

## **Efecto bioinsecticidal de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante sobre *Aedes aegypti***

### **Bioinsecticidal effect of *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutant on *Aedes aegypti***

***Kimberly Rodríguez Quiroz***

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ  
kprodriguezq@unitru.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0002-1379-6189>

***Luigi Zavaleta Zavaleta***

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ  
lzavaletaz@unitru.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0003-3918-3986>

***Jean Portal Reyes***

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ  
jportalr@unitru.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0002-6766-4421>

***Gina Zavaleta Espejo***

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ  
gzavaleta@unitru.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-9087-6767>

***Willian Blas Cerdán***

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ  
wblas@unitru.edu.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-7581-9297>

## Resumen

Se evaluó el efecto bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (*Bti*) mutante, sobre larvas III de *Aedes aegypti*. Se utilizaron tres concentraciones del *Bti* mutante (16 560, 33 120 y 66 240 esp/mL), cada tratamiento contó con 25 larvas en estadio III de *A. aegypti*, las cuales fueron expuestas a las distintas concentraciones de *Bti* mutante más un grupo control. El bioensayo se realizó bajo condiciones de laboratorio, evaluado a las 24, 48 y 72 horas después de la exposición. Los resultados mostraron que a mayor concentración de *Bti* mutante mayor fue la actividad larvicida, ocurriendo la mayor eficacia, a las 72 horas a una concentración de 66240 esp/mL. Se concluye que *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante posee una alta actividad larvicida sobre *Aedes aegypti*, en condiciones de laboratorio.

**Palabras clave:** Bioinsecticida, *Bti* mutante, larvicida, mortalidad

## Abstract

The bioinsecticidal effect of mutant *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis* (*Bti*) on *Aedes aegypti* III larvae was evaluated by exposing them to three concentrations of the mutant *Bti* (16 560, 33 120 and 66 240 esp/mL), each treatment had 25 larvae in stage III of *A. aegypti*, which were exposed to different concentrations of mutant *Bti* and a control group. Bioassays between *A. aegypti* and mutant *Bti* were performed under laboratory conditions, evaluated at 24, 48, and 72 hours after exposure. The results showed that the higher the concentration of mutant *Bti*, the greater the larval mortality that occurred, with the concentration of 66 240 esp/mL being the most effective at 72 hours. It is concluded that mutant *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* has a high larvicidal activity against *Aedes aegypti* under laboratory conditions.

**Keywords:** Bioinsecticide, larvicide, mortality, mutant *Bti*

**Citación:** Rodríguez, K.; L. Zavaleta; J. Portal; G. Zavaleta & W. Blas. 2022. Efecto bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante sobre *Aedes aegypti*. *Arnaldoa* 29(2): 335-246. doi:<http://doi.org/10.22497/arnaldoa.292.29202>

## Introducción

Uno de los problemas de salud más frecuentes y graves que presenta la región norte del Perú, es la presencia del mosquito *Aedes aegypti*. Este mosquito es el vector principal de los virus del Dengue, Zika, Fiebre amarilla y Chikungunya (Cabezas & Donaires, 2017); presentándose como brotes epidémicos en varias zonas de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad. *A. aegypti* también, es un problema en la Selva peruana como en Amazonas, Loreto, Madre de Dios y Ucayali donde las constantes lluvias brindan las condiciones propicias para su propagación (Javier, 2018).

*Aedes aegypti* posee un ciclo biológico que consta de cuatro estadios: huevo,

larva, pupa y adulto (Ramírez, 2019). Las hembras colocan los huevos en recipientes con agua estancada limpia, que se pueden encontrar dentro o fuera del domicilio (Villamar *et al.*, 2020). Una vez eclosionados los huevos, las larvas pasan por cuatro estadios denominados: L1, L2, L3 y L4, estos se desarrollan en ambientes acuáticos al igual que su posterior fase de pupa, finalmente alcanza la fase adulta como un pequeño mosquito volador (Anoopkumar *et al.*, 2017).

Para controlar el vector se viene utilizando insecticidas químicos, larvicidas y adulticidas siendo la única solución para prevenir las enfermedades que este mosquito transmite (Conde *et al.*, 2015). Sin embargo, su uso no tuvo efecto significativo

en la disminución de poblaciones de este mosquito (Cabezas *et al.*, 2015). Por otro lado, se recomienda que productos químicos no deben ser utilizados de manera indiscriminada ya que su presencia representa un riesgo que afecta no solo al ambiente, sino que también a la salud humana (Villamar *et al.*, 2020).

El larvicida comercial Temephos es el producto químico organofosforado con más demanda para el control de poblaciones larvianas de *A. aegypti* (Valle *et al.*, 2019). Además, este producto muestra una efectividad de 68,4%, a una concentración de 0,04 ppm. Fue el larvicida utilizado en ciudades del Perú como Lima y Trujillo durante la reaparición del mosquito *A. aegypti* en el año 2000 (Pérez, 2017). Sin embargo, el uso excesivo y constante de este producto generó la aparición de resistencia en poblaciones de *A. aegypti* (Terán *et al.*, 2014). Para controlar este vector se realizan acciones de saneamiento, vigilancia de posibles criaderos y otros métodos (Valle *et al.*, 2019). Dentro del control biológico se destaca el uso del *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), una bacteria formadora de esporas (Ponce *et al.*, 2018).

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria Gram positiva, cuya principal característica es la producción de cristales de naturaleza proteica, denominados  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry que le confieren la propiedad entomocida (Devidas *et al.*, 2014; Velásquez *et al.*, 2018). El modo de acción de estas proteínas se produce por medio de la ingesta de los cristales por las larvas, solubilizándose a nivel del intestino medio, el mismo que presenta un pH alcalino; de esta manera son liberadas las protoxinas, que son convertidas proteolíticamente en toxinas (Aguirre & Duarte, 2020; Llanos, 2021). Estas toxinas se adhieren a los receptores de las membranas del

intestino medio, ocasionando la formación de poros generando daño en el epitelio (Carvalho *et al.*, 2018; Viana *et al.*, 2021). Estos poros ocasionan un influjo de iones de K<sup>+</sup>, disminuyendo el pH del medio y produciendo lisis celular osmótica a la larva que es incapaz de alimentarse (Castañet & Moreno, 2016). Este desequilibrio osmótico y fisiológico, también produce la filtración de los contenidos intestinales mezclándose con la hemolinfa provocando una sepsis y muerte del insecto (Liu *et al.*, 2021).

En Armenia, Colombia se probó al *Bti* como un eficaz larvicida, el cual se encuentra dentro de los programas de control vectorial de ese país, pero se aconseja que se utilice solo en lugares urbanos donde pueden ser posibles criaderos de *A. aegypti*, este experimento concluye que el uso de *Bti* es bueno para el control de larvas de este mosquito, pero también sugieren no descuidar y explorar el control de los adultos ya que son vectores del dengue (Aguirre & Duarte, 2020).

En Brasil se hicieron estudios acerca de la eficacia de *B. thuringiensis* sobre *A. aegypti*, confirmando el gran efecto larvicida de *B. thuringiensis* en especial la cepa *Bti* (Dos Santos *et al.*, 2018). Otro estudio en Brasil, demostró la eficacia de ciertos productos basados en *B. thuringiensis* obteniendo el 100% de larvas muertas, además lograron demostrar que poseen una alta persistencia de entre 15 a 30 días dependiendo de las condiciones ambientales que presenta cada zona (Nakazawa *et al.*, 2020).

La presente investigación tuvo como finalidad evaluar el efecto bioinsecticida; así como la concentración máxima que produce el *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis* mutante sobre larvas III de *Aedes aegypti*.

## Materiales y métodos

### Preparación del bioinsecticida

Se empleó *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (*Bti*), proporcionado por el laboratorio de Bionanotecnología y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo-Perú. Se preparó el medio de producción a gran escala propuesto por Abarca *et al.* (1992). El *Bti* mutágeno se obtuvo con cloruro de hidroxilamina a la concentración de 20 ppm (Pedro *et al.*, 2019), se colocó el *Bti* mutante en un medio fermentativo con 220 rpm de agitación a 30°C por 48 horas. Una vez terminado el proceso de fermentación, se centrifugó a 3500 rpm por 30 minutos eliminándose el sobrenadante, posteriormente se realizó el recuento en placa para la determinación de la concentración del bioinsecticida. El bioinsecticida estuvo conformado por cristales, esporas y restos celulares.

### Obtención de adultos de *Aedes aegypti*

Se utilizaron huevos de *A. aegypti* provenientes de la ciudad de Bagua Grande. Los huevos fueron sumergidos en recipientes de 24x15x3 cm con 500 ml de agua potable declorada. Una vez eclosionados los huevos tras un periodo de 4 a 5 días, las larvas fueron alimentadas con conejina triturada y esterilizada. El agua de los recipientes se cambió cada 2 días hasta llegar al estadio de pupa. Luego se colocaron 20 pupas en 10 recipientes de 100 ml de capacidad con agua potable declorada, hasta obtener adultos, los mismos que fueron alimentados con sangre proveniente de un hámster (hembras hematófagas) y solución azucarada (machos fitófagos) (Rebaza *et al.*, 2020).

### Obtención de larvas III de *Aedes aegypti*

Tras la cópula de los adultos en las jaulas de cría, los huevos obtenidos fueron sumergidos en recipientes de 24x15x3 cm con 500 ml de agua potable declorada. Una vez eclosionados los huevos, las larvas fueron alimentadas con conejina triturada previamente esterilizada. El agua de los recipientes se cambió cada 2 o 3 días desde la eclosión hasta llegar al tercer estadio larval. Todo el proceso se realizó utilizando iluminación constante, provista por focos de 50 watts para mantener una temperatura a 26°C ± 1 (Blas *et al.*, 2017).

### Exposición de larvas III de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante

Para el desarrollo de los bioensayos se utilizaron 300 larvas en estadio III de *A. aegypti*. Se trabajó con tres tratamientos o concentraciones distintas (16 560, 33 120 y 66 240 esp/mL) de *Bti* mutante y un grupo control. Se utilizó vasos de Tecnopor descartables con 100 ml de agua destilada y 25 larvas en estadio III de *A. aegypti*. A cada tratamiento se le adicionó una suspensión de *Bti* mutante con excepción del grupo control manteniendo las mismas condiciones ambientales. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Finalmente se hizo el recuento de larvas muertas a las 24, 48 y 72 horas (Rebaza *et al.*, 2020).

### Análisis estadístico de la exposición de larvas III de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante

Con los datos obtenidos a partir de los bioensayos, se realizó el Análisis de varianza y la prueba Tukey para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (Blas *et al.*, 2017). Se utilizó el programa estadístico RStudio de uso libre para las pruebas estadísticas de análisis de varianza y prueba Tukey con una PE ≤ 0.05.

## Resultados

En la Tabla 1, se indica el promedio de larvas III de *A. aegypti* muertas después de la exposición a tres concentraciones diferentes C1, C2 y C3 (16 560, 33 120 y 66 240 esp/mL respectivamente) de *B. thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (*Bti*) mutante y el grupo control a las 24, 48 y 72 horas. Se observó un mayor número de larvas III muertas a las 72 horas a la concentración de 66 240 esp/mL. El T2 con una concentración de 33 120 esp/mL, también obtuvo un alto número promedio de larvas III muertas a las 72 horas después de la exposición. En el grupo control no se reportaron larvas muertas.

En la Tabla 2, se muestra la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de *Bti* mutante para los diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas) de las larvas III de *A. aegypti*.

El Análisis de varianza de las diferentes concentraciones presente en la Tabla 3

en relación a la mortalidad larval de *A. aegypti* frente a la acción bioinsecticida de las diferentes concentraciones de *Bti* mutante (16 560, 33 120 y 66 240 esp/mL) presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y entre los tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas).

Los datos obtenidos mediante la comparación de las distintas concentraciones de *Bti* mutante empleando la prueba Tukey (Tabla 4), evidenciaron la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos T1-T2 y T1-T3, por otro lado, los tratamientos T2-T3 no presentaron diferencia significativa.

Mediante la prueba Tukey (Tabla 5) se compararon los tiempos de exposición de larvas III de *A. aegypti* a *Bti* mutante, demostrando la existencia de diferencias significativas entre los tiempos de exposición de los tratamientos.

**Tabla 1.** Número promedio de larvas muertas del III estadio de *Aedes aegypti*, expuestas a diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante evaluadas a las 24,48 y 72 horas, bajo condiciones de laboratorio.

| Conc.    | T1         | T2         | T3         | Control |
|----------|------------|------------|------------|---------|
|          | C1 (16 560 | C2 (33 120 | C3 (66 240 |         |
| Tiempo   | esp/mL)    | esp/mL)    | esp/mL)    |         |
| 24 horas | 8          | 11         | 11         | 0       |
| 48 horas | 11         | 14         | 17         | 0       |
| 72 horas | 14         | 21         | 22         | 0       |
| Promedio | 11         | 15         | 16         | 0       |

**Tabla 2.** Dosis Letal Media (DL<sup>50</sup>) de las diferentes concentraciones (esporas/mL) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante sobre larvas del III estadio de *Aedes aegypti* a las 24, 48 y 72 horas, bajo condiciones de laboratorio.

| Tiempos de exposición | DL <sub>50</sub> |
|-----------------------|------------------|
| 24 horas              | 38 045 esp/mL    |
| 48 horas              | 21 857 esp/mL    |
| 72 horas              | 14 271 esp/mL    |

**Tabla 3.** Análisis de Varianza para la mortalidad de larvas del III estadio de *A. aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de *B. thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante en condiciones de laboratorio.

| Predictor    | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | F     | p       |
|--------------|-------------------|--------------------|------------------|-------|---------|
| (Intercepto) | 0.64              | 1                  | 0.64             | 0.09  | 0.761   |
| TRATAMIENTO  | 132.45            | 1                  | 132.45           | 19.47 | 0.000 * |
| TIEMPO       | 420.97            | 1                  | 420.97           | 61.89 | 0.000 * |
| Error        | 156.44            | 23                 | 6.80             |       |         |

\* Existe diferencia significativa

P.E. ≤ 0.05

**Tabla 4.** Comparación de las distintas concentraciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante de los tratamientos mediante la prueba Tukey.

| Tratamientos | P. adj      |
|--------------|-------------|
| T1 - T2      | 0.0050120   |
| T1 - T3      | 0.0006082   |
| T2 - T3      | 0.5824264   |
|              | P.E. ≤ 0.05 |

Leyenda:

T1 - T2: existe diferencia significativa

T1 - T3: existe diferencia significativa

T2 - T3: no existe diferencia significativa

**Tabla 5.** Comparación del tiempo (horas) de exposición de larvas III de *Aedes aegypti* frente a *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante mediante la prueba Tukey.

| Tratamientos (Horas) | P adj     |
|----------------------|-----------|
| 24 - 48              | 0.0050120 |
| 24 - 72              | 0.0000001 |
| 48 - 72              | 0.0002289 |
| P.E. ≤ 0.05          |           |

Leyenda:

24 - 48: existe diferencia significativa

24 - 72: existe diferencia significativa

48 - 72: existe diferencia significativa

### Discusión

La exposición de larvas III de *A. aegypti* frente a *B. thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (*Bti*) mutante, a las distintas concentraciones y tiempos de exposición producen un efecto larvicida en *A. aegypti*, ocasionando una disminución significativa en la cantidad de larvas vivas en cada tratamiento (Tabla 1), además, se evidenció que a una mayor concentración de *Bti* mutante mayor es el número de larvas muertas, estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Blas *et al.* (2017).

El tiempo de exposición es una variable que influye sobre la acción biocida que posee *Bti* mutante, esto debido a que a mayor tiempo de exposición mayor es la mortalidad larval. El tiempo de exposición más eficaz fue de 72 h para los tres tratamientos empleados (Tabla 1), puesto que a un mayor tiempo de exposición ocurre una mayor acumulación de la  $\delta$ -endotoxina ingerida por las larvas ocasionando un mayor porcentaje de mortalidad como lo reportado por Gama *et*

*al.* (2013). Las toxinas generadas por *Bti* son altamente específicas para *A. aegypti*, estas actúan mediante ingestión en condiciones óptimas de pH y la presencia de enzimas proteolíticas en el intestino de las larvas, pueden ser hidrolizados los cristales formando una sustancia tóxica que actúa desintegrando el intestino medio de la larva llevándola finalmente a la muerte (Rebaza *et al.*, 2020).

Para constatar la acción de una determinada sustancia y/o producto que se planea aplicar para el control de una población de insectos es necesario conocer su dosis letal media (Blas *et al.*, 2017). Basados en los resultados obtenidos en el bioensayo se observa que la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) (Tabla 2) va disminuyendo conforme va aumentando el tiempo de exposición. La  $DL_{50}$  las 24, 48 y 72 horas fueron de 38045, 21857 y 14271 esp/mL respectivamente, concordantes con los resultados obtenidos por Rebaza *et al.* (2020). La relación dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y tiempo también son similares a los resultados obtenidos por Zavaleta (2010), donde evaluó el efecto de

*Bti* cultivado en sanguaza.

El análisis de varianza (Tabla 3) presento diferencias significativas entre los tratamientos, debido a que es un método altamente sensible a las diferencias que puedan presentarse entre ellos; sin embargo, para conocer entre que tratamientos existen tales diferencias se aplicó la prueba de comparación de Tukey (Tabla 4) y (Tabla 5). Las diferencias presentes entre los tratamientos estuvieron sujetas a la concentración de *Bti* mutante, ya que al haber una mayor concentración habrá una mayor cantidad de cristales para ejercer su acción tóxica al ser consumidos por las larvas de *A. aegypti*.

La presente investigación, nos brinda una visión más clara acerca del potencial de *Bti* mutante como controlador biológico de *A. aegypti*, siendo utilizado como una alternativa para el control de vectores y la disminución del uso de insecticidas químicos, puesto que estos generan resistencia, causan daño a la población y contribuyen con la contaminación del medio ambiente. Es por ello, que se propone el uso de *Bti* mutante como principal alternativa para el control de *A. aegypti*.

### Conclusiones

*Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (*Bti*) mutante tiene alta actividad bioinsecticida sobre *Aedes aegypti*.

El máximo porcentaje de mortalidad larval se obtuvo a una concentración de 66 240 esp/mL a las 72 horas luego de la exposición.

### Contribución de autores

K. R.: Concepción y diseño del estudio, adquisición de datos, análisis e interpretación de datos, elaboración

del borrador del contenido intelectual y aprobación definitiva de la versión a presentar. L. Z.: Concepción y diseño del estudio, adquisición de datos, análisis e interpretación de datos, elaboración del borrador del contenido intelectual y aprobación definitiva de la versión a presentar. J. P.: Ejecución, análisis e interpretación estadística de los datos obtenidos. G. Z.: Concepción y diseño del estudio, adquisición de datos, análisis e interpretación de datos, elaboración del borrador del contenido intelectual y aprobación definitiva de la versión a presentar. W. B.: Ejecución, análisis e interpretación estadística de los datos obtenidos, elaboración del borrador del contenido intelectual y aprobación definitiva de la versión a presentar.

### Conflicto de intereses

Declaramos que no tenemos conflicto de intereses.

### Literatura citada

- Abarca, C.; A. Martínez; M. Caro & R. Quintero. 1992. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. *Aisawai*. Universidad: Ciencia y Tecnología, 2(3): 51-56.
- Aguirre, O. & I. Duarte. 2020. Control de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* utilizando *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en Armenia, Quindío, Colombia. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 23(1).
- Anoopkumar, A.; S. Puthur; P. Varghese; S. Rebello & E. Aneesh. 2017. Life Cycle, Bio-ecology and DNA Barcoding of mosquitoes *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse). J Commun Dis, 49(3): 32-41.
- Blas, W.; G. Zavaleta; J. Saldaña; W. Blas & D. Meléndez. 2017. Efecto biocida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante sobre larvas III de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas (REBIOL), 37(2): 14-21.
- Cabezas, C.; V. Fiestas; M. Mendoza; M. Palomino; E. Mamani & F. Donaires. 2015. Dengue en el Perú:

- a un cuarto de siglo de su reemergencia. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 32(1): 146-156. \_
- Cabezas, C. & F. Donaires.** 2017. Enfoque sindrómico para el diagnóstico y manejo de enfermedades infecciosas febriles agudas en situaciones de emergencia. Revista Peruana Medicina Experimental y Salud Pública, 34(2): 316-22. \_
- Carvalho, K.; M. Crespo; A. Araújo; R. Santana; M. Varjal; C. Fontes & M. Lobo.** 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 and Vectors, 11:673. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3246-1>
- Castañet, C. & S. Moreno.** 2016. *Bacillus thuringiensis*: Características y uso en el control de *Aedes aegypti*. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar. 50 (3): 37-42. \_
- Conde, M.; L. Orjuela; C. Castellanos; M. Herrera-Varela; S. Licastro & M. Quiñones.** 2015. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. Biomédica, 35(1): 43-52.
- Devidas, P; B. Pandit & P. Vitthalrao.** 2014. Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. The Scientific World Journal 273030. <https://doi.org/10.1155/2014/273030>.
- Dos Santos, K.; J. Soares; M. Cleoneide; W. Pedro; R. Antonio & V. Soares.** 2018. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. Revista Brasileira de Entomología, 62(1): 5-12. \_
- Gama, Z.; N. Nakagoshi; N. Suharjono & F. Setyowati, F.** 2013. Toxicity studies for indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates from Malang city, East Java on *Aedes aegypti* larvae. Asian Pac J Trop Biomed, 3(2):111-117.
- Javier, A.** 2018. Perfil clínico y epidemiológico del brote epidémico de Dengue en la provincia de Piura durante el periodo de abril a junio del 2017 [Tesis Título, Universidad Nacional De Piura, Perú].
- Liu, L.; Z. Li; X. Luo; X. Zhang; S. Chou; J. Wang & J. He.** 2021. Which Is Stronger? A Continuing Battle Between Cry Toxins and Insects. Front. Microbiol, 12:665101. doi: 10.3389/fmicb.2021.665101.
- Llanos, A.** 2021. Inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) [Tesis de Grado, Universidad Técnica De Babahoyo, Ecuador].
- Nakazawa, M.; A. Araújo; M. Melo-Santos; C. Fontes & M. Silva-Filha.** 2020. Efficacy and persistence of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) and pyriproxyfen-based products in artificial breeding sites colonized with susceptible or Bti-exposed *Aedes aegypti* larvae. Biological Control, 151. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104400>
- Pedro, J.; W. Blas; G. Zavaleta; J. Saldaña; K. Vásquez; R. Hoyos & L. Pedro.** 2019. Producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae) mutante por acción del cloruro de hidroxilamina. Arnaldoa 26(3): 1143-1152.
- Pérez, M.** 2017. Evaluación del temefos y pyriproxifeno para el control de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. Horizonte Médico, 17(4): 24-29. \_
- Ponce, J.; B. Erazo; N. Yanes; A. Maradiaga; A. Bustillo; A. Cruz; D. Varela, D. Durón; K. Antúnez; P. Maradiaga; S. Matute & S. Sandoval, S.** 2018. Susceptibilidad De La Larva De *Aedes aegypti* A *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* En Tegucigalpa, Honduras. Revista Médica Hondureña. 86 (1 y 2): 7-10. \_
- Ramirez, I.** 2019. Aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de ecoregiones de la costa del Perú con actividad larvívora para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L) [Tesis de Grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú].
- Rebaza, N.; G. Zavaleta; W. Blas; J. Saldaña & J. Pedro.** 2020. Actividad larvívora de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* y *Beauveria bassiana* sobre *Aedes aegypti*. REBIOL, 40(1), 53-68. \_
- Terán, M.; M. Rodríguez; Y. Ricardo & J. Bisset.** 2014. Evaluación de temefos y pyriproxifeno en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Guayaquil, Ecuador. Revista Cubana de Medicina Tropical, 66(1), 71-83.
- Valle, D.; D. Fernandes; F. Fernandes; J. Pereira & A. Martins.** 2019. Resistance to temefos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 114. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180544>.

- Velásquez, L., Rojas, D. & Cerón, J.** (2018). Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Revista Colombiana Biotecnología*, 20(2): 89-100.
- Viana, J.; J. Soares da Silva; M. Vieira-Neta; W. Tadei; C. Oliveira; F. Abdalla, C. Peixoto & V. Pinheiro, V.** 2021. Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*, 81(1): 114-124.
- Villamar, M.; N. Romero & Y. Espinoza.** 2020. Estrategia para evitar la propagación en la reproducción del *Aedes Aegypti* en espacios periurbano. *Enfermería Investiga*, 5(1): 10-16.
- Zavaleta, G.** (2010). 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 doctoral, Universidad Nacional De Trujillo, Perú].

## ANEXOS



**Anexo 1:** Larva III de *Aedes aegypti* libre de la acción bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante.



**Anexo 2:** Larva III de *Aedes aegypti* expuesta a la acción bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante.

