulación comercial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner, controlador biológico de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en el laboratorio. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. Venezuela. 48 p.
- GUILLET P, ESCAFFRE H., PRUD'HOM J, BAKAYOKO S. 1985. Étude des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae). Part 2, Influence du temps de contact et de la quantité de particules naturelles en suspension dans l'eau. Cah ORSTOM, Ser Ent méd et Parasitol 23(4):265-271.
- HERRERA M, OSBORN F, GÓMEZ C. 2003. Eficacia de dos formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) en tres concentraciones salinas. En: Resúmenes, XVIII Congreso Venezolano de Entomología, Sociedad Venezolana de Entomología. Maracay-Venezuela. p 48.
- IGNOFFO C, GARCÍA C, KROHA M, FAKUDA T, COUCH T. 1981. Laboratory test to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. Mosq News 41(1):85-93.
- JONES J. 1960. The anatomy and rhythmical activities of the alimentary canal of *Anopheles* larvae. Ann Entomol Soc Am 53:459-474.
- KHAWALED K, BARAK Z, ZARITSKY A. 1988. Feeding behavior of *Aedes aegypti* larvae and toxicity of dispersed and naturally encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J Invertebr Pathol 52:419-426.
- KRAMER V. 1990. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and Methoprene against *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae) in tires. J Econ Entomol 83(4): 1280-1285.
- LACEY L. 1985. *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. J Am Mosq Control Assoc 6:132-157.
- LACEY L, SINGER S. 1982. Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against anopheline and culicine mosquitoes. Mosq News 42(4): 537-543.
- LAHKIM-TSROR L, PASCAR-GLUZMAN C, MARGALIT J, BARAK Z. 1983. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serovar H14 in *Aedes aegypti*: Histopathological studies. J Invertebr Pathol 41:104-116.
- MARGALIT J. 1989. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (B. T.I); history and presents status. Israel J Entomol 23:3-8.
- MARGALIT J, BOBROGLO H. 1984. The effect of organic materials and solids in water on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Serotype H-14. Z ang Ent 97:516-520.
- MARGALIT J, MARKUS A, PELAH Z. 1984. Effect of encapsulation on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Appl Microbiol Biotechnol 19:382-383.
- MERRIT R, DADD R, WALKER E. 1992. Feeding behavior, natural food and nutritional relationships of larval mosquitoes. Ann Rev Entomol 37:349-376.
- MIAN L, MULLA M. 1983. Factors influencing activity of the microbial agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae. Bull Soc Vector Ecol 8(2): 128-134.
- MOLINA D. 1985. Evaluación de la actividad de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotipo H-14) sobre *Aedes aegypti*. Tesis de Grado para obtener el Título de Maestría. UCV Fac. Agronomía. Maracay.
- MULLA M. 1990. Activity, field efficacy and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. In: Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies. H de Barjac and D. Sutherland Editors. Rutgers Univ. Press. p:134-160.
- MULLA M, FEDERICI B, DARWAZEH H. 1980. Effectiveness of the bacterial pathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito larvae. Proc and Pap Calif Mosq and Vector Control 48:25-27

- MULLA M, DARWAZEH H, ZGOMBA M. 1990. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. Bull Soc Vector Ecol 15(2):166-175.
- MULLEN G, HLNKLE N. 1988. Method for determining settling rates of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 formulations. J Am Mosq Control Assoc 4(2): 132-137.
- MULLIGAN F, SCHAEFER C, WILDER W. 1980. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. J Econ Entomol 73:684-688.
- PANBANGRED W, PANTUWATANA S, BHUMIRATANA A. 1979. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* toward *Aedes aegypti* larvae. J Invertebr Pathol 33: 340-347.
- PERICH M, BOOBAR L, STIVERS J, RIVERA L. 1989. Evaluation of diverse formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles albimanus* in Honduras. Israel J Entomol 23:45-49.
- PUTZAI M, FAST P, GRINGORTEN L, KAPLAN H, LESSARD T. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. Biochem J 273:43-47.
- RAMOSKA W, PACEY C. 1979. Food availability and period of exposure as factors of *Bacillus sphaericus* efficacy on mosquito larvae. J Econ Entomol 72(4):523-525.
- RAMOSKA W, HOPKINS T. 1981. Effects of mosquito larval feeding behavior on *Bacillus sphaericus* efficacy. J Invertebr Pathol 37(3):269-272.
- RAMOSKA W, WATTS S, RODRÍGUEZ R. 1982. Influence of suspended particulates of activity of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. J Econ Entomol 75(1): 1-4.
- RASHED S, MULLA M. 1989. Factors influencing ingestion of particulate materials by mosquito larvae (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 26(3): 210-216.
- RAYMOND M. 1985. Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Can ORSTOM Ser Entomol Méd Parasitol 22:117-121.
- SAUME F. 1986. Efectividad de Vectobac (Bti) sobre poblaciones naturales de larvas de *Aedes aegypti* (L.). Informe Técnico. Unidad de Asesoramiento y Evaluación de Plaguicidas. Fac. Agronomía. UCV. Maracay.
- SAUME F, HERNÁNDEZ A. 1990. Evaluación de la efectividad del Vectobac (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) en el control de *Anopheles emilianus* (*aquasalis*). I Simposio Latinoamericano sobre Biología y Control de Enfermedades Tropicales (Resúmenes). México DF, México.
- SOKAL R, ROLHF F. 1979. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones. 832 p.
- STEEL R, TORRIE J. 1960. Principles and procedures in statistics. McGraw-Hill NY. 481 p.
- TABASHINK B. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. Appl Environ Microbiol 58:3343-3346.
- TOUSIGNANT M, BOISVERT J, CHALIFOUR A. 1992. Reduction of mortality rates of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* aqueous suspensions due to freezing and thawing. J Am Mosq Control Assoc 8(2): 149-155.
- TYRELL D, DAVIDSON L, BULLA L, RAMOSKA W. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. Appl Environ Microbiol 38:656-658.
- UNDEEN A, LACEY L. 1982. Field procedures for the evaluation of *Bacillus thuringiensis* (serotype H-14) against black flies (Simuliidae) and nontarget organism in streams. Misc Publ Entomol Soc Am 12(4):25-30
- VAN ESSEN F, HEMBREE S. 1982. Simulated field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis* against mosquitoes: residual activity and effect of soil constituents. Mosq News 42(1):66-72.
- [WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981. Informal consultation on standardization of *Bacillus thuringiensis* H-14. TDR/BDV/BTH-14/81.1
- [WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1989. Informal consultation on bacterial formulations for cost-effective vector control in endemic areas. WHO/VBC/89.979.
- WRAIGHT S, MOLLOY D, JAMMBACK H, MCCOY P. 1981. Effects of temperature and instar on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 against *Aedes stimulans* larvae. J Invertebr Pathol 38(1): 78-87.
- WU B, CHANG. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. FEBBS Lett 190:232-236.