



Artículo Original

Efecto biocida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante sobre larvas III de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio

Biocidal effect of *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutant on larvae III of *Aedes aegypti* under laboratory conditions

Willian Blas-Cerdán¹, Gina Zavaleta-Espejo¹, José Saldaña-Jiménez¹,
Willian Blas-Roeder² y Deyvi Meléndez-Rodríguez¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. ²Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo.

RESUMEN

Se evaluó el efecto biocida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante sobre larvas III de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio. Para ello se utilizó una formulación comercial como testigo (2000 ppm) y tres formulaciones de Bti mutante a tres concentraciones (3000, 4000 y 5000 ppm) y larvas de *A. aegypti* obtenidas a partir de huevo bajo un sistema de iluminación constante, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y pH de 7.0. La aplicación de las formulaciones se realizó en vasos descartables conteniendo 100 mL de agua destilada con 25 larvas para cada una de las concentraciones consideradas. Las evaluaciones de mortalidad larvaria se hicieron a partir de las 40 horas después de la aplicación, ocurriendo el mayor efecto larvicida con la formulación del Bti mutante 2 a 4000 ppm, la misma que presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a las otras formulaciones utilizadas. Se determinó que no existe relación directa entre la producción del bioinsecticida Bti mutante y la actividad biocida sobre las larvas III de *A. aegypti*.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Aedes aegypti*, mutante, bioinsecticida, formulación

ABSTRACT

Biocidal effect of *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutant strain on larvae III of *Aedes aegypti* under laboratory conditions was examined. For this, a commercial formulation was used as control (2000 ppm) and three formulations of mutant Bti (3000, 4000 and 5000 ppm) and *A. aegypti* larvae, which were obtained from eggs under a constant lighting system, at a temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and a pH of 7.0. The application of the formulations was carried out in disposable cups containing 100 mL of distilled water with 25 larvae for each of the concentrations considered. The evaluations of larval mortality were made from 40 hours after the application, with the highest larvicidal effect with the mutant Bti 2 (4000 ppm formulation), which presents significant differences ($p < 0,05$) with respect to the other formulations used. It was determined that there is no direct relationship between the production of the Bti mutant bioinsecticide and the biocidal activity on larvae III of *A. aegypti*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Aedes aegypti*, mutant, bioinsecticide, formulation

INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti, es el vector del virus que ocasiona el Dengue, una enfermedad muy frecuente en el hombre, constituyéndose en un severo problema de salud pública, especialmente en países tropicales donde las condiciones ambientales favorecen su desarrollo y proliferación. Se estima que anualmente se presentan 50 millones de casos en el mundo¹. Así mismo en el Perú el primer caso de Dengue se registró en 1852, en 1990 en Iquitos y Tarapoto se reportó una epidemia de 150000 personas infectadas, y en Trujillo se diagnosticaron 7000 casos de Dengue clásico durante el año 2000².

El Dengue se transmite por la hembra *A. aegypti* cuyo hábito alimenticio, hematófaga, favorece la propagación de la virosis. Su ciclo biológico presenta dos etapas bien diferenciadas, la fase acuática de huevo, larva y pupa; y la fase aérea de adulto o imago. El periodo larval comprende cuatro estadios: I, II, III y IV, siendo los tres primeros los más voraces, obteniendo su alimento del agua que se encuentra en recipientes naturales o artificiales. El periodo larval transcurre entre 5 a 7 días en condiciones favorables de alimentación y a 27° C de temperatura; el ciclo completo puede durar entre 10 a 15 días, dependiendo de las condiciones ambientales³.

Hasta el momento el uso del larvicida temephos y cipermetrinas para adultos de *A. aegypti* han tenido buenos resultados, sin embargo se ha informado casos de resistencia. Ante ello, una posible alternativa para solucionar el problema de resistencia es el control biológico, definido como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente cuyos productos reducen sus efectos. Así mismo se ha reportado la existencia de más de 1500 especies de microorganismos entomopatógenos, entre los cuales las bacterias son de mayor importancia, constituyendo los bioinsecticidas^{4,5}.

Bacillus thuringiensis (Bt), es una bacteria que se encuentra en la flora natural del suelo, de forma bacilar, Gram positiva, anaeróbica facultativa y formadora de esporas; esta bacteria produce toxinas altamente específicas contra insectos⁶, cuya producción comercial se realiza por fermentación en grandes biorreactores. Primero se propaga en una fase vegetativa y exponencial; cuando un compuesto nutritivo del medio se agota, la bacteria entra en fase de esporulación sintetizando las proteínas toxigénicas en forma de cristales. Después de terminada la esporulación, las células se lisan por completo liberándose la espora y los cristales paraesporales; luego de la citólisis, la masa de la espora es aproximadamente 15% de la célula vegetativa y el cristal es del orden del 12% al 17% de la misma^{7,8}. Durante muchos años se pensó que *Bt* era un patógeno exclusivo de lepidópteros, porque solo se aislaron cepas activas de este grupo de insectos. Sin embargo, en 1978 De Barjac describió la variedad israelensis, que actúa en forma muy específica contra mosquitos de los géneros *Cúlex*, *Anopheles* y *Aedes*⁹.

Los cristales son protoxinas formados por la glucoproteína δ - endotoxina, de elevado peso molecular (130 a 140 Kda), las que se presentan en forma bipiramidal, cuboide, esférica o compuesta^{10, 11,12}. La δ - endotoxina es efectiva solamente cuando es ingerida por insectos que tienen en las membranas de sus células epiteliales del intestino medio, receptores específicos para ligar dicha toxina^{13,14}.

Determinados agentes ambientales, físicos o químicos pueden alterar la estructura molecular del ADN, provocando una mayor frecuencia de mutaciones, a los mismos que se les denomina mutágenos o agentes mutagénicos. Dentro de los mutagénicos químicos se encuentran el 5-Bromouracilo, etil metano sulfonato (EMS), ácido nitroso, cloruro de hidroxilamina, naranja de acridina, entre otros, pudiéndose agruparse en varias categorías como: análogo de bases, hidroxilantes, desaminantes, alquilantes e intercalares¹⁵. El naranja de acridina, es un colorante catiónico selectivo de los ácidos nucleicos y se encuentra dentro de los agentes mutagénicos intercalares, integrándose entre las bases nitrogenadas del ADN¹⁶.

Se han reportado trabajos en *Escherichia coli*, *Rhizobium sp.* y *Drosophila melanogaster*, donde se confirma su actividad mutagénica en concentraciones que van de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Los mutantes

obtenidos de *E. coli* tratados con naranja de acridina resultaron con una mayor actividad de la enzima penicilina G-acylicasa, en tanto se sugiere que se podría utilizar para la producción de otros metabolitos secundarios en otros organismos ^{17, 18}.

En la actualidad *Bti* es el producto comercial de mayor difusión y uso a nivel internacional por su alta especificidad, inocuidad para el hombre, animales y plantas, al no dejar residuos tóxicos en el ambiente ¹⁹. Debido a la importancia de *Bti* en la producción de bioinsecticida, cuyos genes se encuentran muy emparentados entre sí, se ha creído conveniente desarrollar una nueva estrategia que permita incrementar el control de larvas de *A. aegypti* utilizando *Bti* mutante inducido con naranja de acridina.

Por lo antes expuesto se pretende conocer el efecto biocida de *Bti* mutante sobre larvas III de *A. aegypti* bajo condiciones de laboratorio; esperando que a mayor concentración de *Bti* mutante mayor será la mortalidad de larvas III de *A. aegypti*. Por otro lado la presente investigación tiene como finalidad determinar las diferentes concentraciones de *Bti* mutante con mayor actividad larvicida, así como establecer la relación entre la producción de *Bti* mutante y su acción biocida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se usaron larvas de *A. aegypti* obtenidas de huevos de la cepa Rockefeller, proporcionado por el Laboratorio de Protozoología de la Facultad de Ciencias Biológicas; Bioinsecticidas: una formulación comercial de *Bti* "Lepibac" P.M. y formulaciones de *Bti* mutante inducidas con naranja de acridina ²⁰; conservadas a -4°C.

Obtención de larvas III de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

Los huevos de *A. aegypti* se colocaron en fuentes de plástico de 20 por 30 cm. con agua destilada hasta su eclosión. Las larvas emergieron en un lapso de 2 a 3 días, y se alimentaron con "conejina", previamente triturada y esterilizada a 80 °C por 30 minutos. El agua se recicló diariamente para evitar el desarrollo de patógenos hasta alcanzar el estadio de larvas III, cinco días después de la eclosión ²¹. Todo el proceso se desarrolló utilizando un sistema de iluminación constante, con focos de 50 watts, para mantener una temperatura a $\pm 26^{\circ}\text{C}$, utilizando un termo hidrómetro y a un pH de 7,0.

Tamaño y representatividad de la muestra

Se utilizó 2500 huevos de *A. aegypti*, de los cuales emergieron aproximadamente 1800 larvas y para el desarrollo de la investigación se tomaron al azar 1200 de ellas.

Producción de *Bti* mutante

En un medio de cultivo Nysma conteniendo 80, 160 y 200 ppm del mutageno naranja de acridina, se realizó la siembra de *Bti*, y luego de 48 horas se detectaron colonias mutantes: M1, M2 y M3, y se seleccionaron por sus características fenotípicas. Luego de un proceso de fermentación por 50 horas, en biorreactores tipo tanque cilíndrico aireado y agitado, para cada concentración se obtuvo la biomasa de *Bti* mutante. Posteriormente se centrifugó, deshidrató y trituró la biomasa, cuantificándose en gramos de peso seco por litro, con un contenido de esporas, cristales proteicos y residuos celulares; el mismo que se considera como una formulación ²⁰.

Determinación de la dosis letal media de la formulación comercial.

Se pesaron 50, 80, 125, 250 y 500 mg de la formulación; y se diluyeron en 100 mL de agua destilada, contenidos en placas petri de 19 cm de diámetro más un control, posteriormente se colocaron 25 larvas III de *A. aegypti* para cada concentración. La dosis letal media se determinó por el recuento de larvas muertas en tres repeticiones.

Diseño para la exposición de lavas III de *Aedes aegypti* al *Bti* mutante.

Se eligieron cuatro tratamientos de tres formulaciones de *Bti* mutante y una de la formulación comercial “testigo”: 0, 2000, 3000, 4000 y 5000 ppm; se utilizó 20 vasos descartables conteniendo 25 larvas y 100 mL de agua destilada en cada repetición, el ensayo se realizó por triplicado. Los datos se tomaron a partir de las 40 horas después de la aplicación, siguiendo un diseño experimental en bloques completos al azar, donde cada tratamiento son las formulaciones y cada bloque las concentraciones²².

Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos en la experiencia, se realizaron los cálculos para estimar la línea de regresión, y determinar la dosis letal media y dosis letal máxima, así como el Análisis de varianza y la comparación de medias por el método de Duncan, para establecer la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, con una PEI=0,05²².

RESULTADOS

En la Fig. 1, se muestra el efecto biocida de *Bti* sobre larvas III de *A. aegypti* a través de la línea de regresión, donde la dosis letal media se encuentra entre 1250 y 2500 partes por millón; y la dosis letal máxima ocurre a partir de 5000 ppm de la formulación comercial, a partir de las 40 horas de aplicación.

El número promedio de larvas III muertas de *A. aegypti* producidas por las diferentes formulaciones a distintas concentraciones de *Bti*, obtuvieron sus valores máximos a 4000 ppm en cada uno de los tratamientos (M1: 11,76; M2: 13,10; M3: 11,38) excepto en el testigo, después de las 40 horas de aplicación, como se observa en la Tabla 1.

En la Tabla 2, se presenta el análisis de varianza para el promedio de larvas III muertas de *A. aegypti* por cada formulación de *Bti* mutante, incluido el testigo, a diferentes concentraciones (ppm) a partir de las 40 horas de aplicación.

La prueba de comparación de media de Duncan, confirma la existencia de diferencias significativas entre la formulación comercial, M1 y M3 con respecto al M2 de *Bti*, en relación al número promedio de larvas III muertas de *A. aegypti*, como se indica en la Tabla 3.

Tabla 1. Número promedio de larvas III muertas de *Aedes aegypti* producidas por cada formulación de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante incluso la formulación comercial diferentes concentraciones (ppm) a partir de las 40 horas después de la aplicación.

BLOQUES	TRATAMIENTOS			
	T ₁ (F.C)	T ₂ (M1)	T ₃ (M2)	T ₄ (M3)
2000 ppm	13,42	9,77	9,86	9,83
3000 ppm	10,25	9,78	13,20	10,70
4000 ppm	10,23	14,80	15,70	14,60
5000 ppm	10,10	12,70	13,62	10,40
Promedio	11,00	11,76	13,10	11,38

F.C = Formulación comercial, M1 = *Bti* mutante (80 ppm), M2 = *Bti* mutante (160 ppm), M3 = *Bti* mutante (200 ppm)

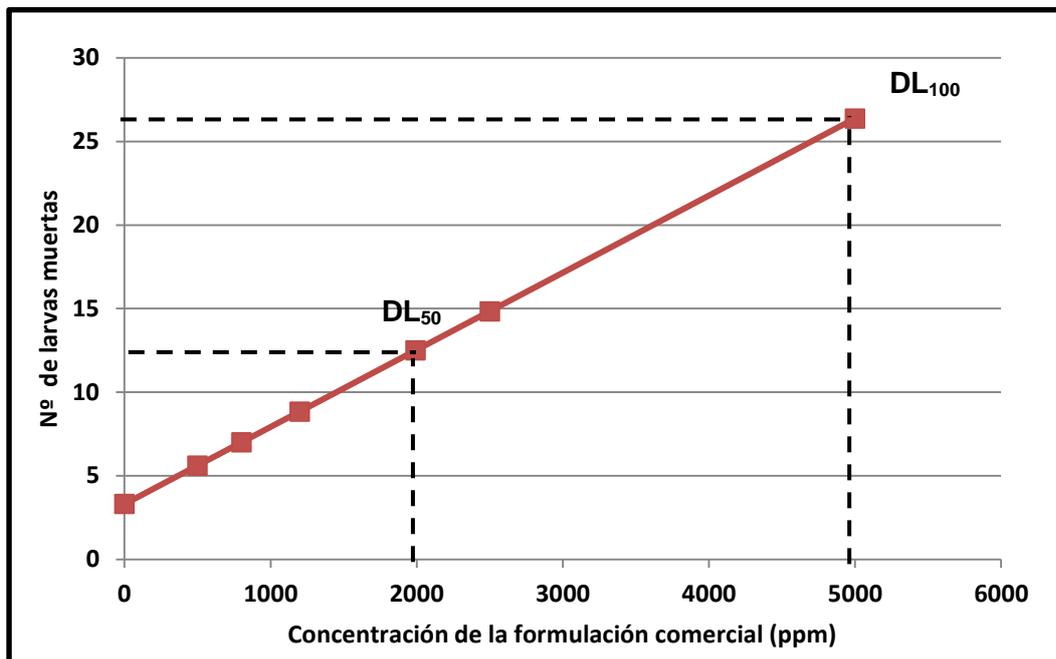


Fig 1. Línea de regresión para determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) y Dosis Letal Máxima (DL₁₀₀) de las diferentes concentraciones (ppm) de una formulación comercial de *Bti* “Lepibac” sobre larvas III de *Aedes aegypti* a partir de las 40 horas después de la aplicación.

Tabla 2. Análisis de varianza para el promedio de larvas III muertas de *Aedes aegypti* para cada formulación de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante, incluido la formulación comercial a diferentes concentraciones (ppm) a partir de las 40 horas después de la aplicación.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F-calculado	F-tabulado
Entre tratamientos	3	9,97	3,32	7,72	3,86 *
Entre bloques	3	24,00	8,00	18,60	3,86 *
Error	9	3,90	0,43		
Total	15	37,87			

P.E.I.: 0,05, * Presentan diferencias significativas

Tabla 3. Prueba de comparación de medias de Duncan de larvas III muertas de *Aedes aegypti* para cada formulación de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante, incluido la formulación comercial a diferentes concentraciones (ppm) a partir de las 40 horas después de la aplicación.

Tratamientos	Promedio de larvas muertas	Grupos Homogéneos
T1 (F.C)	11,00	X
T2 (M1)	11,76	X
T3 (M2)	13,10	XX
T4 (M3)	11,38	X

P.E.I.: 0,05

DISCUSIÓN

En todo trabajo de investigación, que implica comprobar la actividad de una sustancia determinada sobre algún sistema biológico, se hace necesario conocer la dosis letal media y la dosis letal máxima; porque a partir de ellas podemos elegir las concentraciones adecuadas para la consecución de un objetivo establecido²³. En tal sentido, se utilizó la línea de regresión para determinar la dosis letal media de las larvas III de *A. aegypti*, la que se encuentra entre 1250 y 2500 ppm; la dosis letal máxima ocurre a partir de las 5000 ppm de la formulación comercial utilizada como testigo respecto a las formulaciones de *Bti* mutante (Figura 1).

El número promedio de larvas III muertas de *A. aegypti* alcanzó su valor más alto a una concentración de 4000 ppm en todos los tratamientos con *Bti* mutante, a excepción del testigo, que lo hizo a 2000 ppm. Esta actividad lenta se debería a las diferentes concentraciones del naranja de acridina del cual se originaron, ocasionando cambios en su actividad; la mortalidad larvaria máxima ocurrió cuando se utilizó la formulación M2 de *Bti* a 4000 ppm, después de las 40 horas de aplicación (Tabla 1); coincidiendo con los resultados obtenidos por Couch y Ross²⁴ quienes señalan que el mayor efecto biocida en larvas de *A. aegypti* se produce entre las 24 y 48 horas después de la aplicación con *Bti*. Sin embargo, Zavaleta²¹ reporta una mortalidad del 100% a las 24 horas, lo que concuerda con Montero²⁵, quienes trabajaron en la susceptibilidad de *A. aegypti* frente a *Bti*.

La máxima producción de *Bti* se logró a 200 ppm del agente mutagénico, con un peso seco promedio de 2,78 gr/L; pero el mayor efecto biocida sobre las larvas III de *A. aegypti* ocurre con *Bti* mutante, utilizando 160 ppm del mutágeno; evidenciando que no existe una relación directa entre la producción del bioinsecticida mutante y su capacidad larvicida, más aún cuando ocurre asincronía en el proceso²⁰.

Los resultados distintos de la capacidad biocida de *Bti* mutante y la formulación comercial, sobre larvas III de *A. aegypti*, indicados con sus promedios fueron confirmados por el análisis de varianza (Tabla 2); para identificar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, no obstante a pesar de ser un método riguroso es muy genérico y sensible a las diferencias que puedan presentar por lo menos un par de tratamientos; ante ello se hizo necesario un método más específico como es la prueba de comparación de medias de Duncan (Tabla 3), para determinar entre que tratamientos existen tales diferencias²².

La producción de *Bti* mutante en la presente investigación se encuentra sobre las halladas en otras investigaciones, pero esto no demuestra una mayor capacidad biocida, dado a su origen. Sin embargo es necesario señalar que se trabajó solo con el 16% del principio activo, a diferencia de la formulación comercial que presenta el 32% del mismo. Por otro lado las formulaciones de *Bti* mutante son poco estables y los resultados hallados no aseguran su reproducibilidad, por lo tanto lograr la estabilidad del mutante es una finalidad a cumplir²⁰.

Se hace necesario ampliar las investigaciones relacionadas a los resultados del presente ensayo, con la finalidad de aprovechar mejor los genes de *B. thuringiensis* H-14 var. israelensis en la consecución de bioinsecticidas, tratando de hacer combinaciones de los mismos para mejorar el rango de acción de

las proteínas biocidas contra distintos organismos plaga, que constituyen una amenaza para la salud y calidad de vida del hombre; utilizando técnicas inducidas de mutación al azar.

Es factible iniciar en el Perú y sobre todo en nuestra región, otros trabajos con diferentes agentes mutagénicos químicos, para obtener mutantes más eficientes e incrementar la producción del bioinsecticida *Bti* y lograr curvas de rendimiento más elevadas, así como disminuir las poblaciones de insectos vectores de enfermedades como el dengue, malaria, entre otras.

Se debe potenciar y masificar la utilización del bioinsecticida *Bti*, dentro del marco del desarrollo sustentable por ser biodegradable, efectivo, seguro y sin llegar a producir impactos ambientales; para lo cual se debe iniciar algunas estrategias que permitan implementar normas y políticas para su uso. En conclusión: (i) las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis (*Bti*) mutante tuvieron efecto biocida sobre las larvas III de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio, (ii) el mayor efecto larvicida se logró con la formulación de *Bti* M2 a una concentración de 4000 ppm. Y (iii) no existe relación directa entre la producción del bioinsecticida *Bti* mutante y la actividad biocida sobre las larvas de *A. aegypti*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chico P, Hidalgo F, Ochoa R. Ciclo de Vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. Acta Pediátrica. Méx. 2001 ; 22(2) :114-117.
2. DIGESA. Manual de Procedimientos para la Vigilancia Entomológica y el Control Vectorial: Malaria y Dengue. Documento Técnico en Revisión Final. 2004.
3. Ministerio de Salud (MINSA). Módulo de Capacitación para la intervención integral en dengue. Lima, Perú. 2004.
4. Bisset J, Rodríguez M, Fernández P. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del Municipio Playa, colectados durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti*. Med Trop. La Habana. Cuba. 2004; 56 (1):61-66.
5. Rodríguez M, Bisset J, Fernández P. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. Rev. Cubana. Med Trop. La Habana. Cuba. 2004; 56(1):54-60.
6. Jian, L, Thirumaran Y, Porter A. Efficient síntesis of mosquitocidal toxins in *asticcacaulis excentricus* demonstrates potential of gram negative bacteria in mosquito control. Nature Biotechnology, 1996; 14:343-347.
7. Yang X, Wang S. Phase-specific optimization of multiple endotoxin-proteins with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol Appl Biochem. 2000; 3:71-76.
8. Cranshaw W. Questions and answers about *Bacillus thuringiensis*. Colorado State University Cooperative Extension. 2007. Disponible en: <http://searchpdf.adobe.com/proxies/1/26/81/4.html>
9. Schnepf H, Crickmore N, Van Rie J, Baum J, Feitelson J. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62:775-806.
10. Tyrell D, Bulla B, Andrews R, Kramer L, Davindson L, Norden R. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. J Bacteriol. 1981; 145(2):1052-1062.
11. Vandekar M, Dulmage H. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Edit. UNDP/WORLD BANK/WHO. Geneva Switzerland. 1982; pp.782-789.
12. Couche A, Pfannestel A, Nickerson K. Structural disulfide bonds in the *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis protein crystal. J Bacteriol. 1987; 169(7):3281-3288.
13. Federici A. Site of action of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in mosquito and blackfly larvae in Michal F, edit. Basic biology of microbial larvicides of vector of human diseases. Geneva, Switzerland. 1982; pp.37-47
14. Bravo A, Quintero R. Importancia y potencial de *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas. En IV curso avanzado de procesos biotecnológicos. Instituto de Biotecnología. México, 1993; 2:1-32.
15. Polo E. Efecto del cloruro de hidroxilamina en la producción de queratinasas por *Bacillus polymyxa* MIT-LVI, utilizando como sustrato plumas de aves. [Tesis de Maestro en Ciencias]. Escuela de Posgrado. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 1999.
16. Basik D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. Cell Biology Internat. 2006; 30:924-932.

17. Nassef, M., K. Zaied, E. Wahab y E. Ibrahim. 2002. Mutagenicidad de acridina y el ácido ascórbico en árboles de leguminosas. *Diario de Ciencias Biológicas. Pakistan.* 5(5): 569-580. <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/mutacion/mutacion.htm>.
18. Arshad R, Farooq S, Iqbal N, Ali S. Mutagenic effect of acridine orange on the expression of penicillin G-acylase and β -lactamase in *Escherichia coli*. 2006; pp.94-101(8). <http://www.ingentaconnect.com/content/bsc/lappm/2006/00000042/00000002/art00003>.
19. Ventocilla P, Chauca J. Instructivo para el control de calidad de bioinsecticidas bacterianos. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt. Universidad Cayetano Heredia. Perú. 2000; pp.65-68
20. Blas W. Efecto del naranja de acridina en la obtención de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis Mutante y la producción de bioinsecticida en un medio fermentativo a base de sanguaza. [Tesis de Doctor en Microbiología]. Escuela de Posgrado. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2012.
21. Zavaleta G. Evaluación de la capacidad biocida de *Bacillus thuringiensis* H-14. var. israelensis cultivado en sanguaza sobre larvas de *Aedes aegypti* en el distrito de Laredo, La Libertad-Perú. 2008-2009. [Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas]. Escuela de Posgrado. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2012.
22. Sokal R. Introducción a la Bioestadística. Edit. Reverté S.A. Barcelona-España. 1980; pp.510-612.
23. Soto N. Influencia de las aguas residuales de procesos de productos hidrobiológicos en la síntesis del bioinsecticida producido por *Bacillus thuringiensis* y su dosis letal sobre larvas de *Culex* sp. "zancudo". [Tesis de Maestro en Biotecnología y Bioingeniería]. Escuela de Posgrado. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2003.
24. Couch, T, Ross R. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech and Bioeng.* 1980 ; 22: 1297.
25. Montero G, Espino R, García I, Díaz M. Susceptibilidad comparativa de las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* al *Bacillus thuringiensis* variedad israelensis (H-14). *Rev. Cubana Hig. Epid.* 1985; 23:253-259.

Correspondencia : wblas@unitru.edu.pe