



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA



EFECTO INSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis var israelensis* CONTRA *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL MUNICIPIO ARISMENDI, ESTADO NUEVA ESPARTA, 2023

Trabajo de investigación presentado como
requisito para aprobar la asignatura por:

Br. Eduard Salas

Br. Maria Vivas

Maracay, Noviembre 2023



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



EFFECTO INSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis var israelensis* CONTRA *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL MUNICIPIO ARISMENDI, ESTADO NUEVA ESPARTA, 2023.

Trabajo de investigación presentado como
requisito para aprobar la asignatura por:

Br. Eduard Salas

Br. Maria Vivas

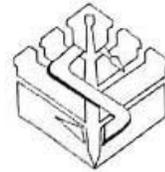
Tutora Científica: Profa. Luisa Figueroa

Tutor Metodológico: Prof. José Romero

Maracay, Noviembre 2023



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS SEDE ARAGUA
PROFESORA "OMAIRA FIGUEROA"
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



VEREDICTO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Trabajo de Investigación titulado: **"Efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis var israelensis* contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Díptera: Culicidae) en el municipio Arismendi, estado Nueva Esparta, 2023."** presentado por los bachilleres Eduard Salas y María Vivas con el fin de aprobar la Asignatura Trabajo de Investigación; después de la exposición y discusión pública del citado trabajo, consideramos que el mismo reúne los requisitos para **APROBARLO** como tal. En fe de lo cual se levanta la presente acta, el día martes catorce del mes de noviembre del año dos mil veintitrés, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actuó como Coordinador del jurado, el Tutor Metodológico Profesor José Romero.

Por otra parte, se hace constar para efectos académicos de convalidación, que el presente trabajo representa el equivalente al Trabajo de Grado reconocido en otras instituciones y el contenido del veredicto es auténtico.

Prof. Luisa Figueroa
C.I.: 13 492 002
Tutora Científica

Dra. Nereida Delgado
C.I.: 6.363.676
Jurado Evaluador

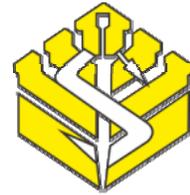
Prof. José Romero
C.I.: 9.327.271
Coordinador del Jurado



TI034-JR-2023



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



Maracay, 14 de noviembre de 2023

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL TUTOR CIENTÍFICO

En mi carácter de Tutor Científico del Trabajo titulado Efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis var israelensis* contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) en el municipio Arismendi, estado Nueva Esparta, 2023., el cual es presentado por los Bachilleres Eduard Salas y Maria Vivas, para aprobar la asignatura Trabajo de Investigación, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado designado.

Prof. Luisa Figueroa

C.I.: 13.492.802

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado primeramente a Dios y a nuestros queridos padres y hermanos, cuyo amor inquebrantable y apoyo incondicional han sido nuestro faro a lo largo de este arduo pero maravilloso camino. Su fe en nosotros y su constante aliento nos han llevado a superar los desafíos y alcanzar este logro. Este trabajo es un tributo a su dedicación y sacrificio, y agradecemos profundamente todo lo que han hecho por nosotros. De igual manera, agradecer a las nueve integrantes de Twice, a mis amigos, mis compañeras de residencia, a los foráneos, profesores, a la profesora Luisa Figueroa por su gran ayuda durante todo este tiempo en el que fue llevado a cabo el trabajo de investigación, licenciados y a todas aquellas personas que de alguna manera aportaron a nuestra investigación y formación.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento al CEEESA (Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental) perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” (SAIAE) por su constante respaldo y apoyo a lo largo de este proyecto de investigación. Su compromiso con la excelencia académica y su infraestructura proporcionaron el entorno ideal para llevar a cabo esta investigación. Asimismo, deseo extender nuestra gratitud por facilitar el acceso a recursos y expertos en el campo, enriqueciendo así nuestra experiencia y contribuyendo de manera significativa a los resultados obtenidos en este trabajo. Sus valiosas contribuciones fueron fundamentales para el éxito de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

	PP
VEREDICTO	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Tipo de investigación	11
Población y muestra	11
Técnicas e instrumentos de recolección de datos	12
Procedimiento experimental	12
Análisis de datos	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABLAS

N°	PP
Tabla I. Efecto insecticida de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Bioensayo N° 1 con formulación de VectoBac® G. Cepas de Nueva Esparta y Rockefeller, 2023	22
Tabla II. Efecto insecticida de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Bioensayo N° 2 con formulación de VectoBac® G. Cepas de Nueva Esparta y Rockefeller, 2023	23
Tabla III. Efecto insecticida de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Bioensayo N° 3 con formulación de VectoBac® G diluido. Cepas de Nueva Esparta y Rockefeller, 2023	23
Tabla IV. Estadística Descriptiva y Análisis de Varianza por una sola vía, de la actividad enzimática en larvas de <i>Aedes aegypti</i> medidos en absorbancia, Municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta, Venezuela, 2023	24

LISTA DE FIGURAS

N°	PP
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> , 2022.....	2
Figura 2. Coordenadas de recolección de cepas de <i>Aedes aegypti</i> en Sabana de Guacuco, Municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta (Google Maps, Febrero 2023).....	14
Figura 3. Aproximación por extrapolación de las concentraciones letales CL_{50} y CL_{95}	25
Figura 4. Representación gráfica de estadística descriptiva para Esterasas α (alfa) en <i>Aedes aegypti</i> de cepa Nueva Esparta y cepa de referencia Rockefeller	25
Figura 5. Representación gráfica de estadística descriptiva para Esterasas β (beta) en <i>Aedes aegypti</i> de cepa Nueva Esparta y cepa de referencia Rockefeller	26
Figura 6. Representación gráfica de estadística descriptiva para Oxidasas en <i>Aedes aegypti</i> de cepa Nueva Esparta y cepa de referencia Rockefeller.....	26
Figura 7. Niveles de Esterasas α en <i>Aedes aegypti</i> del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta.....	27
Figura 8. Niveles de Esterasas β en <i>Aedes aegypti</i> del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta.....	27
Figura 9. Niveles de Oxidasas en <i>Aedes aegypti</i> del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta.....	28
Figura 10. Niveles de Esterasas α en cepas control Rockefeller.....	28
Figura 11. Niveles de Esterasas β en cepas control Rockefeller.....	29
Figura 12. Niveles de Oxidasas en cepas control Rockefeller.....	29

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA

EFFECTO INSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
CONTRA *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) DEL
MUNICIPIO ARISMENDI, ESTADO NUEVA ESPARTA, 2023

Bachilleres:

Br. Eduard Salas

Br. Maria Vivas

Tutora Científica: Profa. Luisa Figueroa

Tutor Metodológico: Prof. José Romero

Maracay, Noviembre 2023

RESUMEN

Las arbovirosis son enfermedades víricas febriles las cuales presentan grandes problemas a la salud pública mundial, perteneciendo la mayoría de reportes a la región de las Américas. Debido a esto se plantea una investigación de la efectividad del *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Aedes aegypti* del municipio Arismendi, estado Nueva Esparta. El estudio se llevó a cabo mediante la exposición de larvas tercer instar de *Aedes aegypti* a diferentes concentraciones del biolarvicida obteniéndose una aproximación de las concentraciones letales CL₅₀ y CL₉₅ de 9.8 ppm y 14 ppm, respectivamente. Los resultados revelaron un alto porcentaje de mortalidad en las poblaciones de mosquitos tratadas con el *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, lo que sugiere una alta susceptibilidad del vector a esta bacteria. Además, se realizó un análisis del sistema enzimático de las poblaciones de mosquitos expuestas a la bacteria, donde se obtuvo los siguientes resultados de esterases α (F=251), esterases β (F=208) y oxidasas (F=9.29), con un valor de P<0.0001, que reveló diferencias significativas entre los valores de la cepa de campo con la cepa Rockefeller, sin embargo no están operando como mecanismos de resistencia a la bacteria, ya que se evidenció el mismo comportamiento en los bioensayos, lo que indica la ausencia de mecanismo de resistencia metabólica en la cepa en estudio. De esta manera, se concluye en que *Aedes aegypti* es susceptible a la bacteria *Bti*, y la ausencia de desarrollo de resistencia en las poblaciones de mosquitos expuestas. Estos resultados respaldan la viabilidad de utilizar *Bti* como una herramienta prometedora en la lucha contra las arbovirosis, siendo significativo para la salud pública y la gestión de vectores.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Bioinsecticidas, Arbovirosis

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA

INSECTICIDE EFFECT OF *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
AGAINST *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)
FROM THE ARISMENDI MUNICIPALITY, NUEVA ESPARTA STATE, 2023

ABSTRACT

Arboviruses are febrile viral diseases which present great problems to public health worldwide, with most of the reports belonging to the region of the Americas. Due to this, an investigation of the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Aedes aegypti* from Arismendi municipality, Nueva Esparta state is proposed. The study was carried out by exposing third instar larvae of *Aedes aegypti* to different concentrations of the biolarvicide, obtaining an approximation of the lethal concentrations LC₅₀ and LC₉₅ of 9.8 ppm and 14 ppm, respectively. The results revealed a high percentage of mortality in the mosquito populations treated with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, suggesting a high susceptibility of the vector to this bacterium. In addition, an analysis of the enzyme system of mosquito populations exposed to the bacterium was performed, where α esterases (F=251), β esterases (F=208) and oxidases (F=9.29) were observed, with a value of $P < 0.0001$, which revealed significant differences between the values of the field strain with the Rockefeller strain, however they are not operating as mechanisms of resistance to the bacterium, since the same behavior was evidenced in the bioassay, indicating the absence of metabolic resistance mechanism in the strain under study. Thus, it is concluded that *Aedes aegypti* is susceptible to the bacterium *Bti*, and the absence of resistance development in the exposed mosquito populations. These results support the feasibility of using *Bti* as a promising tool in the control of arboviruses, being significant for public health and vector management.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Bioinsecticide, Arboviruses

INTRODUCCIÓN

El aumento en la incidencia y distribución geográfica de las arbovirosis conforma uno de los principales problemas en cuanto a salud pública en la región de las Américas. La incidencia del dengue ha tenido tendencia alcista en las últimas décadas en la región, donde se ha pasado de una endemicidad baja a hiperendemicidad. Además de la reaparición del virus del dengue y del virus de la fiebre amarilla, nuevos arbovirus patógenos antiguos confinados en regiones específicas del mundo, como el virus del chikungunya y el virus del Zika, han causado recientemente diversas pandemias con importante morbilidad (Espinal *et al.*, 2019).

El mosquito *Aedes aegypti*, vive en hábitats urbanos y se reproduce principalmente en recipientes artificiales. Los huevos de éste vector pueden permanecer secos en sus lugares de cría durante más de un año y eclosionar al entrar en contacto con el agua (Navarro *et al.*, 2021).

Una de las características que distingue a *Aedes aegypti* de otras especies de mosquitos es su habilidad de completar su desarrollo preadulto en una gran variedad de recipientes naturales y artificiales; Esto es debido al aumento acelerado en el número de criaderos larvales generados por la actividad humana como consecuencia de patrones culturales y tradicionales, garantizando una permanente disponibilidad de criaderos potenciales para esta especie (Marquetti *et al.*, 2005).

Bezerra (2022) en cuanto al ciclo biológico señala que el *Aedes* tarda en promedio 3 a 10 días para desarrollarse, viviendo aproximadamente 1 mes. El ciclo de vida de este mosquito comienza en el agua estancada donde de huevo se transforma en larva y luego a pupa. A continuación, se transforma en el mosquito listo para reproducirse. Las fases de su ciclo de vida son: Huevo, que puede permanecer hasta 8 meses inactivos pegados arriba de la línea del agua, incluso en un lugar seco y en el frío intenso, hasta encontrar las condiciones ideales para transformarse en larva (calor y estar cubierto por agua), así la larva vive en el agua, se alimenta de protozoarios, bacterias y hongos presentes en el agua y en tan solo 5 días se convierte en pupa; ésta vive en el agua donde continúa desarrollándose, transformándose en un mosquito adulto en 2 a 3 días; el mosquito adulto está listo para volar y reproducirse, pero para esto necesita alimentarse de sangre humana o de animales, momento en el que ocurre la transmisión de las enfermedades. Es importante mencionar que en promedio una hembra del mosquito puede producir 3000 huevos en todo su ciclo reproductivo.

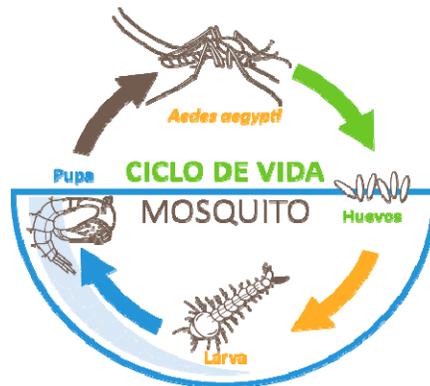


Figura 1. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*, 2022

Fuente: Unidad de Control de Vectores de Puerto Rico

Las medidas de reducción de criaderos y los programas de saneamiento ambiental, tal como lo señalan Montada *et al.* (2005) aunque son importantes dentro de las estrategias, no han sido suficientes para el control de *Aedes aegypti* (Linnaeus), cuyo control se ha logrado principalmente por métodos químicos. Sin embargo, el uso continuo de insecticidas químicos clorados en la década de los 70, trajo como consecuencia el desarrollo de altos niveles de resistencia al DDT y otros organoclorados, por lo que en los programas de control se introduce otro grupo de insecticidas, los organofosforados, específicamente Temephos granulado aplicado en recipientes de agua doméstica y considerado uno de los mejores químicos controladores de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* y concomitantemente Malation para el control de adultos.

Desafortunadamente en los últimos años Chavez *et al.*, (2005); Braga *et al.*, (2004); Rodríguez *et al.*, (1999); Mazzarri y Georghiou (1995) han reportado poblaciones resistentes al Temephos en Cuba, Brasil, Perú y Venezuela y debido a los programas extensivos (durante 15 años o más) de rociamiento con Malation en algunas áreas del caribe, poblaciones de *Aedes aegypti* han desarrollado diferentes niveles de resistencia a este insecticida (Rawlins, 1998; Mazzarri y Georghiou, 1995; Mekiura *et al.*, 1991; Rawlins y Ragoonansingh, 1990; Georghiou *et al.*, 1987).

(Molina de Fernández *et al.*, 2016) en su estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la region central de Venezuela a insecticidas químicos mencionan que las esterasas elevadas han estado involucradas en la resistencia a los insecticidas organofosforados y en menor medida en la resistencia a los piretroides y carbamatos, donde encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en las cepas evaluadas

que indican que este mecanismo pudiera estar asociado con los valores encontrados de sobrevivencia a los organofosforados. Aun cuando no se hicieron estudios genéticos, el principal mecanismo de resistencia metabólica ocurre debido a un incremento en expresión o actividad de tres de las principales familias de enzimas dentro de las cuales están involucradas las esterasas (Hemingway & Ranson, 2000; Flores *et al.*, 2006). Bioquímicamente, las esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida secuestrando a este, antes de que llegue a su sitio de acción, lo que requiere altas cantidades de estas enzimas, desencadenando la sobreproducción enzimática y por ende el desarrollo de resistencia (Karunaratne *et al.*, 1993).

Con respecto a las oxidasas de función múltiple el citocromo P450 comprende un grupo de 100 enzimas diferentes en insectos, ellas pueden agruparse dentro de familias de acuerdo a sus secuencias de aminoácidos y sus relaciones filogenéticas, catálisis de la inserción de uno de los átomos de oxígeno molecular (O₂) dentro de un sustrato, y esta oxidación podría resultar en la activación o detoxificación de insecticidas piretroides y organofosforados. La diversidad del Citocromo P450 es conferida por la existencia de múltiples isoformas P450, diferentes patrones de expresión y amplio espectro de sustrato. La detoxificación mediada por Citocromo P450 monoxigenasas es un mecanismo de resistencia muy importante y no solo confiere altos niveles de resistencia, sino que provee resistencia cruzada a una amplia gama de compuestos por la variedad de sustratos que esta enzima puede metabolizar. La resistencia a insecticidas por el Citocromo P450 resulta de la sobreexpresión de los miembros de una o más familias del Citocromo P450 antes que mutaciones en la estructura de sus genes. Este tipo de enzimas es responsable de la resistencia a organofosforados, piretroides y en menor extensión a carbamatos (Hemingway y Ranson,

2000; Hemingway *et al.*, 2004; Hemingway, 2000; Pasteur y Raymond, 1996; Ranson *et al.*, 2002).

Polanczyk *et al.*, (2003) señala que la principal táctica adoptada para el combate de mosquitos es el uso masivo de productos químicos para el control de adultos y larvas. Sin embargo, el uso intensivo de agentes químicos aumenta el costo del control y puede afectar la salud pública. Actualmente, el principal problema del uso de pesticidas químicos para el control es el desarrollo de resistencia, lo que resulta en la reducción de la eficiencia del producto debido a la muerte de todos los individuos susceptibles, dejando solo a aquellos inmunes al producto. Una alternativa para evitar este problema es el uso de productos con diferentes modos de acción. Estos productos actúan en más de un proceso bioquímico y/o fisiológico, matando al insecto de diferentes maneras. La bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) tiene tres toxinas Cry diferentes (cristal tóxico) y una Cyt (toxina con actividad citolítica y hemolítica).

Bacillus thuringiensis pertenece al reino *Eubacteria*, a la familia *Bacillaceae* y al género *Bacillus* junto con *B. cereus* y *B. anthracis*, de los cuales se diferencia por la formación de una inclusión parasporal refringente al microscopio de contraste de fases. La inclusión parasporal, puede ocupar hasta el 30% de la célula y se produce en la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria. Esta inclusión está conformada por diversas estructuras proteicas, denominadas Cry y Cyt (Portela-Dussán *et al.*, 2013).

Los cristales de *Bacillus thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño per se, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva. Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial. Luego, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular. Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula y aumenta el número de receptores; por ende, recluta un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial. Por otro lado, con base en experimentos in vitro y bioensayos, se propone que la unión de los monómeros a caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina. Este último clivaje induce el ensamble de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario como puede ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina. Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, esto provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular. El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y lleva a la muerte del insecto. La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele del insecto. Broderick *et al.* (2006) descartaron estas posibilidades y demostraron que la mortalidad inducida por *Bacillus thuringiensis* dependería en esencia de ciertas bacterias entéricas que son parte de la microbiota del intestino del insecto susceptible, ya que sólo *B. thuringiensis* no sería suficiente. Estas bacterias serían responsables de

causar la septicemia en el insecto luego de que *B. thuringiensis* les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal (Sauka y Benintende, 2008).

Por otro lado, las toxinas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cry11Ba y Cry30) y Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba) extraídas del *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, se emplean para el control de larvas de *Aedes aegypti*, así como para estadios inmaduros de otros géneros vectores de enfermedades, como *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* (Soares-da-Silva *et al.* 2015); no obstante, la aplicación de *Bti* en el control del mosquito vector del dengue, el Chikungunya y el Zika, a nivel mundial, no es frecuente, probablemente, debido a los problemas inherentes a su uso, tasa de ingestión, edad y densidad de las larvas, temperatura, radiación solar, costos, entre otras (Land *et al.* 2019). Adicionalmente, estudios en campo y laboratorio en poblaciones del género *Aedes* utilizando *Bti*, no muestran el desarrollo de resistencia, incluso, después de 36 años de uso continuo y más de 5.000 toneladas de este producto, en 400mil ha (Becker *et al.* 2018; da Silva *et al.* 2018).

Debido a su capacidad de combatir insectos plagas sin afectar el medio ambiente, y no generar reacciones adversas en el ser humano u otros seres vivos, el uso de productos a base de *Bt*, ha aumentado constituyendo del 1 al 2% del mercado global de insecticidas, dejando ganancias de 8 billones de dólares por año (Portela-Dussán *et al.*, 2013).

Además, el *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no es tóxico para los humanos, una característica muy importante, ya que los agentes de control se aplican generalmente en áreas urbanas, con personas cercanas a la fumigación. Otro hecho importante es la posibilidad de que *Bti* se use junto con productos químicos para aumentar la eficiencia del control (Chui *et al.*, 1995).

Delgado (2005) en su trabajo acerca de los factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela se utilizaron distintas formulaciones de VectoBac, Teknar y una formulación experimental microencapsulada de *Bti* (M-*Bti*), donde se obtuvo como resultado que un 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. Se sugirió la necesidad de evaluar el efecto de factores extrínsecos e intrínsecos a las formulaciones de *Bti*, con el fin de utilizar aquellas que sean las más eficaces, en función de las características del criadero y de la especie a controlar.

Aguirre Obando *et al.*, (2020) en su investigación respecto al control de *Aedes aegypti* utilizando *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en Armenia, Quindío, Colombia, como resultado de los bioensayos indican que las poblaciones del vector analizadas son susceptibles al *Bti*, por presentar una respuesta biológica similar a la obtenida en la cepa de referencia Rockefeller. Se concluye que la aplicación sostenida de *Bti* constituye una alternativa viable para el control de poblaciones de *Aedes aegypti*, a largo plazo.

Pires *et al.*, (2020) en su investigación respecto a la susceptibilidad de los mosquitos vectores de la ciudad de Praia, Cabo Verde, a Temephos y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, este estudio muestra la tolerancia al larvicida Temephos aplicado en Cabo Verde en diferentes grados, en el vector principal de la malaria *Anopheles arabiensis* en el país lo que implica que una gran atención debe concederse su uso en el programa de control de vectores del país. Por otra parte, confirma la susceptibilidad total de estos mosquitos a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

Rebaza-Sánchez *et al.*, (2020) evaluaron la actividad larvicida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* y *Beauveria bassiana* sobre larvas del III estadio de *Aedes aegypti*, demostrándose que tanto *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* como *Beauveria bassiana* producen mayor mortalidad en relación directa a la concentración e inversamente al tiempo, concluyendo que *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* y *Beauveria bassiana* a las diferentes concentraciones utilizadas en los bioensayos, presentó una alta actividad larvicida en *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio.

Viana *et al.*, (2021) en su trabajo de investigación acerca de la actividad larvicida de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* en condición de campo simulada cuyo objetivo fue evaluar los factores involucrados en la eficiencia del VectoBac® WG, fue demostrado que aunque las condiciones climáticas influyen en la actividad del larvicida VectoBac® WG, demostró que *Bti* tiene una capacidad de reciclaje durante 77 días, por lo tanto, la

persistencia del bacilo en el medio ambiente mostró su eficiencia en el control de larvas de *Aedes aegypti*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar en condiciones de laboratorio, el efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Aedes aegypti* provenientes del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta, 2023

Objetivos específicos

1. Determinar concentración diagnóstica de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta, 2023
2. Identificar mecanismos de resistencia metabólica a insecticidas químicos en *Aedes aegypti* del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta, 2023

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación

Se trató de una investigación de tipo experimental, debido a que bajo un ambiente en el cual se manipularon las variables, se evaluó la disminución o permanencia de la población en análisis; de carácter exploratorio, ya que puede dar pie a futuras investigaciones acerca del efecto larvicida del *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; positivista con carácter cuantitativo, porque se emplearon datos numéricos obtenidos como fundamentos para probar la hipótesis y de tipo transversal, donde el experimento y la recolección de datos fueron llevadas a cabo en un momento determinado.

Población y muestra

La población estuvo conformada por una cepa de larvas *Aedes aegypti* que se recolectó en el municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta y fueron criadas en el laboratorio entomológico del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón (SAIAE) en Maracay, Estado Aragua, ente adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).

La muestra consistió en 2200 larvas de *Aedes aegypti* de 3^{er} instar seleccionadas al azar.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Los datos fueron recolectados por medio de la observación de los cambios ocurridos en las larvas de *Aedes aegypti*, y los resultados obtenidos fueron registrados a diario en base a la supervivencia o muerte de las larvas.

Procedimiento experimental

Cría de larvas de *Aedes aegypti* y mantenimiento de la colonia

Se recolectaron las cepas del municipio Arismendi, Sabana de Guacuco mediante un procedimiento de recogida en criaderos de larvas en pozos de agua estancadas en el sector, se colocaron en bolsas plásticas con agua y aire, posteriormente fueron llevadas al laboratorio entomológico del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón (SAIAE) en Maracay, Estado Aragua donde se procedió a la cría, bioensayos y selección del mosquito a ser estudiado, en este caso *Aedes aegypti*, cuyos huevos fueron depositados en tiras de papel y resguardados para la investigación en condiciones de laboratorio.

Se escogieron las tiras de papel con los huevos de las cepas de *Aedes aegypti* a eclosionar (preservados con anterioridad). Después se tomaron 10 cubetas rectangulares de un litro de capacidad y se le agregaron 500 mL de agua de chorro a cada una. Se colocaron las tiras contenidas de los huevos de *Aedes aegypti* en iguales proporciones a cada cubeta y se le agregaron dos pizcas de alimentos a las mismas, este alimento consistió en una mezcla de alimentos para peces y cachorros en proporción 50/50,

posteriormente se pasó por una licuadora y luego por un tamiz para separar las partículas. Se cubrieron las cubetas con tapas que contenían dentro un tul muy fino (Tercero y Medrano, 2019).

Al siguiente día se retiraron las tiras con los huevos que no eclosionaron; los que eclosionaron se alimentaron diariamente hasta obtener larvas de III estadio, las cuales serán empleadas para los experimentos.

Al cambiar de cuarto estadio a pupas, se separaron, fueron colocadas en un envase pequeño y se llevaron a una jaula de tul muy fino. De esta manera, se colocó un envase oscuro de aproximadamente 250 mL, revestido con tiras de servilletas para que las hembras ovipusieran (para así poder volver a repetir los pasos antes mencionados con los huevos obtenidos) y en una fiola que contenía un algodón empapado con solución glucosada al 5%, que fue el alimento de los machos y hembras; el mismo fue sustituido por un nuevo envase cada vez que la cantidad de solución disminuía en exceso. Una vez que las pupas pasaron a adultos, las hembras se aparearon con los machos y con la finalidad de que las mismas desarrollaran los huevos y ovipusieran en las tiras de servilleta que se encontraban en el envase oscuro pequeño, se les ofreció una paloma con la parte ventral desnuda y expuesta para que las hembras de *Aedes aegypti* se alimentaran.

Mediante este procedimiento se recolectaron los adultos y los huevos para luego ser eclosionados y convertirse en larvas para la realización de los experimentos, de las cuales se utilizó la generación filial dos.

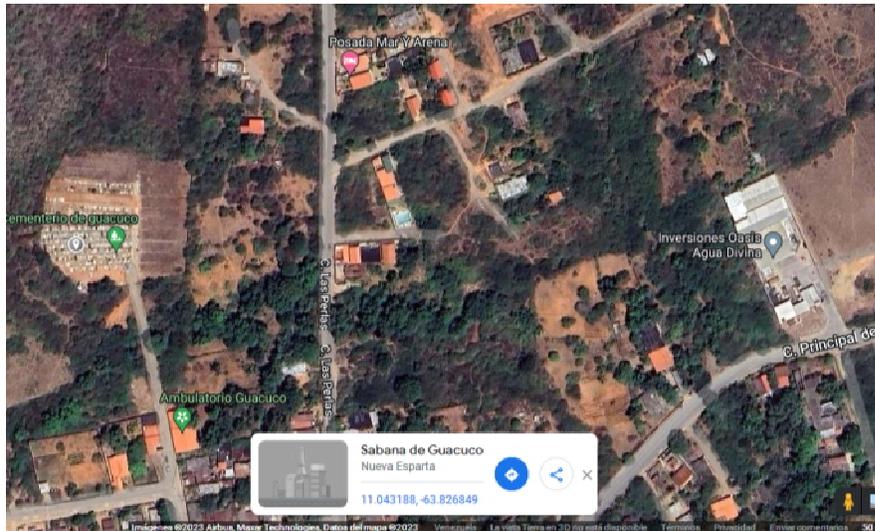


Figura 2. Coordenadas de recolección de cepas de *Aedes aegypti* en Sabana de Guacuco, Municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta (Google Maps, Febrero 2023)

Identificación morfológica de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Para lograr la identificación morfológica de *Aedes aegypti* se buscaron las siguientes características para diferenciarlos de las especies de *Aedes albopictus*:

En cuanto a los adultos de *Aedes aegypti* presenta escamas claras en el pedicelo, clípeo con escamas claras, la superficie anterior del fémur medio se caracteriza por la presencia de una línea delgada de escamas blancas y los esternitos abdominales III-IV están cubiertos por escamas claras. Mientras que en el caso de *Aedes albopictus* son escamas oscuras en el pedicelo, clípeo completamente oscuro, la superficie anterior del fémur medio se caracteriza por la presencia de una línea de escamas oscuras y los esternitos abdominales III-IV están cubiertos por escamas oscuras. Con respecto a la identificación de larvas de *Aedes aegypti* las características que

permitieron distinguirlas fueron el pelo cefálico superior o inferior simple, espina torácica lateral en forma de uña y escamas del peine con tres dientes laterales y una espina central. En cambio *Aedes albopictus*, el pelo cefálico superior e inferior es doble, espina torácica lateral roma y escamas del peine con muchos dientes pequeños y una espina central (Balta, 1997).

Preparación de VectoBac® G (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*)

La preparación consistió en VectoBac® G ingrediente activo: 200 Unidades Toxicas Internacionales [UIT]/mg de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. [0.20% x 99,80%] del cual se añadieron los gránulos directamente. El modo de empleo fue mediante dispersión manual del granulo previamente pesado mediante una microbalanza.

La dosis recomendada del producto para la aplicación en el control de mosquitos:

- 5 – 10 kg/ha
- 10 – 20 kg/ha

Por consecuente, fueron utilizadas diferentes concentraciones variando el peso de cada granulo del bioplaguicida.

Determinación de concentración diagnóstica

La dosis diagnóstica es la dosis de insecticida que mata el 100% de mosquitos susceptibles en un tiempo dado. El tiempo esperado para que el insecticida cumpla este objetivo (100% de mortalidad) es llamado tiempo de diagnóstico (CDC, 2023).

Bioensayo para evaluar el efecto de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* mediante el uso de VectoBac® G

Los bioensayos de laboratorio, usados para probar la susceptibilidad de las larvas (Organización Mundial de la Salud, 1981), fueron aplicados para determinar la efectividad de VectoBac® G (ingrediente activo: 200 Unidades Tóxicas Internacionales [UIT]/mg de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, con una dosis recomendada por el fabricante de 5 – 10 kg/ha dependiendo de la densidad de larvas y que fue realizado en base a 100 mL, por ende el ingrediente activo tuvo una concentración de 2 ITU/100 mL. En los ensayos, las larvas fueron expuestas a cinco concentraciones de VectoBac® G. Se hicieron cinco repeticiones cada una de 20 larvas de III estadio tardío y se introdujeron en vasos de 175 mL que contenían las distintas concentraciones de ensayo, para las distintas concentraciones fue utilizada una microbalanza, con el fin de obtener los diferentes pesos de cada granulo. Además de los 25 vasos con la inclusión del ingrediente activo, se usaron 5 vasos para los controles, donde cada uno contenía 20 larvas de III estadio tardío sin bioplaguicida en el solvente. De igual manera se procedió con la cepa de referencia Rockefeller para comparar susceptibilidad. Para minimizar la variabilidad debida a la condición nutricional y metabólica, las larvas no fueron alimentadas durante las 24h antes o durante la prueba. El número de supervivencia fue contada a las 24h. La muerte o la falta de reacción a la punción suave con una pipeta de vidrio fue la mortalidad medida.

Bioensayo para evaluar el efecto de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* mediante el uso de VectoBac® G diluido

Se prepararon cinco diluciones de VectoBac G que contenían gránulos con diferentes pesos obtenidos mediante una microbalanza, disueltos en 100 mL de agua destilada estéril. Cada una de las diluciones correspondió a las distintas concentraciones del producto a usar.

El ensayo fue aplicado mediante diluciones seriadas de 1/100000; 1/10000; 1/1000; 1/100 y 1/10. Cuyas concentraciones fueron de 2.84 ppm, 3.86 ppm, 3.88 ppm, 4.08 ppm y 5.0 ppm en base a 100 mL, respectivamente.

A cada una de las dosis se le realizaron cinco repeticiones por cada concentración establecida, colocando 20 larvas de III estadio tardío, tanto de la cepa Nueva Esparta como cepa Rockefeller para su comparación, en cada recipiente plástico según la metodología propuesta por Busvine en 1957.

Identificación de mecanismos de resistencia

Se supone que existe resistencia si una proporción de la población experimental sobrevive a la dosis diagnóstica en el tiempo de diagnóstico. Los mosquitos que sobrevivan al ensayo biológico pueden servir para pruebas de identificación de mecanismos de resistencia mediante pruebas enzimáticas o métodos moleculares. Los mosquitos sobrevivientes pueden ser fácilmente transferidos de los vasos a un recipiente acondicionado para

separarlos de los muertos. Los mosquitos que serán sometidos luego a pruebas enzimáticas deben ser congelados (-20° C).

Bioensayo para identificar los mecanismos de resistencia metabólica en *Aedes aegypti*

Las larvas sobrevivientes a las 24 horas de exposición al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los bioensayos fueron seleccionadas para determinar los mecanismos de resistencia in vitro. A través del método bioquímico se detectó el tipo de actividad enzimática presente, que se llevó a cabo por microtitulación.

El mecanismo de resistencia metabólica principal se debe al incremento de la actividad de las esterasas y en menor medida con la actividad de las oxidasas (Molina *et al.*, 2015).

Se trituraron las larvas en un recipiente para microcentrifugación y se determinó el complejo enzimático (esterasas alfa, beta y oxidasas) utilizando soluciones y reactivos diferentes para comprobar la existencia de cada uno y lograr su cuantificación. Para todos los ensayos se empleó buffer fosfato a pH distintos.

Las esterasas según Raymond *et al.* (1987) se clasifican en la dependencia de la habilidad de hidrolizar los sustratos en dos tipos; las que hidrolizan preferentemente el naftilacetato y, las que hidrolizan particularmente el 2-naftilacetato. La mayoría de los insecticidas de hoy son

ésteres, y por ende estas enzimas son extremadamente importantes como agentes defensivos en el mosquito.

Las Oxidasas (citocromo P450, oxidasas microsomales, etc.) juegan un papel determinante tanto en insectos susceptibles como en resistentes, siendo el retículo endoplásmico el organelo celular en donde se asocian las diversas enzimas que constituyen el complejo FOM; en insectos se localiza en el cuerpo graso, tubos de Malpighi y tracto digestivo, por lo que se le considera la primera defensa contra agentes tóxicos lipofílicos de carácter xenobióticos (Lagunes y Rodriguez, 1985).

Se centrifugaron las mezclas a -4 grados C por 5 minutos, tomando cada larva como un individuo y colocando cada una en un pocillo diferente de la placa de microtitulación.

En la pruebas de las Esterasas se añadieron 50 uL de α -naftil acetato y beta-naftil acetato a cada 50 uL del homogenato mediante una placa de transferencia de boquilla 96. Fue incubada a temperatura del laboratorio (aproximadamente 25 C) durante 20 minutos. Y se añadieron 30 uL de Dianisidina a cada pocillo de la prueba. Se incubó la microplaca durante dos minutos y se realizó la lectura correspondiente con el lector de ELISA.

En cuanto a las Oxidasas fue preparado el reactivo de 3,3,4,4-tetrametilbenzidina (TMBZ), que contenía 6.3 mg; 3.13 mL de metanol y 9.4

mL de buffer acetato a un volumen final de 12.5 mL. Y posteriormente se añadieron 30 uL de peróxido de hidrogeno a cada pocillo de la prueba.

Se midió la absorbancia utilizando un filtro de 620nm y se determinó la concentración del complejo enzimático seleccionado para el análisis del mecanismo de resistencia empleado por las larvas de tercer instar.

Análisis de datos

Se realizó una base de datos en Excel para el almacenamiento y análisis de los datos. Los resultados de los bioensayos fueron utilizados para la determinación de una aproximación mediante extrapolación de las concentraciones letales (CL_{50} y CL_{95}) (Delgado, 2005). Además se utilizó el programa STATISTIX versión 8.0, 2003, para la realización de una estadística descriptiva y análisis de varianza por una sola vía, de la actividad enzimática, como mecanismos de resistencia de las cepas en estudio.

RESULTADOS

Se realizaron tres bioensayos para evaluar el efecto de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en larvas de 3^{er} instar de *Aedes aegypti*

En los bioensayos de la Tabla I y Tabla II se utilizó la formulación de VectoBac® G, el cual ocasionó el 100% de mortalidad en cepas Nuevas Esparta y Rockefeller, en este ensayo se utilizó la microbalanza para realizar el pesado de cada grano, con la finalidad de obtener diferentes concentraciones y posteriormente la realización del bioensayo.

En la Tabla III fue empleado la formulación de VectoBac® G, en esta ocasión siendo diluido. Se prepararon cinco diluciones de VectoBac G que contenían gránulos con diferentes pesos obtenidos mediante una microbalanza, disueltos en 100 mL de agua destilada estéril, en el cual se obtuvo un 0% de mortalidad en ambas cepas.

La concentración letal (CL₅₀ y CL₉₅) obtenida para larvas de *Aedes aegypti* aproximadamente fueron de 9,8 ppm y 14 ppm, respectivamente, donde probablemente este rango de concentraciones causó el 50% y el 95% de mortalidad larvaria (Figura 3).

En la tabla IV se muestra el ANOVA de una sola vía para los mecanismos de resistencia, el cual reveló diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre las poblaciones de cepa rock y la cepa Nueva Esparta para esterases α (alfa) ($F=251$). De igual manera, se encontraron diferencias

significativas ($p < 0.0001$) entre las cepas del estudio para esterasas β (beta) ($F=208$). Y en el caso de las oxidasas también se observó diferencias significativas ($p < 0.0001$) ($F=9,29$). Así mismo en las figuras 4–6, se muestran los diagramas de cajas y bigotes para representar gráficamente la estadística descriptiva de las concentraciones enzimáticas evaluadas.

La frecuencia de valores de Esterasas α (alfa) para larvas de *Aedes aegypti* oscilaba entre 0,1 y 1,3 (Figura 7); para Esterasas β (beta), entre 0,1 y 0,6 (Figura 8); y para Oxidasas, entre 0,0 y 0,2 (Figura 9). Y en el caso de la cepa de referencia Rockefeller se obtuvieron unos valores para Esterasas α (alfa) entre 0,1 y 0,3 (Figura 10); para Esterasas β (beta), entre 0,4 y 1,0 (Figura 11); y para Oxidasas, entre 0,1 y 0,3 (Figura 12).

Tabla I. Efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti*. Bioensayo N° 1 con formulación de VectoBac® G. Cepas de Nueva Esparta y Rockefeller, 2023

Concentraciones	% de Mortalidad
1. 7.57 ppm (1514 UTI)	100%
2. 7.28 ppm (1456 UTI)	100%
3. 6.2 ppm (1240 UTI)	100%
4. 6.16 ppm (1232 UTI)	100%
5. 5.64 ppm (1128 UTI)	100%

Tabla II. Efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti*. Bioensayo N° 2 con formulación de VectoBac® G. Cepas de Nueva Esparta y Rockefeller, 2023

Concentraciones	% de Mortalidad
1. 40.88 ppm (8176 UTI)	100%
2. 34.12 ppm (6824 UTI)	100%
3. 29.77 ppm (5954 UTI)	100%
4. 24.49 ppm (4898 UTI)	100%
5. 14.48 ppm (2896 UTI)	100%

Tabla III. Efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti*. Bioensayo N° 3 con formulación de VectoBac® G diluido. Cepas de Nueva Esparta y Rockefeller, 2023

Concentraciones	% de Mortalidad
1. 5.0 ppm (1000 µL)	0%
2. 4.08 ppm (100 µL)	0%
3. 3.88 ppm (10 µL)	0%
4. 3.86 ppm (1 µL)	0%
5. 2.84 ppm (0.1 µL)	0%

Tabla IV. Estadística Descriptiva y Análisis de Varianza por una sola vía, de la actividad enzimática en larvas de *Aedes aegypti* medidos en absorbancia, Municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta, Venezuela, 2023

MECANISMO	LOCALIDAD	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	F* (ANOVA)	P*
EST α (alfa)	Rockefeller	80	0,2489	0,0226	251	<0,0001
	Nueva Esparta (NE)	80	0,7549	0,0226	251	<0,0001
EST β (beta)	Rockefeller	80	0.6699	0.0159	208	<0,0001
	Nueva Esparta (NE)	80	0.3465	0.0159	208	<0,0001
MFO	Rockefeller	80	0.1481	4.675E-03	9,29	<0,0001
	Nueva Esparta (NE)	80	0.1279	4.675E-03	9,29	<0,0001

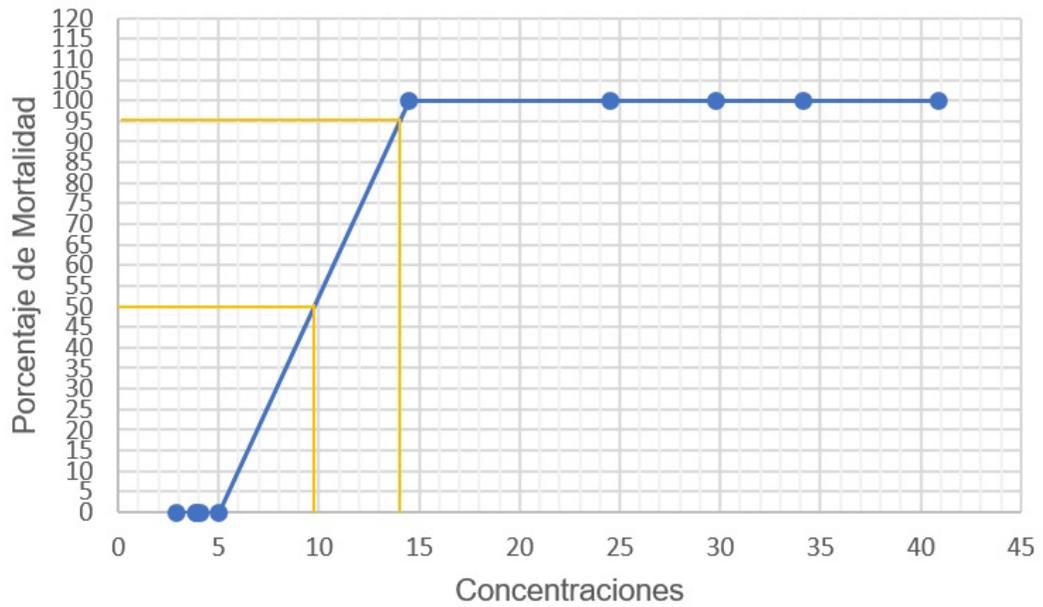


Figura 3. Aproximación por extrapolación de las concentraciones letales CL₅₀ y CL₉₅

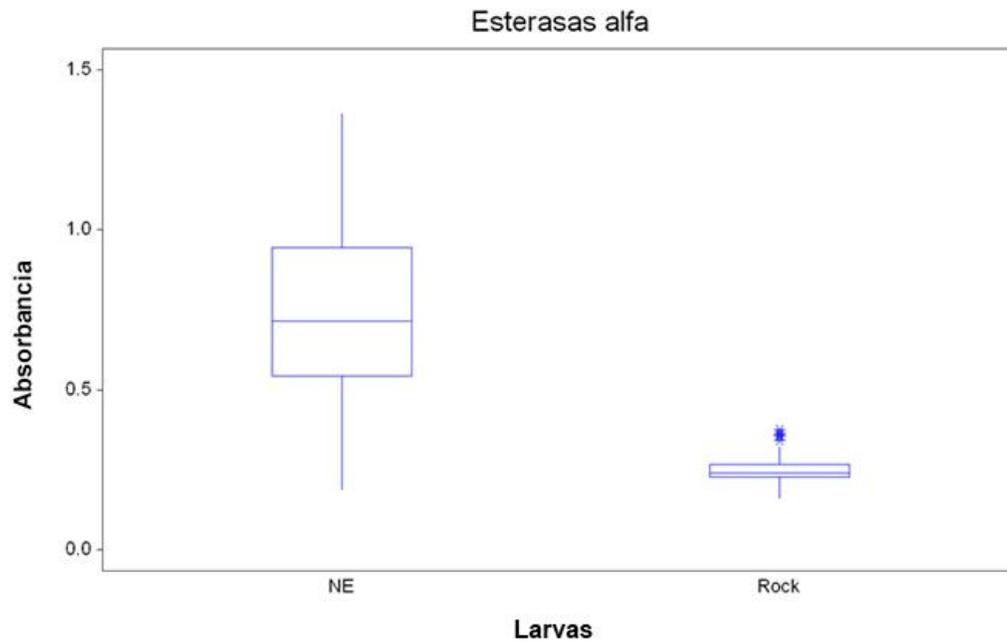


Figura 4. Representación gráfica de estadística descriptiva para Esterasas α (alfa) en *Aedes aegypti* de cepa Nueva Esparta y cepa de referencia Rockefeller

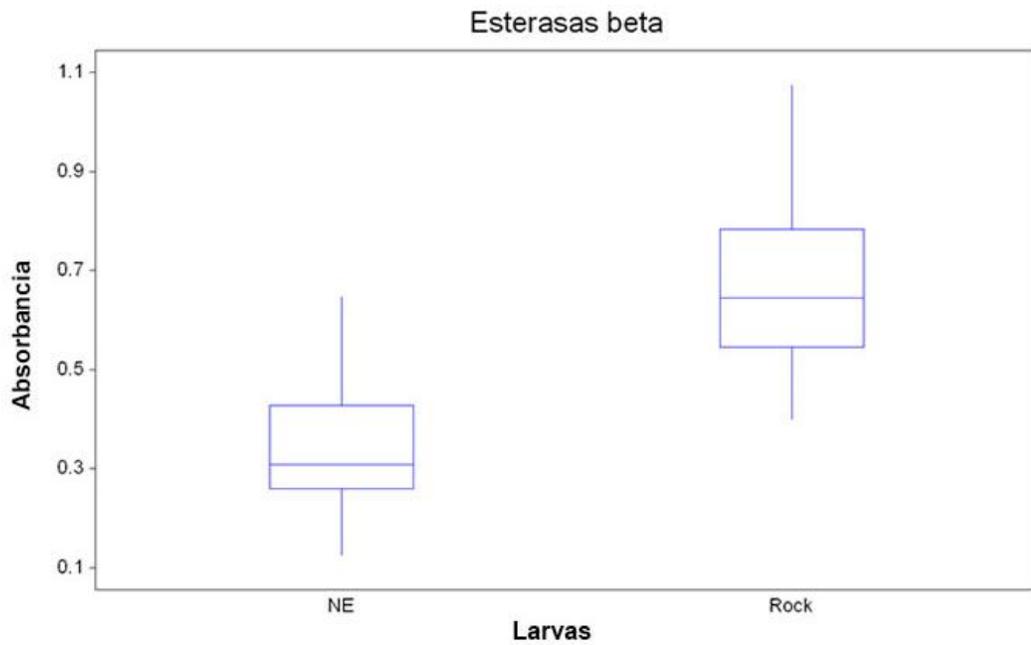


Figura 5. Representación gráfica de estadística descriptiva para Esterasas β (beta) en *Aedes aegypti* de cepa Nueva Esparta y cepa de referencia Rockefeller

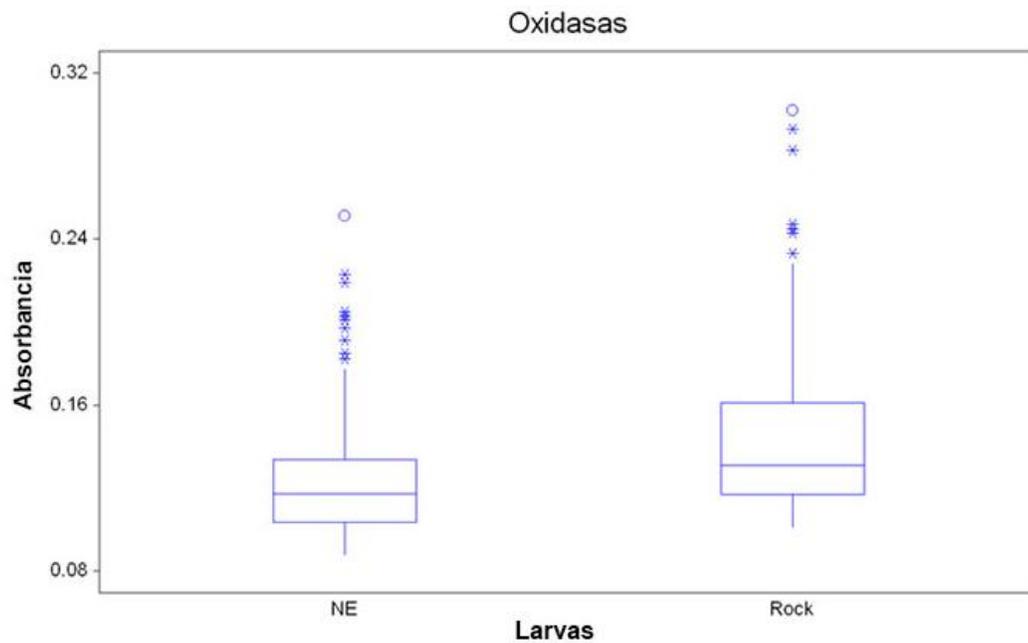


Figura 6. Representación gráfica de estadística descriptiva para Oxidasas en *Aedes aegypti* de cepa Nueva Esparta y cepa de referencia Rockefeller

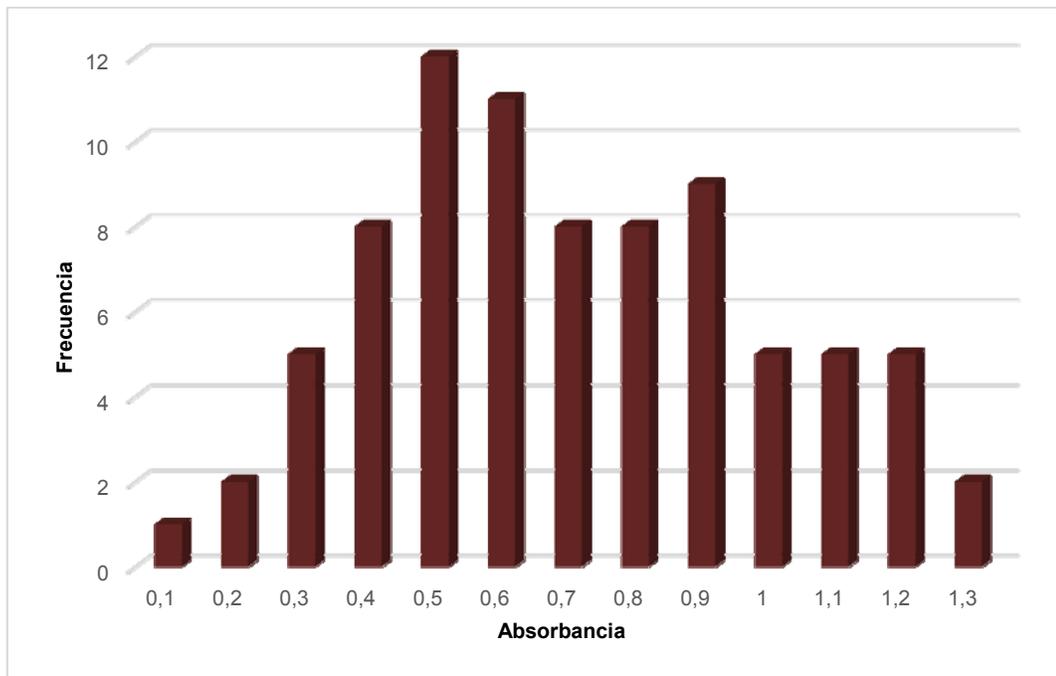


Figura 7. Niveles de Esterasas α en *Aedes aegypti* del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta

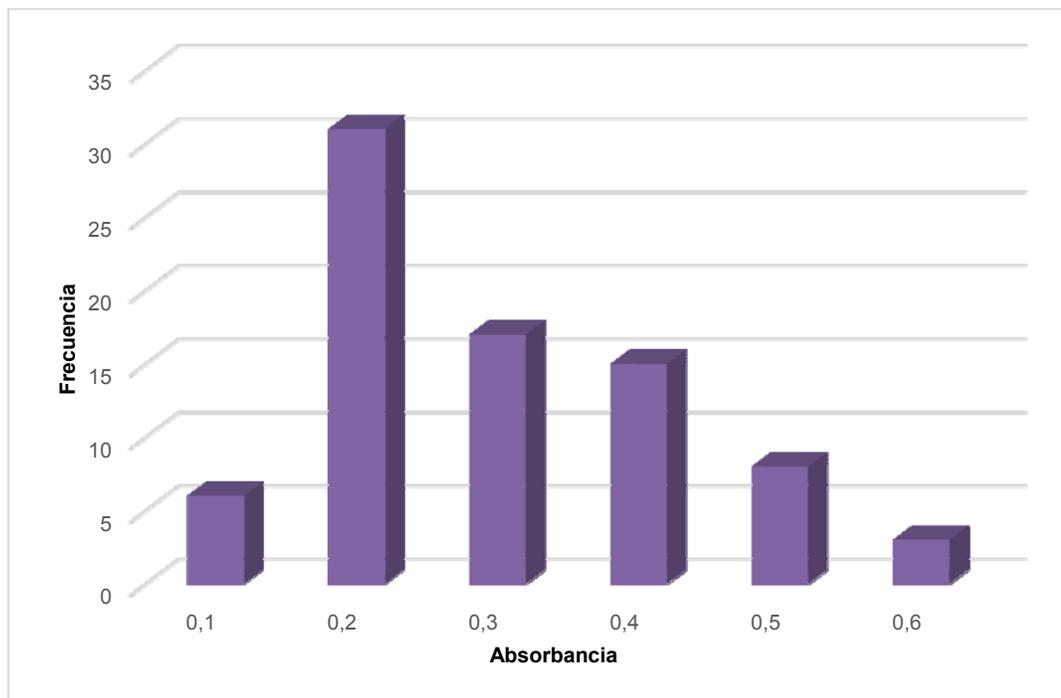


Figura 8. Niveles de Esterasas β en *Aedes aegypti* del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta

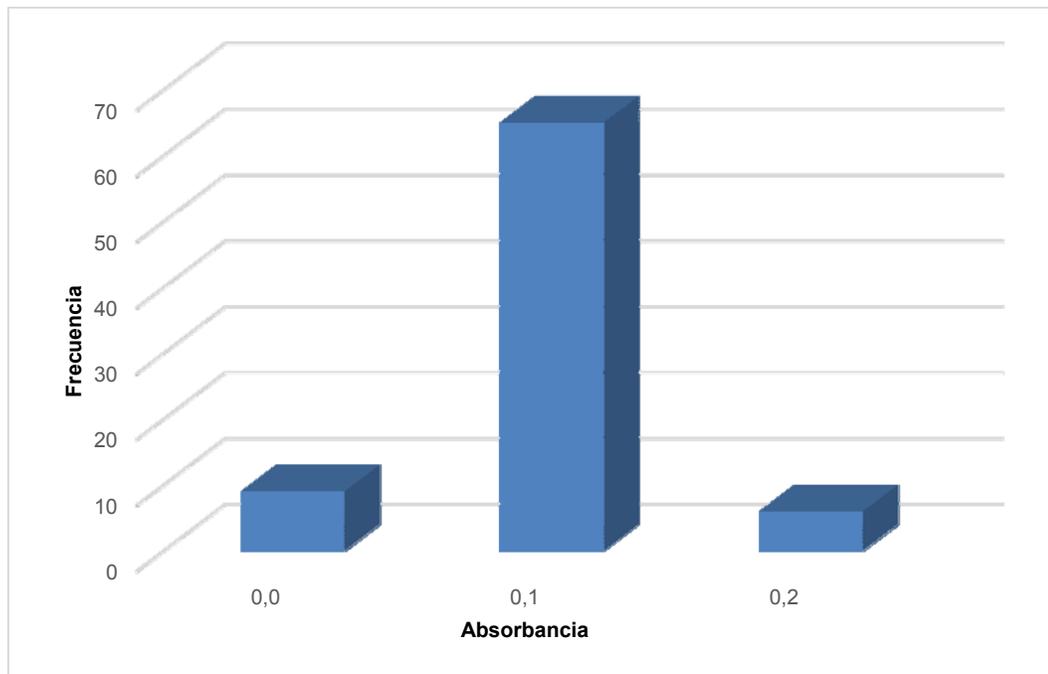


Figura 9. Niveles de Oxidasas en *Aedes aegypti* del municipio Arismendi, Estado Nueva Esparta

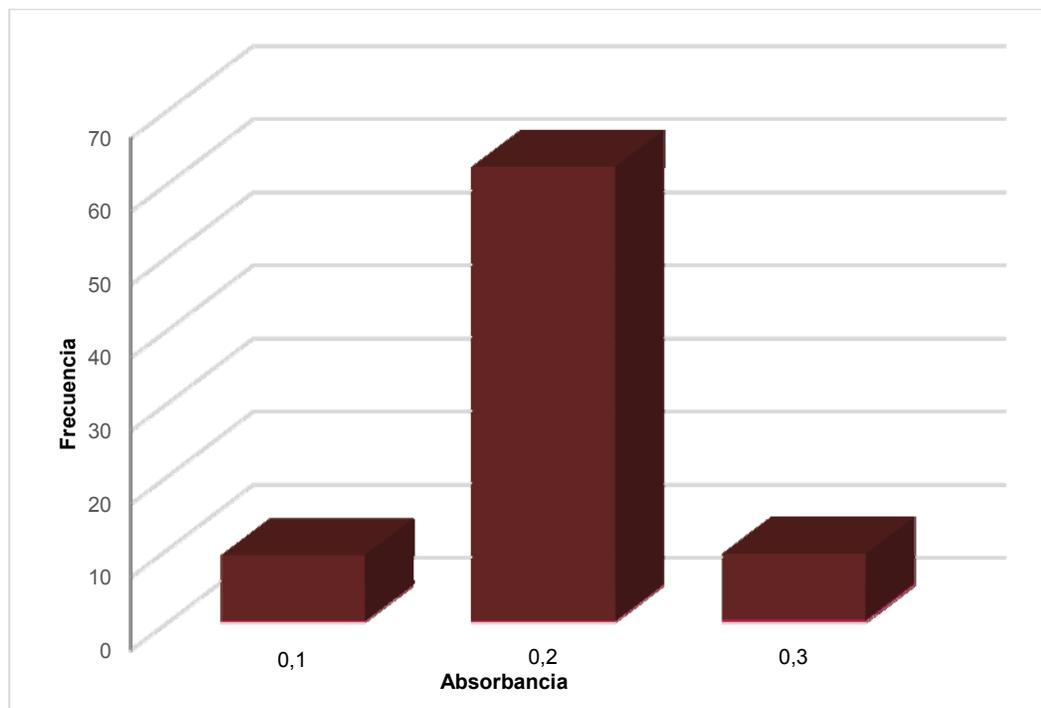


Figura 10. Niveles de Esterasas α en cepas control Rockefeller

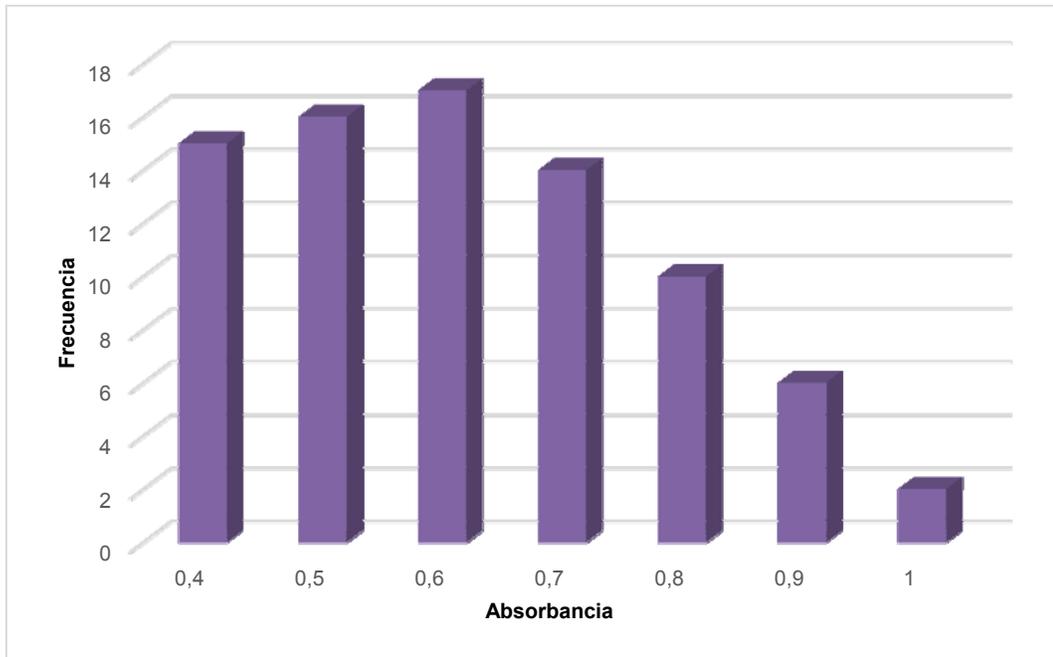


Figura 11. Niveles de Esterasas β en cepas control Rockefeller

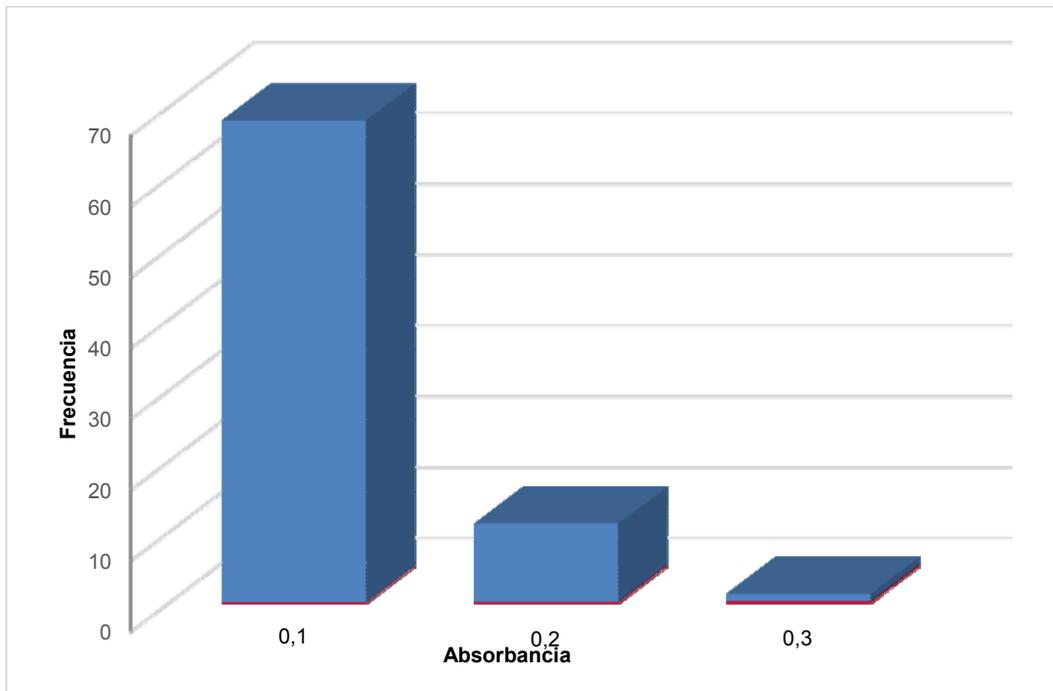


Figura 12. Niveles de Oxidasas en cepas control Rockefeller

DISCUSIÓN

Durante la evaluación de la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para el control de larvas de *Aedes aegypti*, se encontró que las concentraciones del insecticida biológico en el rango de 9,8 ppm a 14 ppm aproximadamente ocasionaron mortalidad de la población larvaria.

De esta manera, *Aedes aegypti* fue encontrado susceptible al insecticida biológico *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, dichos resultados son discutidos en base a otros estudios previos tales como:

Andrade *et al.* (1991) en su investigación acerca de la susceptibilidad de las larvas de *Aedes aegypti* colectadas en campo, evaluó el tiempo letal (LT₅₀) y mortalidad final, siendo tratada la muestra con Temefos, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* o mezclas de estos dos agentes. Las larvas del tercer estadio fueron más susceptibles al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* que las del principio o del final del cuarto instar. La supervivencia de algunos individuos a los tratamientos con Temefos sugiere la posibilidad de resistencia.

El rápido modo de acción de las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra las larvas de *Aedes aegypti* ha sido reportado desde el descubrimiento de este entomopatógeno. Concentraciones experimentales muy altas, como 900.000 ITU/L frente a larvas de tercer estadio o 12.000 U¹⁷" contra larvas de cuarto estadio de

Aedes aegypti son capaces de causar LT⁵⁰ en intervalos de tiempo tan cortos como 12 o 25 min, respectivamente.

Resultados que demuestran que existe una susceptibilidad de *Aedes aegypti* al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, cuya rapidez en el modo de acción va a depender en este caso, de las concentraciones usadas. En este caso se trabajó en base a concentraciones recomendadas y diluidas en un tiempo estándar de 24 horas en condiciones de laboratorio.

Duque y Navarro (2005) en su estudio de susceptibilidad de larvas de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) de Sao Paulo, Brasil al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-141 se evaluaron diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Desde 0,50 ppm hasta 0,01 ppm, para determinar los límites de mortalidad de las larvas, variando entre 99% y 1%. Se establecieron las siguientes concentraciones: 0.03 ppm, 0.12 ppm, 0.18 ppm y 0.25 ppm para *Aedes albopictus* y 0.03 ppm, 0.06 ppm, 0.18 ppm y 0.25 ppm para la colonia referencia de *Aedes aegypti* Rockefeller CDC (Center for Disease Control) de Puerto Rico.

En los resultados de Duque y Navarro (2005) como consecuencia de las diferentes dosificaciones del producto, se obtuvo la respuesta al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en porcentajes de mortalidad, resultando que la concentración letal que causó mayor mortalidad fue la de 0,25 ppm y la que originó menor mortalidad fue de 0,03 ppm. El análisis Probit arrojó la CL₅₀ de 0,12 ppm y la CL₉₅ de 0,36 ppm para *Aedes albopictus* y la CL₅₀ de 0,07 ppm y CL₉₅ de 0,17 ppm para la colonia referencia.

Hubo diferencia significativa en la respuesta a las concentraciones letales entre las especies. La colonia de *Aedes aegypti* (Rockefeller CDC) fue más susceptible que la de *Aedes albopictus*. Dentro de las posibles explicaciones es que especies con mayor tiempo de estabilización en laboratorio, sin exposición a ningún insecticida, tienden a ser más susceptibles (Thiéry *et al.* 1999).

En base a los resultados obtenidos y comparándolos con la investigación de Duque y Navarro (2005) en nuestra investigación no hubo diferencias entre las concentraciones y el porcentaje de mortalidad ocasionado por el *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, ya que, en los bioensayos aplicados el resultado fue el mismo tanto para las larvas de *Aedes aegypti* de Nueva Esparta y la cepa de referencia Rockefeller.

Cabe recalcar, que el producto Bactimos® (1.200 UTI) utilizado por Ali *et al.* (1995) tiene la misma potencia que VectoBac® AS, a pesar de esto, no es suficiente para asegurar que los resultados sean similares; este producto tiene una presentación en polvo que se disuelve en agua más lentamente que la formulación líquida. El tipo de presentación (polvo, líquido o tabletas) utilizada por las diferentes empresas fabricantes de estos productos puede alterar la respuesta cuando es aplicado en los mosquitos (Skovmand *et al.* 1998).

Dicho esto, los valores obtenidos en nuestra investigación son concentraciones aproximadas que pueden causar el 50% y 95% de mortalidad siendo estas 9,8 ppm y 14 ppm (CL₅₀ y CL₉₅) respectivamente,

hay que tener en cuenta que fue trabajado con VectoBac G® (200 UTI) y que fue llevado a 100 mL (2 UTI). Y por esto puede deberse la diferencia de valores obtenidos para cada investigación.

Con relación a la presencia de resistencia metabólica por parte del vector, *Aedes aegypti* contra *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* tenemos que se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos entre la cepa de Nueva Esparta y Rockefeller en la determinación de las enzimas Esterasas α (alfa), β (beta) y Oxidasas, pero que a pesar de estas diferencias no se encontraron mecanismos de resistencia activos contra la bacteria en la cepa de Nueva Esparta en estudio. Tales resultados son debatidos en base a otras investigaciones previas tales como:

En Alemania, luego de 10 años de aplicación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* la población de *Aedes vexans* tratada permaneció susceptible a este agente en comparación al área no tratada. El uso de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en programas de control de *Aedes aegypti* demuestra que constituye una alternativa efectiva para el control larval de una amplia variedad de especies de culícidos en criaderos naturales o artificiales ya que la mayoría de las poblaciones de campo de mosquitos que han sido expuestas a aplicaciones repetidas de este biolarvicida durante varios años, no han desarrollado resistencia a la bacteria hasta el momento (Setha *et al.*, 2007; Lacey, 2007).

A pesar de no presentar mecanismos de resistencia activos donde se vean alteradas las Esterasas alfa (α), beta (β) y Oxidasas principalmente,

puede verse alterados cuando se usa el *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en conjunto con insecticidas químicos.

Según Almeida *et al.* (2014) mencionan que la resistencia a los insecticidas que tienen como ingrediente activo a *Bacillus thuringiensis* fue reportada en experimentos de laboratorio con especies de la familia Culicidae, debido a la confirmación de la reducción de la eficiencia de estos productos. Goldman *et al.* (1986) encontraron resistencia en *Aedes aegypti* después de la 14 generación, a través de la selección artificial de individuos.

Se ha comprobado recientemente el desarrollo de resistencia de los culícidos a las proteínas Cry debido a la observación de algunos patrones según Wirth *et al.* (2012). Stalinski *et al.* (2014) estudiaron el desarrollo de resistencia en *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis*, verificando la aparición de la resistencia para las mismas toxinas estudiadas por Wirth *et al.* (2012). En Cuba los resultados indican que hasta el momento no existen evidencias de disminución de la susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis* en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* en las zonas muestreadas, por lo que puede contribuir una alternativa para el control del vector, pero se sugiere una estrategia adecuada ante la potencialidad de desarrollo de resistencia (Gato *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- *Aedes aegypti* es susceptible al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* obteniéndose concentraciones aproximadas de CL₅₀ y CL₉₅ de 9,8 ppm y 14 ppm, respectivamente.
- Los sistemas enzimáticos de Esterasas alfa (α), beta (β) y Oxidasas, no están operando como mecanismos de resistencia a la bacteria, siendo indicativo de que la cepa en estudio es susceptible.
- Las diferencias significativas encontradas en la determinación de las enzimas Esterasas alfa (α), beta (β) y Oxidasas pueden estar relacionadas a la presión de insecticidas químicos aplicados en Sabana de Guacuco, municipio Arismendi, estado Nueva Esparta.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar los estudios con insecticidas biológicos, para *Aedes aegypti* así como *Aedes albopictus* debido a su importancia en la salud pública como vectores potenciales de arbovirosis.
- Se recomienda que en próximos estudios donde se obtengan valores intermedios de mortalidad larvaria en los bioensayos, determinar con exactitud las concentraciones letales mediante un análisis de regresión lineal Probit.
- Se recomienda realizar estudios más específicos para la determinación de resistencia metabólica en *Aedes aegypti*.
- Se sugiere realizar estudios para la búsqueda de mecanismos de resistencia específicos para el *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre Obando, O. A., & Duarte, I. 2020. Control de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* utilizando *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en Armenia, Quindío, Colombia. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 23. <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1067>
- Ali, A., Nayar, A. J., Xue, R. 1995. Comparative toxicity of selected larvicides and insect growth regulators to a Florida Laboratory population of *Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association 11(1): 72-76.
- Almeida, M. A., Soccol, T., Soccol C. 2014. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. Rev Biotechnol, 1-10.
- Andrade, C. F. S. y Modolo, M. 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. Revista de Saude Publica, 25(3): 184 – 187. <https://doi.org/10.1590/s0034-89101991000300004>
- Balta León, R. 1997. Guía práctica para la identificación de *Aedes aegypti*: Ministerio de Salud, Lima, Perú.
- Becker, N.; Ludwig, M.; Su, T. 2018. Lack of resistance in *Aedes vexans* field populations after 36 years of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* applications in the Upper Rhine Valley, Germany. J. AM. Contr. Assoc. 34(2):154-157.
- Bezerra, C. 2022. Mosquito *Aedes aegypti*: características y ciclo de vida. <https://www.tuasaude.com/es/aedes-aegypti/>
- Braga, I. A., Pereira, J.B., Da Silva S., Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 99 (2): 199-203.

- Broderick, N., Raffa, K., Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 15196-9
- Busvine, J. R. 1957. A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides. Commonwealth Institute of Entomology
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2023. Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante el ensayo biológico de la botella de los CDC
- Chavez, J., Cordova, O., Vargas, F. 2005. Niveles de susceptibilidad a temefos en el vector transmisor del dengue en Trujillo, Perú. Anales de la Facultad de Medicina Lima 66(1): 53- 56.
- Chui, V. W. D., Wong, K. W., & Tsoi, K. W. 1995. Control of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) using *Bti* and teflubenzuron: Laboratory evaluation and semi-field test. Environment International, 21(4): 433-440. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(95\)00037-1](https://doi.org/10.1016/0160-4120(95)00037-1)
- Da Silva, K.; Crespo, M.; Araújo, A.; Silva, R.; Melo Santos, M.; Oliveira, C.; Silva Filha, M. 2018. Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. Parasites & Vectors. 11(1):673. 10.1186/s13071-018-3246-1
- Delgado, N. 2005. Evaluación de la eficacia de un insecticida biológico mediante análisis Probit. Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV.
- Delgado, 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: 213-233.

- Duque, J. E., y Navarro, M. A. 2005. Susceptibilidad de larvas de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) de Sao Paulo, Brasil al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-141. Revista Colombiana de Entomología, 31(2): 199–201.
- Espinal, M. A., Andrus, J. K., Jauregui, B., Waterman, S. H., Morens, D. M., Santos, J. I., Horstick, O., Francis, L. A., & Olson, D. 2019. Emerging and reemerging *Aedes*-transmitted arbovirus infections in the region of the Americas: Implications for health policy. American Journal of Public Health, 109: 387–392. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304849>
- Flores, A. E., Grajales, J. S., Salas, I. F., Garcia, G. P., Becerra, M. H., Lozano, S., Brogdon, W. G., Black, W. C., & Beaty, B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association, 22(4), 672–677. [https://doi.org/10.2987/8756-971x\(2006\)22\[672:moirif\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2987/8756-971x(2006)22[672:moirif]2.0.co;2)
- Gato, R.; Díaz, M.; Bruzón, R.; Menéndez, Z.; González, A.; Hernández, Y. y García, I. 2007. Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Rev Cubana Med Trop, 60(1): 74-7.
- Georghiou, G. P., Wirth, M., Tran, H., Saume, F., Kriudsen, B. 1987. Potential for organophosphates resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. Journal of Medical Entomology. 24: 290-294.
- Goldman, I. F.; Arnold, J.; Carlton, B. C. 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in field and in laboratory population of the mosquitos *Aedes aegypti*. J Invertebr Pathol, 47:317-24.
- Google Maps. 2023. [Sabana de Guacuco]. Recuperado de <https://maps.app.goo.gl/k49PKTL7ZqF2zNET9>

- Hemingway J. y Ranson H. 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu Rev. Entomol.* 45: 371-391.
- Hemingway, J. 2000. The Molecular Basis of Two Contrasting Metabolic Mechanisms of Insecticide Resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1009-1015
- Hemingway, J.; Hawkes, N. J.; McCarroll, L. y Ranson, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 653–665
- Karunaratne S., Jayawar-Dena K., Hemingway J. y Ketterman A. 1993. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J.* 339: 575-579.
- Lacey, L. A. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc.* 23(2): 133-63.
- Lagunes, T.A. y Rodríguez, M.J.C. 1985. Análisis toxicológico de áreas agrícolas. En: *Temas Selectos de Manejo de Insecticidas Agrícolas*. Sociedad Mexicana de Entomología (2): 1-17. Recuperado de <https://es.slideshare.net/AcademiaDeIngenieriaMx/avances-en-el-desarrollo-de-estrategias-para-el-uso-racional-de-insecticidas-en-mxico>
- Land, M.; Bundschuh, M.; Hopkins, R.; Poulin, B.; McKie, B. 2019. What are the effects of control of mosquitoes and other nematoceran diptera using the microbial agent *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) on aquatic and terrestrial ecosystems? A systematic review protocol. *Environ. Evidence.* 8(1):32.
- Marquetti, M. D. C., Suárez, S., Bisset, J., & Leyva, M. 2005. Reporte de hábitats utilizados por *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, Cuba. *Revista cubana de medicina tropical*, 57: 159-161.

- Mazzarri, M. B. y Georghiou, G. P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11: 315-322.
- Mekiura, Y., Gwinn, T. A., Williams, D. C., Tidwell, M.A. 1991. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo, Dominican Republic. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7: 69 – 72.
- Molina de Fernández, D., Bastidas Beltrán, D., Molina, N., Figueroa, L., Navarro, J. C., Guerra, A., González Rivas, J., Sánchez, V., y Ramírez, R. 2016. Estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela a insecticidas químicos. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 56(1), 30–42.
- Molina, D., Bastidas, D., Molina, N., Figueroa, L., Guerra, A., González, J., Ramírez, R. 2015. Estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela a insecticidas químicos. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 56(1), 30-42.
- Montada, D., Rodríguez, M., Suarez, S., Sanchez, D., Leyva, M. 2005. Estado de la resistencia a insecticidas en adultos del mosquito *Aedes aegypti* del municipio Playa, Ciudad de la Habana, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 57: 137-142.
- Navarro, A. V., Vázquez, E. B., Casas, A. S., Ledezma, J. C. R., & Palafox, J. L. I. (2021). Infección por Dengue, un problema de salud pública en México. *Journal of negative & no positive results*, 6(2), 293–306. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.3771>
- Organización Mundial de la Salud. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquitoes larvae to insecticide.

- Pasteur, N. y Raymond, M. 1996. Insecticide Resistance Genes in Mosquitoes: Their Mutations, Migrations, and Selection in Field Populations. *Journal of Heredity* 87: 444- 449
- Pires, S., Alves, J., Dia, I., & Gómez, L. F. 2020. Susceptibility of mosquito vectors of the city of Praia, Cabo Verde, to Temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *PLoS One*, 15(6), e0234242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234242>
- Polanczyk, R. A., Garcia, M. de O., & Alves, S. B. 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de saude publica*, 37(6): 813-816. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102003000600020>
- Portela-Dussán, D. D., Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*, 11(20), 87. <https://doi.org/10.22490/24629448.1031>
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H., & Feyereisen, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* (New York, N.Y.), 298(5591), 179–181. <https://doi.org/10.1126/science.1076781>
- Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Revista Panamericana American Journal Public Health* 4: 243-251.
- Rawlins, S. C. y Ragoonansingh, R. 1990. Comparative organophosphorus insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites moctezuma*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6: 315-319.

- Raymond, M., Pasteur, N., Georghiou, G. P., Mellon, R. B., Wirth, M. C., Hawley, M. 1987. Detoxification esterases new to California in organophosphate-resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* (24): 24-9.
- Rebaza-Sánchez, N., Zavaleta-Espejo, G., Blas-Cerdán, W., Saldaña-Jiménez, J., & Pedro-Huaman, J. 2020. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* and *Beauveria bassiana* on *Aedes aegypti*. *Rebiol*, 40(1), 53–68. doi:10.17268/rebiol.2020.40.01.07
- Rodríguez, M. M.; Bisset, J. A.; Mila, L.; Calvo, E.; Diaz, C.; Soca, L. A. 1999. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 51:83-88.
- Sauka, D. H., & Benintende, G. B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40: 124-140.
- Setha T, Chantha N, Socheat D. 2007. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis*, VectoBac® WG and DT, formulations against dengue mosquito vectors in cement potable water jars in Cambodia. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health*. 38: 261-8.
- Skovmand, O., Thiery, I., Benzon, G. L., Sinégre, G., Monteny, N., Becker, N. 1998. Potency of products based on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: inter laboratory variations. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14(3): 298-304.
- Soares Da Silva, J.; Pinheiro, V.; Litaiff Abreu, E.; Polanczyk, R.; Tadei, W. P. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev. Bras. Entomol.* 59:01-06.

- Stalinski, R.; Tetreau, G.; Gaude, T.; Despre's, L. 2014. Pre-selecting resistance against individual *Bti* Cry toxins facilitates the development of resistance to the *Bti* toxins cocktail. *J Invertebr Pathol*, 119: 50-53.
- Tercero, N. G. y Medrano, S. X. 2019. Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti*, UNA, CNDR y POLISAL – UNAN – MANAGUA, Tesis de pregrado. Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada.
- Thiéry, I.; Fouque, F.; Gaven, B.; Lagneau, C. 1999. Residual activity of *Bacillus thuringiensis* servars medellin and jegathesan on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(3): 371-379.
- Viana, J. L., Neta, M. dos R. A. V., Silva, J. S. da, Andrade, A. T. dos S., Bezerra, J. M. T., Tadei, W. P., & Pinheiro, V. C. S. 2021. Larvicide activity of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. in simulated field condition / Atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. em condição simulada de campo. *Brazilian Journal of Development*, 7: 43248-43264. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-676>
- Wirth, M. C.; Walton, W. E.; Federici, B. A. 2012. Inheritance, stability, and dominance of Cry resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) selected with the three Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Med Entomol*, 49: 886-94.