

## CONTROL DE LARVAS DE MOSQUITOS CON *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* EN AGUAS RESIDUALES TRATADAS

L. R. Juárez-Briones, C. Aldama-Aguilera✉, G. Hipólito-Cruz, R. González-Montero, I. Razo-Soto y M. Algara-Siller

Facultad de Ingeniería, UASLP. Av. Dr. Manuel Nava 8, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.

✉Autor de correspondencia: cristobal.aldama @uaslp.mx

**RESUMEN.** La bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) posee una toxicidad selectiva alta en el control de mosquitos y genera un impacto muy bajo en el ambiente. El objetivo fue evaluar la eficacia de *Bti* para el control de larvas de mosquito de diferentes estadios, en diferentes calidades de agua de la Ciudad de San Luis Potosí. Los bioensayos se realizaron con agua potable (AP) y agua residual en tratamiento (AT) de una laguna de estabilización. La recolección de larvas de mosquito se realizó en la laguna de estabilización. Los parámetros físico-químicos medidos fueron pH, conductividad, cloro total, turbidez y oxígeno disuelto (OD). Las larvas de primero (L1) y segundo (L2) instar fueron las más susceptibles ( $n = 60$ ,  $p < 0.0001$ ). El análisis Probit indicó una  $CL_{50}$  de 0.028 mg/L y  $CL_{95}$  de 0.831 mg/L para las L2 en AT y concentraciones de 0.048 y 1.093 mg/L para  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ , respectivamente, para L1 en AP. En ambas calidades de agua, la  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  indicaron que L4 fueron menos susceptibles debido a su menor actividad alimenticia. El cloro total ( $n = 8$ ,  $P = 0.0002$ ) es el parámetro fisicoquímico que se presentó en mayor concentración en agua potable y que puede limitar la efectividad de *Bti*.

**Palabras clave:** mortalidad de mosquitos, parámetros físico químicos, calidades de agua.

### Control of mosquito larvae with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in treated wastewater

**ABSTRACT.** The bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) has a high selective toxicity and generates a very low impact on the environment. The objective was to evaluate the efficacy of *Bti* for the control of mosquito larvae of different stages, in different water qualities from the metropolitan area of San Luis Potosí. Bioassays were carried out with drinking water (DW) and wastewater in treatment (WT) from a stabilization lagoon. Mosquito larvae were collected from the stabilization lagoon. The physicochemical parameters measured were pH, conductivity, total chlorine, turbidity and dissolved oxygen (DO). First (L1) and second (L2) instar larvae were the most susceptible ( $n = 60$ ,  $p < 0.0001$ ). Probit analysis showed a  $LC_{50}$  of 0.028 mg/L and  $LC_{95}$  of 0.831 mg/L for L2 in WT, and concentrations of 0.048 and 1.093 mg/L for  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  for L1 in DW, being the more susceptible. In both water qualities, the  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  indicated that L4 were the least susceptible due to its lower dietary intake. The total chlorine ( $n = 8$ ,  $P = 0.0002$ ) was the physicochemical parameter that was present in a higher concentration in drinking water and that may limit the effectiveness of the bacteria.

**Keywords:** mosquito mortality, physicochemical parameters, water qualities.

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos constituyen un grupo de insectos de gran importancia, debido a que muchas de sus especies, además de causar diversas molestias, son vectores de agentes causales de enfermedades humanas con gran importancia en salud pública como dengue y paludismo (Pérez-Pacheco *et al.*, 2004). Hasta el momento se han descrito cerca de 3,000 especies de mosquitos, de éstas, los vectores constituyen una baja proporción (Travi y Montoya, 1994 y Salazar y Moncada, 2004). *Culex* es un género de mosquitos hematófagos, su ciclo de vida consta de cuatro estadios larvarios, después del cuarto estadio se transforman en pupa, para finalmente emerger como adulto. Las larvas de los mosquitos son acuáticas, lo que implica que todas las especies necesitan de un

cuerpo de agua natural o artificial para desarrollarse una vez que las hembras ovipositaron sobre la superficie del agua. Los estadios inmaduros se desarrollan preferiblemente en depósitos de agua y los criaderos son variados, constituidos por aguas con un alto grado de contaminación, abundante contenido de materia orgánica (García y Londoño, 2007).

La ciudad de San Luis Potosí cuenta con varios cuerpos de agua que representan sitios de ovoposición y cría de mosquitos, entre los cuales se encuentran varias presas y lagunas de aireadas y de estabilización. En dichas lagunas se trata parte del agua residual urbana de la ciudad y es reutilizada en la agricultura, la industria y en la recreación. Entre los métodos de control y eliminación de larvas de mosquitos está el control químico, siendo este poco sustentable debido a los daños ambientales principalmente por contaminación del suelo y agua. También existen alternativas como el control biológico, el cual se basa en la introducción de organismos o microorganismos que depreden, parasiten o compitan con las poblaciones de las especies a controlar. Algunas opciones son el uso de copépodos, insectos, peces larvívoros (género *Gambusia* y *Poecilia*) y la mayoría depende del oxígeno disuelto presente en los cuerpos de agua (Fimia *et al.*, 2009) y nematodos parasitarios (Santamarina *et al.*, 1996).

Es así que el uso de bacterias para el control de larvas constituyó durante las últimas décadas un tema de investigación intensiva, posee una toxicidad selectiva alta debido a su estrecho rango de especificidad y gracias a ello genera en el ambiente un impacto muy bajo (Sauka y Benintende, 2008). De estas, *Bacillus thuringiensis var israelensis* (*Bti*) es una bacteria de ocurrencia natural, formadora de esporas, encontrada en suelos y ambientes acuáticos en todo el mundo la cual produce una delta-endotoxina durante la esporulación, siendo altamente específica y tóxica por ingestión solamente para larvas de mosquitos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia biológica de *Bti* como control de larvas diferentes instares de *Culex* spp. en diferentes calidades de agua de la capital Potosina.

## MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron larvas de primer instar (L1), segundo instar (L2), tercer instar (L3) y larvas tempranas de cuarto instar (L4) de *Culex* spp., las cuales se recolectaron de un cuerpo de aguas residuales en la Ciudad de SLP con una red entomológica acuática con apertura de malla de 15 micras. La separación por instares se hizo colocando las larvas con poca agua sobre una tapa plástica y un pincel de cerdas finas, lo anterior y los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Ingeniería de la UASLP.

Se usaron dos calidades de agua 1) agua potable (AP), que se obtuvo directo de un grifo, y 2) agua residual en tratamiento (AT) que se obtuvo la laguna de estabilización “Tanque Tenorio”. La caracterización de cada calidad se realizó mediante la medición de los parámetros físico químicos tales como pH, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto con potenciómetros Thermo Scientific®

(ORION 5 STAR, pH•ISE•Cond•OD Benchtop), turbidez con el turbidímetro Hach® (2100 N) y cloro total con un colorímetro Hanna® instruments (HI 83214). Las concentraciones usadas para L1, L2 y L3 fueron 0 (control), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 2, 4, 6, 8 mg/L, para L4 las concentraciones fueron 0, 2, 4, 6, 8 mg/L debido a su poca actividad alimenticia. Las dosis se tomaron como referencia a partir de la ficha técnica del producto comercial VectoBac® WDG (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) que contiene 3000 Unidades Toxicas Internacionales (UTI)/mg.

Se usaron vasos de plástico transparente con capacidad de 1 L, cada uno con una densidad de 0.42 larvas/cm<sup>2</sup> (40 larvas por vaso). Los bioensayos se establecieron a una temperatura promedio de 23° ± 2°C ya que de acuerdo con Sinagre *et al.* (1981) y Glare y O’Gallaghan (1998) la mortalidad causada por *Bti* en *Culex* spp. no se ve influenciada de forma negativa a temperaturas del agua entre los 19-33°C.

La mortalidad de larvas fue observada a las 24 h de exposición a *Bti* (se consideraron como muertas aquellas larvas que no presentaron ningún movimiento como respuesta al golpeteo realizado con los dedos en las paredes de los vasos), la cual fue corregida con la fórmula de Abbott (1925).

Se realizaron análisis de varianza, pruebas de comparación de medias con la prueba de Tukey y un análisis Probit (Raymond, 1985), para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y 95 (CL<sub>95</sub>) mediante el uso del paquete estadístico The SAS® System for Windows 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo que los instares más susceptibles a las concentraciones de *Bti* fueron L1 y L2 con al menos un 74 % de mortalidad, las L3 mostraron menor mortalidad (54 %) como se observa en la Fig. 1a. Lo anterior, concuerda con lo descrito en la literatura respecto a la efectividad de *Bti* debido a que los estadios tempranos de desarrollo de mosquitos son de menor talla y fortaleza física comparados con los instares L3 y L4 tardíos, ya que presentan mayor resistencia a las toxinas de la bacteria.

Las concentraciones que causaron mayor mortalidad en los instares L1-L3 fueron las más altas (2-8 mg/L) en comparación con las más bajas (0.1-0.4 mg/L); sin embargo, las concentraciones más bajas evidenciaron una efectividad de al menos 48% de mortalidad de larvas (Fig. 1b).

Con respecto a la calidad del agua, se observó que hay diferencia significativa entre AT y AP (Fig. 1c), lo anterior debido las propiedades físico químicas de cada una, el cloro, por ejemplo, causa una relación inversa sobre la efectividad de *Bti* (Sinagre *et al.* 1982), debido a que éste es capaz de inhibir o destruir las endotoxinas de la bacteria (Glare y O’ Gallaghan, 1998).

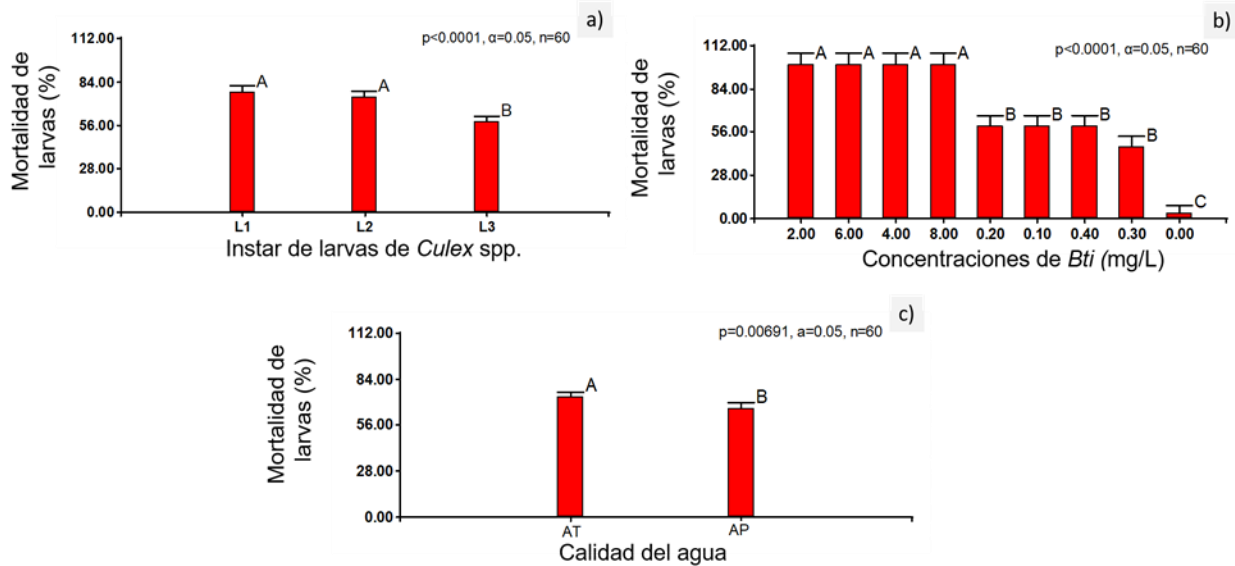


Figura 1. Mortalidad de larvas L1, L2 y L3 de *Culex* spp. a) según el instar larvario del mosquito: L1=primer instar, L2= segundo instar, L3= tercer instar y L4= cuarto instar, b) según la concentración de *Bti* y c) según la calidad de agua: AT=Agua residual en tratamiento y AP= Agua potable. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa. Las barras en las columnas representan la desviación estándar.

En el caso de las larvas de cuarto instar no se encontró diferencia significativa entre la mortalidad causada por *Bti* (Fig. 2a), lo anterior se debe a que las L4 disminuyen su alimentación y por lo tanto se hacen menos propensa a morir por acción de la bacteria (Corbillón *et al.*, 2012). Respecto al tipo de calidad del agua, se encontró que hay mayor control por *Bti* en AT con 73% de mortalidad de larvas (Fig. 2b).

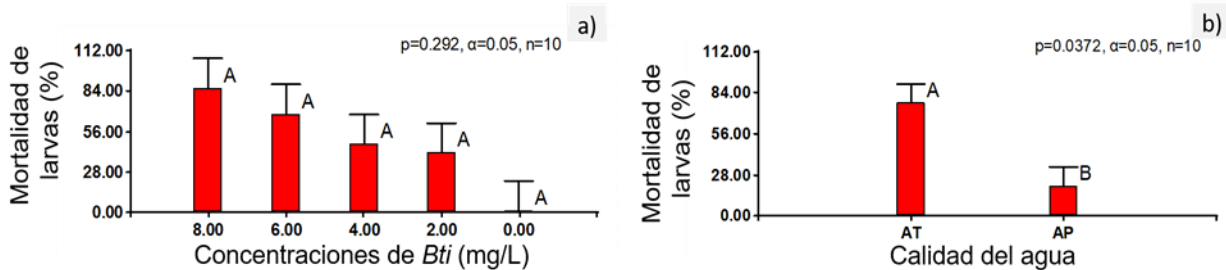


Figura 2. Mortalidad de larvas L4 de *Culex* spp. a) según la concentración de *Bti* y b) según la calidad de agua: AT=Agua residual en tratamiento y AP= Agua potable. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa. Las barras en las columnas representan la desviación estándar.

El pH afecta de manera negativa la acción de *Bti* a valores ácidos (pH 4.0) o alcalinos pH (pH 10.0); sin embargo, según lo reportado por Ignoffo *et al.* (1981) y Delgado (2005) en aguas residuales los valores de pH de 7.56 como los que se encontraron en AT indican mayor efectividad en la acción de la bacteria sobre las larvas de mosquito. En relación con la turbidez, se encontró

diferencia significativa entre ambas calidades, AP se caracterizó por encontrarse dentro de los rangos establecidos por la NOM-127-SSA1-1994 que indica como límite máximo permisible 5 NTU en aguas para uso y consumo humano (DOF, 2000) y AT se caracterizó por presentar un valor de 60 NTU mayor que en AP, según lo reportado por Ramoska *et al.*, (1982) y Perich *et al.*, (1989), la turbidez está estrechamente relacionada con la materia orgánica y a valores altos de ambos parámetros, actúan como interferencia en el consumo de *Bti* por las larvas. Por su parte, autores como Ignoffo *et al.* (1981) y Delgado (2005) indicaron un efecto fagoestimulante a valores altos de turbidez en algunas especies de mosquitos, por lo tanto, es comprensible que la bacteria tenga mayor efectividad en AT que en AP (Figs. 2c y 3b). Respecto al cloro, se determinó que el valor encontrado en AP se encuentra dentro de los rangos establecidos por la Nom-127-SSA1-1994, que establece un límite máximo permisible de 0.2-1.50 mg/L (DOF, 2000). Sin embargo, Sinegre *et al.* (1981) indicaron que existe una correlación inversa entre la cantidad de cloro presente en el agua y la mortalidad de mosquitos por acción de *Bti*, debido a que el cloro libre en el agua afecta de forma negativa a la bacteria (Glare y O’Gallaghan, 1998), por lo que, es posible que el 57 % de mortalidad menor en AP respecto a AT en larvas de *Culex spp.* es causada por la cantidad contenida de este parámetro en AP (Cuadro 1).

Con referencia a la conductividad, ésta fue mayor en AT que en AP (561  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), respecto al oxígeno disuelto (OD), se encontró una diferencia en las medias de 6.15 mg/L, se encontraron valores muy bajos en AT (Cuadro 1), de los parámetros fisicoquímicos medidos, se considera que éstos no interfieren con la actividad de *Bti* debido a que en ambas calidades se obtuvieron mortalidades de larvas que superan el 50% en instares L1-L3 (Figs. 2c).

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos en las calidades del agua.

Parámetro	Calidad del agua		Tukey ( $\alpha=0.05$ )	
	AT	AP	n	$\rho$
pH	7.65 <sup>A</sup>	7.29 <sup>B</sup>	8	0.0020
Turbidez (NTU)	60.13 <sup>A</sup>	0.28 <sup>B</sup>	8	0.0126
Cloro (mg/L)	0.06 <sup>B</sup>	0.60 <sup>A</sup>	8	0.0002
Conductividad ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	924.75 <sup>A</sup>	360.75 <sup>B</sup>	8	<.0001
OD (mg/L)	1.60 <sup>B</sup>	7.75 <sup>A</sup>	8	0.0004

<sup>A B</sup> Grupos Tukey. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa. AT = Agua residual en tratamiento, AP = agua potable.

Los resultados obtenidos del análisis Probit en agua residual en tratamiento muestran que los instares con menor CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> fueron las larvas L2 con 0.028 y 0.831 mg/L respectivamente. En contraste, las larvas L4 requieren una CL<sub>50</sub> de 0.642 mg/L y CL<sub>95</sub> de 3.000 mg/L como se observa en el Cuadro 2 y Figura 3. Lo anterior indica que las L1-L4 presentaron una respuesta homogénea

a la acción de la bacteria (Delgado, 2005), por lo que puede alcanzar una mortalidad del 95% a concentraciones inferiores a 4 mg/L, cabe mencionar que dicha concentración sería efectiva en condiciones de laboratorio, bajo condiciones de campo, es necesario realizar un ajuste de concentración debido que la efectividad de la bacteria depende de la composición del sedimento y del valor de turbidez durante periodos de recarga en el cuerpo de aguas residuales, ambos aspectos afectan la eficacia y persistencia de *Bti* (Van Essen y Hembree 1982 y Perich *et al.* 1989).

Con relación al análisis Probit en agua potable, se observó menor CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> en larvas del primer instar con 0.048 y 1.093 mg/L. Las L4 indicaron una CL<sub>50</sub> de 6.796 mg/L y una CL<sub>95</sub> de 10.055 mg/L (Fig. 3). Lo anterior indica que para lograr una mortalidad del 95% en larvas del cuarto instar en la CL<sub>50</sub> es necesario incrementar 1.479 veces dicha concentración superando la concentración más alta probada en este estudio.

Cuadro 2. Resultados del análisis Probit para la determinación de CL<sub>50</sub> y en larvas de *Culex* spp. en cuerpos de agua de la ciudad de SLP.

Instar	Concentración letal	Calidad del agua	
		AT	AP
L1	CL <sub>0.50</sub>	0.08167	0.04814
	CL <sub>0.95</sub>	1.06884	1.09362
L2	CL <sub>0.50</sub>	0.02828	0.18313
	CL <sub>0.95</sub>	0.83153	2.68777
L3	CL <sub>0.50</sub>	0.32002	0.46787
	CL <sub>0.95</sub>	2.60343	2.47045
L4	CL <sub>0.50</sub>	0.64235	6.79602
	CL <sub>0.95</sub>	3.00077	10.05598

L1=primer instar, L2= segundo instar, L3= tercer instar y L4= cuarto instar. AT= agua residual en tratamiento, AP=agua potable.

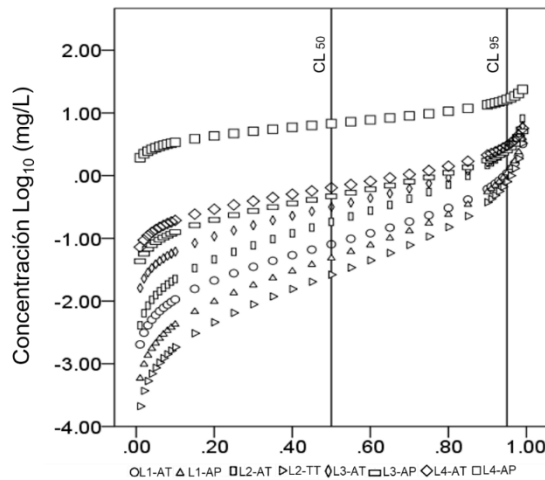


Figura 3. Resultados del análisis Probit para la determinación de CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> para la mortalidad (%) de larvas de *Culex* spp. en cuerpos de agua de la ciudad de SLP. Las concentraciones se presentan con valores transformados a Log<sub>10</sub>. L1=primer instar, L2= segundo instar, L3= tercer instar, L4= cuarto instar, AT=agua residual en tratamiento y AP= agua potable.

## CONCLUSIÓN

La bacteria *Bti* tuvo una efectividad biológica buena sobre larvas de *Culex* spp. Las L1, L2 y L3 fueron las más susceptibles y la calidad del agua no influyó en la mortalidad. Con base en el análisis Probit la CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> indicaron que las L2 fueron las más susceptibles en el agua residual en tratamiento y las L1 en agua potable, en ambos casos la CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> indicaron que la L4 fue la menos susceptible debido a su menor actividad alimenticia. El cloro total es el parámetro fisicoquímico que en altas concentraciones podría limitar la efectividad de la bacteria.

## Agradecimientos

Al financiamiento parcial otorgado a través del proyecto de investigación C17-FAI-06-50.50, a la Comisión Estatal del Agua de SLP y al Grupo Constructor Cumbres SA de CV.

## Literatura Citada

- Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol*, 18:265-267.
- Corbillón, C., Gonzalez, A., Menéndez, Z., Ibañez, A., Águila, Y., Pérez M. 2012. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64 (3): 235-243.
- Delgado P., N. 2005. Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. *Entomotropica*, 20 (3): 213 – 233.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2000. Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". México. D. F. Nov. 1ra. secc. pp 48-55.
- Fimia D., R., Castillo C., J. C., Cepero R., O., Corona S., E., González G., R. 2009. Eficacia del control de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) con peces larvívoros. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(2): 2009.
- García G., O. C. y Londoño B., Y. L. 2007. Adaptación de *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) a tres diferentes pisos térmicos bajo condiciones de laboratorio. Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria. Bogotá. D.C. 2007.
- Glare, T. R. and O’Gallaghan, M. 1998. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Report for the Ministry of Health. Biocontrol and Biodiversity, Grasslands División, AgResearch PO Box 60. Lincoln. 98629m.
- Ignoffo, C., García, C., Kroha, M., Fakuda, T., Couch, T. 1981. Laboratory test to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. *Mosquito News*, 41(1):85-93.

- Pérez-Pacheco, R., Rodríguez, C., Lara, J., Montes, R., Ramírez, G., Martínez, L. 2004. Parasitismo de *Romanomermis iyengari* en larvas de tres especies de mosquitos en laboratorio y de *Anopheles pseudopunctipennis* en campo. *Agrociencia*, 38 (4), 413-421.
- Perich, M., Boobar, L., Stivers, J., Rivera, L. 1989. Evaluation of diverse formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles albimanus* in Honduras. *Israel J. Entomol.* 23: 45-49.
- Ramoska, W., Watts, S., Rodríguez, R. 1982. Influence of suspended particulates of activity of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. *Journal of Economic Entomology*, 75(1): 1-4.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit micro-ordinateur. *Cahiers-ORSTOM, Entomologie Medicale et Parasitologie*, 23 (2): 117-21.
- Salazar, M. J. y Moncada, L. I. 2004. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomédica*, 24: 385-92.
- Santamarina, A. 1996. Cría masiva de *Romanomermis culicivora* (Nematoda: Mermithidae) en las condiciones tropicales de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 48(1): 26-33.
- Sauka, H. y Benintende, 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(2): 124-140.
- Sinegre, G., Gaven, B., Vigo, G. 1981. Contribution to standardization of laboratory tests on experimental and commercial formulations of the serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. II. Influence of temperature, free chlorine, pH and water depth on biological activity of a primary powder. *Cahiers-ORSTOM, Entomologie Medicale et Parasitologie*. 19: 143-147.
- Travi, B. y Montoya, J. 1994. *Manual de entomología médica para investigadores de America Latina*. Cali, Colombia: Cideim. p.90-142.
- Van Essen, F. y Hembree, S. 1982. Simulated field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis* against mosquitoes: residual activity and effect of soil constituents. *Mosq. News*, 42(1):66-72.