



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, IPK
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia, CIDR
Departamento Control de Vectores

Aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bacillales: Bacillacea) con actividad larvicida contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Aileen González Rizo, MSc.

Tutores: Lic. Hilda María Hernández Álvarez, Dr.C.

Lic. María Magdalena Rodríguez Coto, Dr.C.

La Habana

2021

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me impulsaron y ayudaron a concluir este trabajo en especial:

- ✓ A mis tutoras:
 - ✓ **Hilda** (Hildilla no sé qué sería de mi sin tí) te has convertido en parte inseparable de mi vida y he aprendido muchísimo a tu lado.
 - ✓ **Magda** una mujer extraordinaria, con una inteligencia deslumbrante, hubiera querido compartir más tiempo contigo.
- ✓ A las **Dras Lianet Monzote, Maureen Leyva y Bertha Carreras** por sus oportunas sugerencias y acertados comentarios.
- ✓ Al **Dr. Rene Gato** por aceptarme en su laboratorio, introducirme en esta línea de investigación y ser parte fundamental en todos los muestreos junto con **Omar González**. Sin ellos hubiera sido imposible realizar esta tesis.
- ✓ A todos mis compañeros del departamento de vectores: los **Jorges, Israel, Nell, Yanet, Yisel, Yani, Gladys, Domingo, Mary, Bisset**.
- ✓ Al **Dr. Jorge Cantillo** no eres de vectores pero siempre estás ahí trabajando junto a nosotros.
- ✓ A mis queridos alumnos: **Graciela, Camilo, Celeste y Ana**.
- ✓ Al personal de docencia en especial a las profesoras **Maribel, Clarita y Martha**.
- ✓ A mi grupo de guardia de diagnóstico de COVID: **Liena, Acela, Anita, Sahirys, Yanaika, Dayesi**, 2020 fue un año duro, pero conocerlos y compartir con uds esas intensas jornadas de trabajo fue un regalo.
- ✓ A mis amigos **Ironel, Ernesto y Wilfredo** por ayudarme en el momento más difícil de todo este proceso.
- ✓ A mis amigas **Ariamys, Zulema** por su apoyo incondicional dentro y fuera del IPK.
- ✓ A mis amigas de tantos años **Randelys y Tamara** por su preocupación, brindándome sus conocimientos y sostén en todo momento.

- ✓ A mis amigos de los años del **grupo 5** del IPVCE.
- ✓ A mi familia por su apoyo y comprensión: **mi madre, mi hija** (recuerda siempre que todo logro lleva sacrificio), **mi tiita y mi hermanita** (*Aide* sin ti no podría haber terminado nunca este trabajo, a pesar de la distancia tu ayuda ha sido la más importante).

A todos muchísimas gracias

Le debo un agradecimiento especial al gran amor de mi vida (después de mi hija), a la persona que me enseñó desde pequeña que el conocimiento no ocupa ningún espacio, nos ayuda a sentirnos libres y que nunca es demasiado tarde. Al que nunca se perdió un logro, ni una tesis mía y que estoy segura que si estuviera, nada, ni nadie le impediría estar presente en esta (aunque de cierta forma si está): ***Mi padre: Ibrahim González Hernández***

A mi padre

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

APN: aminopeptidasa-N

ARN: ácido ribonucleico

BCA: método del ácido bicinconínico

BioCen: Centro Nacional de Biopreparados

CC₅₀: concentración citotóxica media

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (del inglés, Center for Disease Control and Prevention)

CENPALAB: Centro para la Producción de Animales de Laboratorio, Cuba

CL: concentración letal

CPVs: virus de la poliedrosis citoplasmática (del inglés, Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses) Reoviridae: *cypovirus*

Cry: toxinas o proteínas formadoras de cristales (del inglés, crystal).

Cyt: toxinas o proteínas citolíticas (del inglés, cytotoxic)

DE: desviación estándar

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

ELISA: ensayo inmunoenzimático (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

kDa: kilo Dalton

INISAV: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Cuba

IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Cuba

LABIOFAM: Laboratorios Biológicos Farmacéuticos, Cuba

LB: Luria Berthani

LI: límite inferior

LS: límite superior

MIVs: virus iridiscente de mosquitos (del inglés, mosquito iridescent viruses)

MTT: 3-(4,5-timetildiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NaDCC: dicloroisocianurato de sodio

NPVs: virus de la poliedrosis nuclear (del inglés, nuclear polyhedrosis virus)

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de base

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)

PM: peso molecular

SDS: duodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis)

Sip: proteínas insecticidas secretadas por *Bacillus thuringiensis* (del inglés, secreted insecticidal proteins)

TBE: Tris-borato EDTA

TE: Tris-EDTA

TIE: técnica de insecto estéril

TL: tiempos letales

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

UFC: unidades formadoras de colonias

UV: radiación ultravioleta

Vip: proteínas con acción insecticida producidas durante el crecimiento vegetativo por cepas de *Bacillus thuringiensis* (del inglés, vegetative insecticidal proteins)

SÍNTESIS

En el presente estudio se caracterizaron aislamientos de *Bacillus thuringiensis* activos contra larvas de *Aedes aegypti*. A partir de 254 muestras de suelo del archipiélago cubano, se obtuvieron 1322 aislamientos bacterianos. De ellos, 320 identificados como *B. thuringiensis* y solo 19 presentaron actividad contra larvas de *Ae. aegypti*. Se seleccionaron 10 aislamientos por presentar: $CL_{90} < CL_{90}$ de la cepa 266/2 9-VII-98 (*B. thuringiensis* var. *israelensis*, ingrediente activo del Bactivec®), proteínas (Cry4, Cry11, Cry10 y Cyt) responsables de la actividad larvicida, diversidad de genes (*cry* y *cyt*) y baja toxicidad contra macrófagos peritoneales. En presencia de factores que pueden estar asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* los aislamientos A21, A51, R84, R85 y U81 mostraron mayor actividad larvicida que la cepa 266/2 9-VII-98. La elevada actividad larvicida del aislamiento A21 frente a todos los factores evaluados y la ausencia total de betaexotoxina avaló su selección como candidato final. El cultivo de A21 en medio conformado por levadura torula, almidón de maíz, NaCl, MgSO₄ favoreció la expresión de los principales factores de virulencia y la actividad larvicida. La no detección de toxicidad aguda oral con A21 y la elevada actividad larvicida residual sugiere el empleo de este aislamiento y medio de cultivo en el desarrollo de futuros biolarvicidas, los cuales podrían ser útiles para el control de *Ae. aegypti*.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Introducción.....	1
I.2 Hipótesis	4
I.3 Objetivo general	4
I.4 Objetivos específicos.....	4
I.5 Novedad científica.....	5
I.6 Valor teórico	5
I.7 Valor práctico	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II.1 Arbovirosis	6
II.2 <i>Aedes aegypti</i> : principal vector de dengue, chikunguya, Zika y fiebre amarilla en Las Américas	7
II.3 Métodos de control.....	8
II.3.1 Control mediante insecticidas químicos.....	9
II.3.2 Control biológico.....	9
II.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
II.4.1 Historia	10
II.4.2 Clasificación taxonómica, características generales y ecología	11
II.4.3 Cristales paraesporales	14
II.4.5 Toxinas Cry	16

II.4.6 Toxinas Cyt	19
II.4.7 Otros factores de virulencia producidos por <i>B. thuringiensis</i>	20
II.4.8 Mecanismo de acción de las proteínas Cry y Cyt.....	21
II.4.9 Resistencia a <i>B. thuringiensis</i>	24
II.4.10 Factores bióticos y abióticos que afectan la actividad de <i>B. thuringiensis</i>	25
II.4.11 Medios de cultivo para la producción de <i>B. thuringiensis</i>	27
II.4.12 Empleo de <i>B. thuringiensis</i> (Bactivec®) en Cuba para el control de <i>Ae. aegypti</i> ...	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
III.1 Tipo de estudio.....	30
III.2 Cepas de referencia	30
III.2.1 Cepas bacterianas	30
III.2.2 Cepas de <i>Ae. aegypti</i>	31
III.3 Animales de experimentación.....	31
III.4 Colecta de muestras de suelo	31
III.4.1 Procesamiento de las muestras.....	32
III.4.2 Identificación bacteriana	32
III.5 Preparación del pre-inóculo	34
III.6 Bioensayos para la determinación de la actividad biolarvicida.....	34
III.7 Determinación de proteínas, genes y plásmidos responsables de la actividad larvicida	36
III.7.1 Identificación de las proteínas Cry y Cyt en aislamientos de <i>B. thuringiensis</i>	36
III.7.2 Detección de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en aislamientos de <i>B. thuringiensis</i>	38
III.7.3 Determinación del patrón de ADN plasmídico de los aislamientos de <i>B. thuringiensis</i>	40
III.8 Determinación de la citotoxicidad de los aislamientos seleccionados sobre macrófagos peritoneales	41
III.9 Influencia de factores asociados a los criaderos de <i>Ae. aegypti</i> sobre la actividad larvicida de los aislamientos	43
III.9.1 Efecto de los factores abióticos sobre las proteínas Cry y Cyt de <i>B. thuringiensis</i> ..	44

III.10 Selección de aislamientos libres de betaexotoxinas.....	45
III.11 Selección del medio de cultivo que favorezca la expresión de los principales factores de virulencia y actividad larvicida del aislamiento seleccionado	47
III.11.1 Evaluación de la influencia de las sales MgSO ₄ , FeSO ₄ ZnSO ₄ y NaCl sobre el crecimiento, esporulación y producción de delta-endotoxinas	47
III.11.2 Evaluación de medios de cultivo con diferente composición	48
III.12 Evaluación de la toxicidad/patogenicidad aguda oral del aislamiento cultivado en el medio seleccionado utilizando como modelo biológico <i>Rattus norvegicus</i> , cepa Wistar ..	49
III.13 Determinación de la actividad larvicida residual del aislamiento cultivado en el medio seleccionado	51
III.14 Consideraciones éticas	52
IV. RESULTADOS.....	54
IV.1 Aislamientos bacterianos provenientes de suelos del archipiélago cubano.....	54
IV.2 Proteínas, genes y plásmidos presentes en aislamientos de <i>B. thuringiensis</i> con elevada actividad larvicida contra <i>Ae. aegypti</i>	57
IV.3 Citotoxicidad de los aislamientos nativos seleccionados sobre macrófagos peritoneales	60
IV.4 Influencia de factores asociados a los criaderos de <i>Ae. aegypti</i> sobre los aislamientos nativos	61
IV.5 Selección de aislamientos libres de betaexotoxinas	65
IV.6 Medio de cultivo que favorece la expresión de los principales factores de virulencia y actividad larvicida en el aislamiento A21	67
IV.7 Toxicidad/patogenicidad aguda oral del aislamiento A21 cultivado en el medio 2 utilizando como modelo biológico <i>Rattus norvegicus</i> , cepa Wistar.....	71
IV.8 Efecto residual del aislamiento A21 cultivado en medio 2	73
V. DISCUSIÓN	76
V.1 Selección de aislamientos nativos de <i>B. thuringiensis</i> en cuanto actividad larvicida contra <i>Ae. aegypti</i> , factores de virulencia y citotoxicidad	76
V.2 Influencia de diferentes factores asociados a los criaderos de <i>Ae. aegypti</i> sobre la actividad larvicida de los aislamientos nativos.....	80

V.3 Selección de aislamientos libres de betaexotoxina	85
V.4 Medio de cultivo que favorece la expresión de los principales factores de virulencia y la actividad larvicida del aislamiento A21	86
V.5 Toxicidad/ patogenicidad (modelo biológico <i>Rattus norvegicus</i> , cepa Wistar) aguda oral del aislamiento A21	89
V.6 Actividad residual de A21 cultivado en medio 2.....	90
V.7 Consideraciones generales	93
VI. CONCLUSIONES.....	95
VII. RECOMENDACIONES	97
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS	123

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Introducción

La población humana se estima por encima de los 7 mil millones de personas, con un incremento probable de alrededor de 9,6 mil millones en 2050 (1). Los grandes aumentos de la población mundial y los efectos del cambio climático facilitan la transmisión de enfermedades infecciosas, ya sea de manera directa o a través de vectores. Del mismo modo, el movimiento de personas de una región a otra por migración, turismo o viajes de negocio, así como el traslado global de carga y bienes comerciales, causan una mayor propagación de vectores, mayor transformación de la tierra, y facilitan los procesos ecológicos que promueven el contacto entre los humanos y la vida silvestre o con los vectores selváticos infectados (1).

Como consecuencia de este incremento poblacional aumentarán los sitios de cría de vectores como *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) y *Aedes albopictus* (Skuse, 1895). Por tanto, se predice un incremento desproporcional de los arbovirus transmitidos por mosquitos que actualmente tienen un grave impacto en la salud pública a escala mundial (2).

Las arbovirosis como dengue, Zika, chikunguya y fiebre amarilla constituyen un grave problema de salud a nivel mundial. Más de 70% de los países y territorios afectados por estas enfermedades se ubican en zonas de clima tropical y subtropical y tienen economías de ingresos bajos o medios-bajos (3, 4).

El control del vector es un componente sumamente importante en la interrupción de la transmisión de estas enfermedades (5). Los programas de control de vectores van encaminados a la eliminación de los criaderos a través de la integración de varias medidas como: saneamiento ambiental, participación de la comunidad, control químico y/o biológico (5).

En particular, el control químico es el método más utilizado por producir una rápida disminución de la densidad poblacional de los vectores durante picos epidémicos (6). Sin embargo, como efecto directo de su utilización se notifica el incremento de la resistencia de los vectores a los insecticidas químicos convencionales (7). Por otra parte, como efecto indirecto se produce un incremento de la contaminación ambiental y en las poblaciones de insectos resistentes ocurren cambios que se manifiestan en: aumento de la longevidad, disminución de la fertilidad y fecundidad (7).

El control larval de *Ae. aegypti* en Cuba, desde 1981 (inicio de la campaña de erradicación de *Ae. aegypti*) hasta la fecha, se basa principalmente en la reducción de los sitios de cría mediante control físico y químico (con la utilización del larvicida organofosforado temefos). La primera notificación de resistencia a temefos en *Ae. aegypti* se realizó en el año 1997 en larvas colectadas en Santiago de Cuba durante un brote de dengue (8). A partir de este año se detectaron poblaciones resistentes a este larvicida en otras provincias del país fundamentalmente en La Habana (9). El incremento de la resistencia a temefos en larvas de *Ae. aegypti*, así como el decremento de la eficacia de las formulaciones comerciales de este organofosforado se manifiesta por el uso sostenido por más de 30 años (9, 10). Sin embargo, la resistencia a temefos puede revertirse (11) si se utiliza de forma alternada con otros métodos de control. En este sentido, la utilización de biolarvicidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) es de gran utilidad (12) y constituye una de las alternativas aprobadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para su aplicación en aguas de consumo humano (13), principal sitio de cría del vector.

Los productos derivados de *B. thuringiensis* se utilizan con éxito en el control de insectos durante más de medio siglo. La capacidad insecticida de esta bacteria reside

fundamentalmente en un grupo diverso de proteínas denominadas delta-endotoxinas (14, 15). Existen más de 3000 insectos susceptibles a alguna de estas toxinas (15). En general, los productos en base a *B. thuringiensis*, se utilizan dentro del Manejo Integrado de Plagas debido a: i) escaso impacto negativo en el ambiente, ii) se descomponen relativamente de forma rápida en la naturaleza, iii) tienen poco o ningún efecto nocivo colateral hacia otros organismos, iv) son efectivos a bajas dosis, v) manifiestan escasas reacciones alérgicas y toxicidad al hombre (16, 17).

Entre los principales factores de virulencia de *B. thuringiensis* se encuentran las toxinas Cry y Cyt (toxinas o proteínas formadoras de cristales, Cry y toxinas o proteínas citolíticas, Cyt). Las toxinas Cry una vez ingeridas por las larvas, se solubilizan y son activadas por las proteasas presentes en el intestino medio. Posteriormente, se unen a receptores específicos ubicados en la membrana de la célula, provocan disrupción celular y finalmente, la muerte de la larva. Por otra parte, las toxinas Cyt exhiben principalmente actividad citolítica (15), afectan las células del intestino medio de los insectos e incrementan la acción larvicida de ciertas toxinas Cry. La presencia de las toxinas Cyt retrasa o previene la resistencia a las toxinas Cry (18). El complejo mecanismo de acción de *B. thuringiensis* se favorece por la amplia variedad de toxinas con actividad frente a dípteros lo que propicia a que el fenómeno de resistencia se presente ocasionalmente (10, 19, 20).

En Cuba, a finales de los años 80, se evaluó y comprobó la efectividad de la cepa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* 266/2 9-VII-98 serotipo H-14 (proveniente de la extinta Unión Soviética) en el control de vectores, en condiciones naturales (21). Esta cepa fue utilizada en la formulación líquida desarrollada en el Departamento de Control de Vectores del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), denominada Bactivec®, larvicida de producción nacional, que es comercializado por los Laboratorios Biológicos farmacéuticos (LABIOFAM). Estudios realizados en Cuba demuestran que la utilización del Bactivec® favorece la conducta de oviposición de las hembras de *Ae. aegypti* (22), por lo que los criaderos tratados con *B. thuringiensis* se convierten en ovitrampas líticas (12).

La elevada efectividad del Bactivec®, la conducta de ovoposición del vector ante la presencia del mismo, así como las bondades que ofrece la utilización de este biolarvicida, lo hace una alternativa factible para la disminución de las poblaciones de *Aedes* (22, 23). Sin embargo, la poca residualidad del producto demostrada por diversos autores (24-26), promueve la búsqueda de otras alternativas. Estas podrían estar encaminadas a la selección de aislamientos de *B. thuringiensis* nativos más adaptados a las condiciones ambientales propias de cada país (27-32). El presente trabajo tiene como propósito la caracterización de aislamientos de *B. thuringiensis* nativos activos contra larvas de *Ae. aegypti*, los cuales podrían ser candidatos promisorios para el desarrollo de biolarvicidas netamente cubanos.

I.2 Hipótesis

Un aislamiento de *B. thuringiensis* nativo con elevada actividad larvicida contra *Ae. aegypti* muestra mayor actividad residual que la cepa 266/2 9-VII-98 serotipo H-14.

I.3 Objetivo general

Caracterizar aislamientos de *B. thuringiensis* nativos activos contra larvas de *Ae. aegypti*.

I.4 Objetivos específicos

1. Seleccionar aislamientos de *B. thuringiensis* nativos en cuanto a su actividad larvicida, factores de virulencia contra *Ae. aegypti* y citotoxicidad.
2. Determinar la influencia de diferentes factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* sobre la actividad larvicida de los aislamientos nativos.
3. Seleccionar un aislamiento libre de betaexotoxina con elevada actividad larvicida en presencia de factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti*.
4. Seleccionar el medio de cultivo que favorece la expresión de los principales factores de virulencia y la actividad larvicida del aislamiento seleccionado.
5. Evaluar la toxicidad/ patogenicidad aguda oral del aislamiento seleccionado en el modelo biológico *Rattus norvegicus*, cepa Wistar.
6. Determinar la actividad larvicida residual del aislamiento seleccionado.

I.5 Novedad científica

Por primera vez en Cuba se obtienen y caracterizan aislamientos de *B. thuringiensis* nativos con actividad larvicida contra *Ae. aegypti* mayor que la cepa 266/2 9-VII-98 (ingrediente activo del producto comercial Bactivec®), información que podría ser útil para el desarrollo de biolarvicidas netamente cubanos.

El nivel científico del trabajo se demuestra mediante la presentación de los resultados en eventos y publicaciones, en los premios alcanzados, en las clases impartidas en la Maestría de Control de vectores, así como en cursos Internacionales de Dengue y en las tesis de las que fue tutora la autora.

- Publicaciones en 3 revistas internacionales y 1 revista nacional (Anexo I).
- Doce eventos científicos (Anexo I).
- Tesis: 1 tesis de Maestría, 3 tesis de Grado (Anexo I)
- Premios: Dos Resultados Relevante Institucional, Jornada científica de las BTJ-IPK, Fórum de Base y Municipal de Ciencia y Técnica (Anexo I).

I.6 Valor teórico

En la tesis se define una guía de trabajo para la evaluación de aislamientos de *B. thuringiensis* que pueden ser útiles en el control de vectores de importancia médica.

I.7 Valor práctico

El aislamiento de *B. thuringiensis* nativo seleccionado mantiene elevada actividad larvicida ante diferentes condiciones (altas temperaturas, presencia de: cloro, materia orgánica y NaCl), lo que podría facilitar su uso en criaderos naturales de *Ae. aegypti*. La alta residualidad que mostró el aislamiento nativo en el control larval de *Ae. aegypti*, lo convierte en una alternativa promisoriosa para el desarrollo de productos útiles en el manejo integrado de vectores.

Revisión bibliográfica

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Arbovirosis

Los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) son un grupo diverso de virus que sobreviven en la naturaleza por transmisión de hospederos infectados a susceptibles por ciertas especies de mosquitos, garrapatas, flebotomos y jejenes (33). Dentro de las familias de arbovirus se incluyen: Flaviviridae, Togaviridae, Bunyaviridae y Reoviridae. El genoma (codificado en el ARN viral) de estos virus facilita una rápida adaptación a los cambios que ocurren en el hospedero (34).

Existen más de 500 arbovirus reconocidos en todo el mundo, pero unos pocos representan un peligro para la salud humana. Algunos infectan solo ocasionalmente o causan enfermedades leves; mientras que otros tienen gran importancia médica y pueden causar grandes epidemias con una mortalidad considerable (33). Estas familias de virus son responsables del creciente incremento de enfermedades emergentes y remergentes como: dengue, fiebre amarilla, Zika y chikungunya (3).

Las infecciones por los virus dengue, transmitidas por mosquitos del género *Aedes*, constituyen dentro de las enfermedades transmitidas por vectores, la segunda (después de la malaria) en cuanto a morbi- mortalidad (3). Por muchas décadas, en la región de Las Américas el número de casos de dengue se ha incrementado (3). Según informe de la Organización Panamericana de la Salud, desde 2005 se observa un incremento en la incidencia de esta enfermedad y al cierre de 2019 los casos de dengue sobrepasaban los 2

millones (35). De igual manera, en esta región se informó un incremento en las defunciones por esta enfermedad a partir del año 2005 con una máximo en 2015 (35).

El espectro clínico del dengue es amplio se presenta desde formas no severas, con o sin signos de alarma, a formas severas de la enfermedad (2). La infección por dengue induce inmunidad protectora al serotipo infectante, pero una infección secundaria con diferente serotipo es considerado el principal factor individual de riesgo para el desarrollo de la forma severa (36).

II.2 *Aedes aegypti*: principal vector de dengue, chikunguya, Zika y fiebre amarilla en Las Américas

Los mosquitos vectores de las arbovirosis pertenecen a la familia Culicidae, suborden Nematocera, Orden Diptera (37). Se dividen en dos grupos: el primero comprende los mosquitos del género *Aedes* los cuales transmiten enfermedades que pueden provocar: artralgias, afecciones del sistema nervioso central o hemorragias; el otro grupo incluye los mosquitos del género *Culex*, que transmiten virus que producen encefalitis (2, 33).

Dos especies del género *Aedes* son los principales y más importantes vectores de arbovirosis en Las Américas: *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (3), aunque *Ae. aegypti* es considerado el vector primario para dengue, chikunguya, Zika y fiebre amarilla en esta región (3). Esta especie es urbana, peri-doméstica, muy asociada a los humanos, cría en depósitos naturales o artificiales pero siempre muy cercana a las viviendas o dentro de estas (37).

La habilidad que tiene *Ae. aegypti* de ovipositar en gran número de recipientes generados por la actividad humana, garantiza una disponibilidad permanente de criaderos potenciales y sobrevivencia de la especie (37-39). Su presencia está favorecida por insuficiente recogida de desechos, bajos niveles de implicación de la comunidad en el reordenamiento del medio e inestable abasto de agua (37).

La hembra deposita los huevos en números de 100-300, en diferentes recipientes, a nivel de la superficie del agua y se adhieren a la pared de los depósitos. Para su maduración y completo desarrollo los huevos necesitan una elevada humedad y temperaturas superiores a los 20°C. El huevo ya maduro al entrar en contacto con el agua eclosiona y emerge la larva que inicia un ciclo de cuatro estadios larvales. Después de mudar cuatro veces la cubierta, la larva completa su desarrollo, cesa su alimentación y se transforma en pupa. En esta etapa la pupa solo necesita respirar y aproximadamente en dos días completa su desarrollo. Finalizada esta fase, se rompe la cubierta por la región céfalo-torácica y emerge el adulto (37).

II.3 Métodos de control

Dada la ausencia de agentes antivirales o vacunas eficaces para curar o prevenir la mayoría estas arbovirosis, es indiscutible que el factor primordial para interrumpir la transmisión es la disminución de las poblaciones del vector, tanto de especímenes inmaduros como de adultos (5, 40).

La comunicación social para la participación comunitaria tiene dentro de sus objetivos educar y empoderar a la población para la identificación y eliminación (mediante métodos físicos) de sitios de cría de *Ae. aegypti*. Además, facilita la aplicación de otros métodos de control en la comunidad (control biológico y químico) (4).

Otro factor clave en la lucha contra este vector es el suministro eficiente de agua potable y una adecuada gestión ambiental en las comunidades que incluya manejo de los desechos sólidos (control físico) (4).

A pesar de las recomendaciones de la OMS de implementar diferentes estrategias de control integradas adaptadas a contextos locales (4), el control de los vectores transmisores de enfermedades se realiza principalmente con la aplicación de sustancias químicas (6).

II.3.1 Control mediante insecticidas químicos

Los insecticidas más utilizados en el control de las larvas de mosquitos son los organofosforados, los organoclorados, los reguladores del crecimiento y los derivados del petróleo. El organofosforado temefos (Abate®) es considerado uno de los mejores insecticidas para el control larval, mientras que para el control de los adultos se emplean fundamentalmente otros organofosforados (Fention®, Clorpirifos®, Malation®), piretroides (Cipermetrina®, Lambdacialotrina®) y carbamatos (Propoxur®) (6).

Estos insecticidas generan problemas de contaminación ambiental, debido a su uso irracional, ya que tienen efecto residual prolongado (13, 41). Causan toxicidad a insectos no blancos a controlar y, de manera más importante, a las personas que los aplican (7, 42). Por otra parte, dichas sustancias pierden su eficacia en el control de insectos, ya que su aplicación continua genera la aparición de poblaciones resistentes (4, 9, 43, 44). El elevado costo de nuevos insecticidas químicos, así como los elementos anteriormente expuestos evidencian que el control de vectores no debe efectuarse de forma exclusiva con productos químicos (7).

II.3.2 Control biológico

El control biológico se basa en la introducción de organismos que parasitan, compiten o reducen las poblaciones de la especie objetivo a controlar. Este control puede tener efecto sobre larvas o adultos (45).

Los agentes de control biológico pueden adaptarse a las condiciones del hábitat de cría de los mosquitos (46) y tienen menos impacto ecológico que la aplicación de insecticidas químicos (13). Por otra parte, no representan un peligro para las personas por ser especie específico (46). Constituyen una alternativa respetuosa y no contaminante para el medio ambiente. Finalmente, con su utilización se reduce notablemente la aparición de poblaciones de mosquitos resistentes (45, 47). Debido a ello, los métodos de control biológico son considerados como alternativas seguras y efectivas para el control de vectores.

Para el control de estadios larvales de *Ae. aegypti* se utilizan microorganismos, peces larvivoros y copépodos (19, 22, 48). En la actualidad se evalúan las Técnicas de Insecto Estéril (TIE) las cuales pueden influir en la reducción de poblaciones de adultos de *Ae. aegypti* y/o bloqueo de la trasmisión de arbovirus.(3, 49-51).

Entre los microorganismos utilizados en el control de *Ae. aegypti* se encuentran:

Virus: virus poliedrosis nuclear (NPVs, del inglés, nuclear polyhedrosis virus) (Baculoviridae: *nucleopolyhedrovirus*), virus de la poliedrosis citoplasmática (CPVs) (Reoviridae: *cypovirus*), iridovirus (MIVs, del inglés mosquito iridescent viruses) (Iridoviridae: *chloriridovirus*) (52, 53).

Bacterias: *Lysinibacillus sphaericus*, *B. thuringiensis*, *Wolbachia* (3, 51, 54-61).

Protistas: *Nosema algerae*, *Amblyospora connecticus* (52).

Hongos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y los géneros *Lagenidium*, *Coelomomyces* y *Culicinomyces* (62).

De estos microorganismos, *B. thuringiensis* es la especie más empleada en la producción de biolarvicidas utilizados en el control de vectores que transmiten patógenos a humanos y animales (14, 15, 63-65).

II.4 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva con la capacidad de esporular. Es muy semejante a otras especies del género *Bacillus*, como *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. La diferencia fundamental radica en que en *B. thuringiensis* se produce la formación de cristales proteicos (cuerpos paraesporales) durante el proceso de esporulación (66, 67).

II.4.1 Historia

Bacillus thuringiensis se aisló por primera vez en Japón por Ishiwata en 1901 como patógeno del gusano de seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae), ocasionando la

enfermedad de Sotto. En 1911 Berliner, en Alemania, aisló la misma bacteria de larvas del lepidóptero *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae), la palomilla de la harina del Mediterráneo. En este mismo año realizó la descripción de esta bacteria: bacilo Gram positivo, que presenta un cristal paraesporal de naturaleza proteica, endospora y flagelos peritricos en distintas fases del ciclo de crecimiento. Se denominó *B. thuringiensis*, en honor a la región alemana donde se aisló: Thuringia (17).

La utilización de *B. thuringiensis* para el control de insectos se inició en la década del 30, y el primer producto se comercializó en Francia en 1938, mientras que en Estados Unidos de América (EUA) en 1957. Desde entonces se desarrolló la producción de forma masiva en varios países del mundo. Más tarde en 1977, dos entomólogos israelíes aislaron un bacilo a partir de *Culex* sp., con elevada actividad contra larvas de mosquitos, el cual se designó con el nombre de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* (68).

Desde el descubrimiento e identificación de *B. thuringiensis*, se describen 83 serovariedades (variedades o subespecies) distintas según el antígeno flagelar, en el intento de encontrar nuevas toxinas con actividad biológica. En los años 80 fueron descritas las variedades activas contra coleópteros (*tenebrionis* y *san diego*) pertenecientes a *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni*. Las serovariedades (variedades) de mayor impacto a nivel industrial son *kurstaki*, *israelensis* y *morrisoni* (64). La mayoría de variedades son activas contra larvas de diferentes grupos de Lepidópteros, y algunas también lo son contra Dípteros y Coleópteros (64).

II.4.2 Clasificación taxonómica, características generales y ecología

Reino: Procariota

Dominio: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus thuringiensis*

Debido a la similitud genética las especies: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *B. thuringiensis* se incluyen dentro del grupo denominado *Bacillus cereus*. Dentro de estas, las especies *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* son consideradas como patovares de una misma especies. Esta información taxonómica aparece notificada en el Manual de Bergey de Sistemática de Archaea y Bacterias (67).

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho y posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales. Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y presenta actividad catalasa (67, 69).

El ciclo de vida de esta bacteria se caracteriza por dos fases que incluyen división celular vegetativa y desarrollo de esporas, también conocido como ciclo de esporulación (17). La célula vegetativa tiene forma de varilla (2–5 μm de largo y aproximadamente 1,0 μm de ancho) (67) y se divide en dos células hijas mediante la formación de un tabique de división a lo largo de la membrana plasmática (17). La esporulación implica la división celular asimétrica y se caracteriza por siete etapas que incluyen: I- la formación de filamentos axiales, II- la formación del tabique de esporas, III- engullimiento, primera aparición de cristales paraesporales y formación de pre-esporas, IV a VI- formación del exosporium, pared celular primaria, corteza y capas de esporas acompañadas de transformación de la espora nucleoide, VII- maduración de esporas y lisis de esporangios (17).

La producción de proteínas cristalinas (cuerpos paresporales) por *B. thuringiensis* durante la esporulación está regulada genéticamente y probablemente alivia el estrés al compensar la pérdida de agua durante la formación de esporas, lo cual brinda una ventaja adicional de supervivencia al ejercer una acción letal contra los insectos hospedantes. A su vez, la acción tóxica de la bacteria garantiza la obtención de nutrientes del hospedero, lo que permite la germinación de la espora bacteriana latente a célula vegetativa (17).

Bacillus thuringiensis crece en gran variedad de medios no selectivos, siendo el caldo nutriente y Luria Berthani (LB) dos de los más utilizados (67). Esta especie bacteriana se desarrolla adecuadamente entre los 15 y los 45°C (67), aunque la temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 26 y 30°C, pudiéndose producir pérdidas de plásmidos a temperaturas mayores de 32°C. Durante el crecimiento, esta bacteria no es especialmente exigente en cuanto al pH (entre 5,5 y 8,5), aunque el pH óptimo está comprendido entre 6,5 y 7,5 (70).

La morfología de las colonias de *B. thuringiensis* crecidas en placa puede variar en relación con el medio de cultivo utilizado. En Agar Nutriente forma colonias circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro. El diámetro que alcanza en la placa de cultivo depende directamente de la densidad de colonias que alberga. Su textura es seca y cerosa, apreciándose en colonias maduras en cuyo círculo central se observa una superficie de apariencia más brillante y lisa que el halo externo de aspecto mate, debido probablemente a la esporulación de las células centrales, más adelantadas en el ciclo (69).

Bacillus thuringiensis posee la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (67, 69). Sin embargo, su principal característica es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión paraesporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (67). Estas proteínas son llamadas Cry (del inglés, crystal) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial (47).

Desde el punto de vista ecológico, no se conoce con exactitud el hábitat natural de *B. thuringiensis*. Frecuentemente, se aísla del suelo donde persiste en forma de endospora por largos periodos de tiempo (27, 29, 71). Se considera que es un patógeno especializado, coloniza y mata los hospederos, y al multiplicarse en los organismos muertos se deposita en el suelo y las plantas (72). Otras fuentes de aislamiento de *B. thuringiensis* son partículas de polvo en suspensión, productos almacenados, alimentos, piel de animales, sedimentos marinos, e incluso en humanos como patógeno oportunista (73).

II.4.3 Cristales paraesporales

Desde el instante en que ocurre el englobamiento de la pre-espora hasta su maduración, en simultaneidad con la formación de la espora (Fig.1), tiene lugar en *B. thuringiensis* la síntesis de uno o varios cristales paraesporales (Fig.1). Estos cristales (o cuerpos paraesporales) pueden representar hasta 30% del peso seco del esporangio (67), y están conformados por delta-endotoxinas (δ - endotoxinas) (74). Los mismos, pueden presentar distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (75).

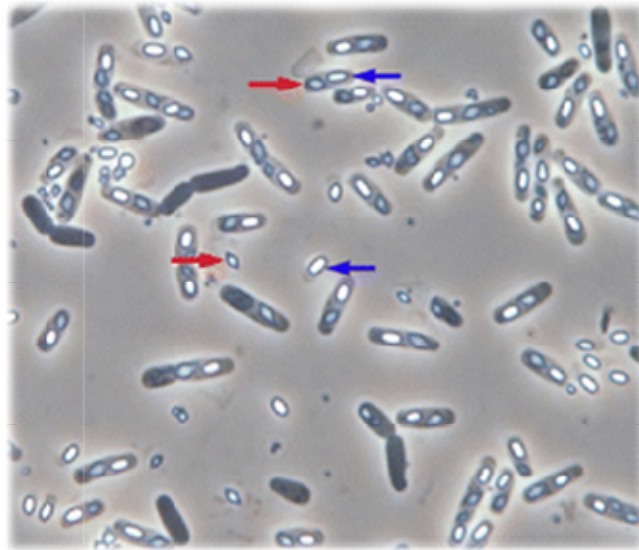


Figura 1. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en microscopía de contraste de fase (1000x): endosporas (→) y cristales (→). Fuente: (Liu *et al*, 2015) (76).

II.4.4 Genes codificantes de proteínas insecticidas Cry y Cyt

El cromosoma de *B. thuringiensis* tiene una talla molecular de 2,4 a 5,7 millones de pares de bases (pb) (77). En las diferentes subespecies de *B. thuringiensis* se encuentra 80% de genes conservados por lo que existe semejanza filogenética. La variabilidad de *B. thuringiensis* viene dada por la adquisición de genes esenciales y no esenciales de otros microorganismos debido a que esta especie posee un pangenoma abierto (78).

Aunque existen algunos genes codificados en el cromosoma, los genes que codifican proteínas Cry se encuentran principalmente en plásmidos. Aproximadamente, entre 10-20% de la capacidad de codificación genética de *B. thuringiensis* se encuentra en los plásmidos (77).

Se han clonado y secuenciado 800 genes *cry* que se clasificaron sobre la base de su similitud de secuencias en más de 70 grupos divididos en diferentes clases y subclases. Además, se conocen 16 genes *cyt* diferentes que codifican para proteínas Cyt agrupadas en tres grandes grupos (Cyt 1-3) (79).

Los plásmidos de *B. thuringiensis* tienen la capacidad de conjugarse no solo intraespecie sino también interespecies. Estos plásmidos se replican y se mantienen a lo largo de generaciones con una gran eficacia, lo que puede representar una ventaja evolutiva que justifica su papel dentro del mecanismo de replicación de la bacteria (77).

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* contiene un mega-plásmido, secuenciado en su totalidad, llamado pBtoxis requerido para la formación del cristal paraesporal debido a que alberga los genes que codifican las endotoxinas. Incluye los genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa*, *cyt2Ba* y *cyt1Ca* (80). Este cristal contiene grandes cantidades de toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A, lo que ha facilitado su estudio en calidad de complejo o por separado. Además, se concentran en pequeñas cantidades las proteínas Cry10Aa, Cyt2Ba y Cyt1Ca que parecen contribuir a la toxicidad de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (14).

II.4.5 Toxinas Cry

Las toxinas Cry no pertenecen a una sola familia proteica, sino que incluyen un número de linajes no relacionados. El grupo más grande comprende las proteínas Cry de tres dominios conocidos, mientras que otras toxinas Cry pertenecen a distintas familias proteicas. Actualmente, las proteínas Cry constituyen el grupo más grande de proteínas insecticidas producidas por especies de *Bacillus*. Hasta la fecha, el Comité de Nomenclatura de Toxinas de *B. thuringiensis* (79) clasificó 78 tipos diferentes de proteínas Cry (Cry 1 a Cry 78), incluyendo tres dominios y las proteínas de la familia ETX_MTX2 de *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* (79).

Estas proteínas poseen toxicidad bien documentada contra lepidópteros, coleópteros, hemípteros, dípteros, nemátodos, algunos caracoles y/o células cancerígenas de diversos orígenes en humanos (Fig. 2) (15, 81, 82).

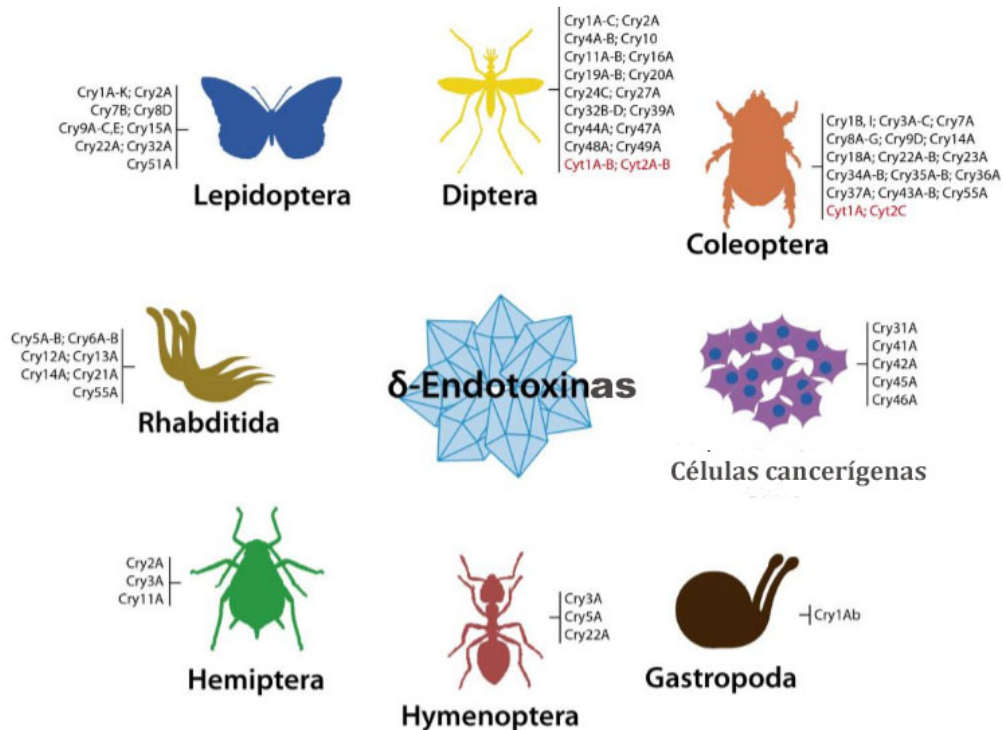


Figura 2. Delta-endotoxinas (Cry y Cyt) de *B. thuringiensis* con actividad sobre hospederos conocidos. Fuente: (Palma *et al.* 2014) (15).

La proteína Cry4Aa, codificada por una secuencia de 3543 pb (1180 aminoácidos), es altamente tóxica para las larvas de *Culex* y menos para *Anopheles* y *Aedes* (Tabla 1) (14). Por su parte, Cry4Ba, codificada por una secuencia de 3408 pb (1136 aminoácidos), tiene alta actividad larvicida contra *Anopheles* y *Aedes* pero baja contra *Culex* (Tabla 1) (14). Cry11Aa está codificada por una secuencia de 1929 pb (643 aminoácidos) y muestra elevada actividad larvicida contra las larvas de *Aedes* y *Culex*, pero más baja contra *Anopheles* (Tabla 1) (14).

La proteína Cry10Aa, codificada por una secuencia de 2025 pb (675 aminoácidos), se acumula en pequeñas cantidades en cristales de *B. thuringiensis* (Tabla 1). La toxicidad de Cry10Aa es comparable a la de otras toxinas (Cry4) (14, 83).

Tabla1. Proteínas Cry y Cyt con actividad contra mosquitos

Proteínas en forma de pro-toxinas	PM de las proteínas en su forma activa (kDa)	Toxicidad	Sinergismo
Cry4 Aa (134 kDa)	20 y 45	<i>Culex</i> > <i>Anopheles</i> ≥ <i>Aedes</i>	Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba
Cry4 Ba (128 kDa)	11 y 45	<i>Anopheles</i> ≥ <i>Aedes</i> > <i>Culex</i>	Cry4Aa, Cry11Aa, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt2Aa
Cry11Aa (72 kDa)	30–33 y 34–38	<i>Aedes</i> ≥ <i>Culex</i> > <i>Anopheles</i>	Cry4Aa, Cry4Ba, Cyt1Aa, Cyt2Ba
Cyt1Aa (27 kDa)	22–25	<i>Culex</i> ≥ <i>Aedes</i> > <i>Anopheles</i>	Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa
Cry10Aa (78 kDa)	58–68	<i>Aedes</i> > <i>Culex</i>	Cyt1Aa, Cry4Ba
Cyt2Ba (29 kDa)	22,5	<i>Culex</i> ≥ <i>Aedes</i> > <i>Anopheles</i>	Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa

Fuente: Ben Dov, 2014 (14).

PM: peso molecular

Las toxinas Cry contienen tres dominios estructurales y comparten un alto grado de similitud topológica. El **dominio I** está compuesto por un paquete de siete α hélices conectadas por bucles. El paquete α -helicoidal tiene una α hélice anfipática central que está bien conservada entre todas las toxinas descritas. Varias mutaciones en el dominio I

parecen disminuir la toxicidad. Se desconoce si estas mutaciones afectan la conformación general de la molécula de toxina y de esta forma la toxicidad puede comprometerse. El **dominio II** consta de tres conjuntos de láminas β antiparalelas, cada una de las cuales termina con un bucle. Las láminas β se empaquetan alrededor de un núcleo hidrofóbico central que forma una estructura llamada β -prisma. El **dominio III** es un emparedado de dos láminas β antiparalelas que forman una topología de "rollo de gelatina". Las mutaciones producidas en los dominios II y III evidencian la participación de las toxinas cry en la unión a los receptores específicos de membrana y en la actividad larvica (84).

Funciones de los dominios estructurales de las toxinas Cry:

Dominio I: supuestamente interviene en formar canales iónicos en la membrana celular (85) y los motivos hidrófobos dentro de este dominio son los que afectan la toxicidad de las toxinas Cry. Al entrar en contacto con la membrana celular, el dominio se vuelve a plegar para facilitar la inserción de la toxina en la membrana como con otras toxinas bacterianas (70).

Dominio II: es el dominio más divergente entre las toxinas Cry y el reemplazo o cambio de los dominios II y III de otras toxinas puede afectar la especificidad del hospedero (70). En las toxinas con actividad contra dípteros, Cry4A, Cry4B y Cry11Aa, las regiones de asa del dominio II se relacionan con la interacción y especificidad del receptor de toxina (64).

Dominio III: se relaciona con la unión del receptor y la formación de canales en la membrana celular (70). También se involucra en la toxicidad. La sustitución de alanina por dos residuos de serina en las posiciones 503 y 504 en la toxina Cry1Ac conlleva a que la toxina se una con menos afinidad. El intercambio *in vitro* del dominio III en ciertas toxinas Cry, ha provocado alteraciones en la actividad específica contra insectos (70). En cualquier caso, el dominio III seguramente está involucrado tanto en la unión al receptor como en la acción insecticida. En resumen los dominios II y III intervienen en la unión al receptor y la acción de la toxina (70).

II.4.6 Toxinas Cyt

Las proteínas Cyt (del inglés, cytotoxic) citotóxicas, codificadas por genes *cyt*, constituyen otra familia de proteínas insecticidas relevantes en *B. thuringiensis*. En contraste a proteínas Cry, las proteínas Cyt exhiben una actividad citolítica (hemolítica) *in vitro* y predominantemente contra dípteros *in vivo*. Hasta la fecha, el Comité de Nomenclatura de Toxinas de *B. thuringiensis* clasificó a las proteínas Cyt en tres familias diferentes (Cyt1, Cyt2 y Cyt3) (79) con toxicidad, en su mayor parte, contra algunos mosquitos y moscas negras (74).

Las familias Cyt1 (1Aa, 1Ab, 1Ac y 1Ad), Cyt2 (2Aa, 2Ba, 2Bb, 2Bc y 2Ca) y Cyt3 (Aa1) comparten un alto nivel de identidad de secuencia. Se observan similitudes estructurales entre estas tres toxinas. La estructura general tiene un dominio único de arquitectura α / β , con una lámina β en el centro rodeada por dos capas α -helicoidales. La lámina β central consta de seis cadenas β antiparalelas, flanqueadas por una capa de hélice α compuesta de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en un lado y $\alpha 3$ - $\alpha 5$ en el otro (86). La alineación de secuencias revela que hay cuatro bloques de alta similitud: Bloque 1, hélice $\alpha 1$; Bloque 2, región $\alpha 5$ a $\beta 5$; Bloque 3, región $\beta 6$ - $\beta 7$; Bloque 4, región $\alpha 6$ - $\beta 8$ (74). En Cyt1Aa, la horquilla $\beta 2$ - $\beta 3$ entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es común a todos los miembros de la familia Cyt1, pero está ausente en el grupo Cyt2. La horquilla $\beta 6$ - $\beta 8$ de Cyt1Aa se encuentra seguida de la cadena $\beta 4$. Al comparar extremo N-terminal de Cyt1Aa y Cyt2Aa se revela la existencia de una cadena adicional $\beta 0$ solo en Cyt2Aa, esta cadena puede desempeñar un papel importante en la dimerización y la activación proteolítica (74).

Algunas subespecies de *B. thuringiensis*, por ejemplo subsp. *morrisoni*, (var. *morrisoni*) presentan genes *cyt* que codifican para proteínas con actividad tóxica contra un amplio rango de insectos, incluyendo Dípteros, Lepidópteros y Coleópteros. También se ha notificado que Cyt2C puede ser activa contra nematodos (Rhabditida) y células cancerígenas (74). Otra característica interesante de las proteínas Cyt es su habilidad para catalizar la actividad insecticida de otras toxinas Cry o Vip3 (Vip; proteínas secretadas por cepas de *B. thuringiensis* durante el crecimiento vegetativo, del inglés, vegetative

insecticidal proteins) y reducir los niveles de resistencia del insecto a algunas proteínas Cry en determinadas especies de insectos (15, 64, 74).

Por ejemplo, la toxina Cyt1Aa es activa contra *Chrysomela scripta* e inhibe el desarrollo de resistencia ante Cry3Aa. De igual modo, Cyt1Aa, codificada por una secuencia de 744 pb (248 aminoácidos), puede suprimir la resistencia a Cry4 y las toxinas Cry11Aa en larvas de laboratorio de poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*. La unión de Cry11Aa a Cyt1Aa facilita la oligomerización de la toxina Cry11Aa y la formación de un poro, y se han propuesto como mecanismo principal de sinergismo (15, 74). Además, se demostró que la presencia de las toxinas Cyt1Ab y Cyt2Ba (codificada por una secuencia de 789 pb (263 aminoácidos)) de *B. thuringiensis* subsp. *medellín* y subsp. *israelensis*, incrementó la actividad insecticida de *L. sphaericus* contra *Ae. aegypti* y disminuyó la resistencia de larvas de *Cx. quinquefasciatus*. También se ha demostrado que Cyt1Aa presenta una actividad sinérgica contra *Cx. quinquefasciatus* cuando se combina con la toxina Mtx1 de *L. sphaericus* (15, 74).

II.4.7 Otros factores de virulencia producidos por *B. thuringiensis*

Además de las proteínas Cry y Cyt, *B. thuringiensis* posee otros factores de virulencia que le permiten sobrevivir y multiplicarse dentro del hospedero, evadir el sistema inmune y producir septicemia. Algunos de estos factores de virulencia, como fosfolipasas, enterotoxinas, betaexotoxinas, y quitinasas, no tienen especificidad por el orden de insectos que afectan y se encuentran ampliamente distribuidos dentro de los distintos serovares de *B. thuringiensis* y otros miembros del grupo *B. cereus* (15).

Dentro de los factores inespecíficos, las beta-exotoxinas exhiben una amplia toxicidad contra diferentes especies de insectos pertenecientes a los órdenes: Diptera, Coleóptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera, y Isoptera y muchas especies de nematodos. Esta exotoxina termoestable, producida durante el crecimiento vegetativo y secretada al sobrenadante del medio, también presenta actividad contra células de mamíferos, por lo que la OMS prohíbe la utilización de productos que la contengan (87).

Otro factor de virulencia que tienen especificidad por el orden de insectos lo constituye el grupo de proteínas llamado Vip (15). Las Vip son proteínas insecticidas no relacionadas con las Cry que no forman inclusiones cristalinas y que se secretan al medio durante el crecimiento vegetativo de la bacteria (Vip 1-3) (79). Incluyen la toxina binaria Vip1 y Vip2 con especificidad para coleópteros y la toxina Vip3 con especificidad para lepidópteros. Existen en la actualidad 40 genes *vip3* distintos clasificados en dos clases (A y B), que codifican para proteínas de aproximadamente 88 kDa. Si bien las Vip3 comparten algunas etapas en el modo de acción con las Cry, utilizan distintos receptores (15).

Otras proteínas llamadas Sip (proteínas insecticidas secretadas por *B. thuringiensis*, del inglés, secreted insecticidal proteins) constituyen el primer y único miembro de esta familia. Estas proteínas se producen y secretan por *B. thuringiensis* durante la etapa de crecimiento vegetativo y poseen propiedades insecticidas para coleópteros (15).

II.4.8 Mecanismo de acción de las proteínas Cry y Cyt

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas, que no producirán daño hasta ser procesadas por proteasas intestinales, generando las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva. Las toxinas atraviesan la membrana peritrófica en su forma monomérica, y se unen de forma univalente a la caderina, posteriormente 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 (88, 89).

Por otro lado, la unión de los monómeros a caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina. Este 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 (APN) 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 (Fig. 3). El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales lo que lleva a la muerte de la larva (90).

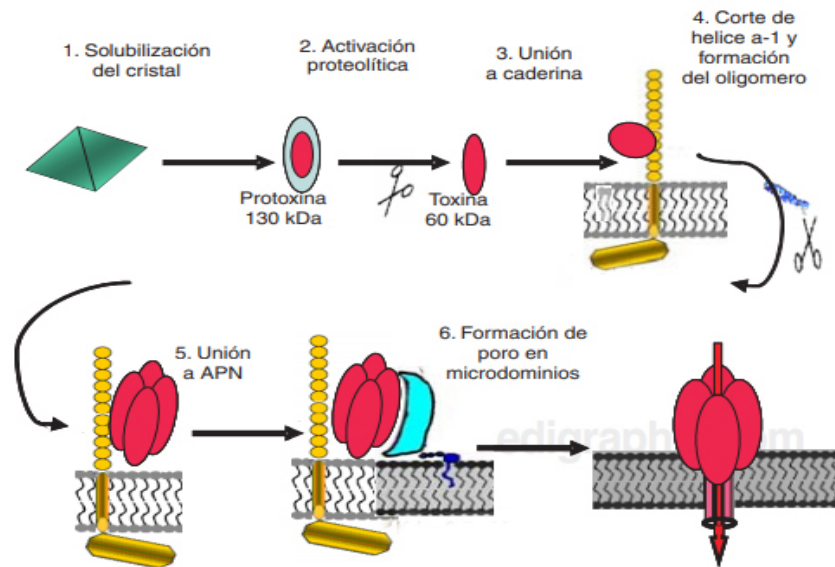


Figura 3. Mecanismo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Fuente: Ibarra *et al*, 2006 (91).

APN- Aminopeptidasa-N

Para las proteínas Cyt se describen dos mecanismos de acción: uno sugiere un modelo de formación de poro, mientras que el otro apoya un mecanismo de acción tipo detergente menos específico (15, 74). Estas proteínas interactúan directamente con los lípidos de la membrana se insertan en la misma y forman poros o destruyen la membrana al interactuar con esta mediante su acción detergente (64).

La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele del insecto (47). La mortalidad inducida por *B. thuringiensis* también depende de

ciertas bacterias entéricas que son parte de la microbiota normal 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 (47).

La elevada actividad contra larvas de mosquitos de *B. thuringiensis* se atribuye a complejas interacciones proteicas entre sus delta-endotoxinas. Estas interacciones se producen fundamentalmente entre seis proteínas, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba (Tabla 1), las cuales tienen disímiles niveles de toxicidad contra diferentes especies de mosquitos. La toxicidad de cada una de las cuatro toxinas Cry es mayor que la de las Cyt, pero la actividad final es el resultado de las interacciones entre ambas (14).

Las combinaciones: Cry4Aa y Cry4Ba, Cry4Aa y Cry11Aa, son sinérgicas contra larvas de *Culex*, *Aedes* y *Anopheles*, mientras que Cry4Ba y Cry11Aa contra *Ae. aegypti* (Tabla 1) (14). De igual forma, las interacciones de Cry10Aa y Cyt2Ba, Cry10Aa y Cyt1Aa contribuyen a la actividad insecticida contra *Ae. aegypti* (83), así como Cyt2Ba con Cry4Aa (14) (Tabla 1).

Las proteínas Cyt1Aa y Cyt2Aa actúan como receptores de las proteínas Cry. Se sugiere que la interacción entre estas proteínas facilita la unión con la célula receptora del insecto y disminuye la resistencia (14). Cyt1Aa, al unirse a la membrana de la célula intestinal de la larva funciona como un receptor, e inserta su lámina β en la membrana después que ocurren los cambios conformacionales. Esto facilita que dos de sus componentes (bucle $\beta 6$ - αE y parte de $\beta 7$) se unan con alta afinidad a Cry11Aa, que posteriormente se inserta en la membrana epitelial de la larva (64). Los residuos K198 en $\beta 7$ y E204 en $\alpha 6$ y K225 en $\beta 8$ están involucrados en este proceso. Inconsistente con este modelo, estos tres residuos parecen estar insertados en la membrana celular (86), y un mecanismo alternativo sugiere que Cry11Aa se une a Cyt1Aa usando estos residuos expuestos y cargados antes de su inserción en la membrana (Fig. 4) (14, 91).



Figura 4. Modelo de sinergismo entre las proteínas Cyt y Cry. Fuente: Ibarra *et al*, 2006 (91)

II.4.9 Resistencia a *B. thuringiensis*

La habilidad de los insectos para sobreponerse y adaptarse al estrés ambiental provoca que los métodos de control sean ineficientes, como sucede con el empleo excesivo de algunos insecticidas.

La intoxicación de las larvas de *Ae. aegypti* con *B. thuringiensis* induce la transcripción diferencial de tres categorías de genes (92):

1. Los genes involucrados en el tráfico intra y extra celular, incrementan su transcripción.
2. Los llamados genes *B. thuringiensis* (activadores de receptores de toxinas), disminuyen la transcripción.
3. Los genes que codifican para enzimas de detoxificación, disminuyen la transcripción.

Para que se produzca resistencia en las larvas se tienen que activar todas las categorías de genes descritas con anterioridad, bajo diferentes concentraciones para cada toxina Cry con actividad contra dípteros (92). Aun cuando se logre la activación de todas las combinaciones genéticas que generen resistencia a *B. thuringiensis*, la presencia de las toxinas Cyt retrasa el desarrollo de la resistencia y restaura la toxicidad de las toxinas Cry mediante su efecto sinérgico y su capacidad de actuar como receptor (14, 92). En *Ae.*

aegypti solo se detectan niveles insignificantes de resistencia a nivel de laboratorio siendo esta inestable y se revierte en ausencia de presión de selección (14, 60, 93).

II.4.10 Factores bióticos y abióticos que afectan la actividad de *B. thuringiensis*

El conocimiento de los factores que afectan la eficacia y residualidad de un biolarvicida es imprescindible para la elección de una dosis de aplicación óptima, particularizando en cada caso. La concurrencia de varios de esos factores podrían reducir o incluso anular la efectividad (65).

Dentro de los factores bióticos que afectan la actividad larvicida de *B. thuringiensis*, se encuentra el incremento de la densidad larvaria. En criaderos con elevada densidad sería conveniente incrementar las dosis de aplicación de *B. thuringiensis* (94). Este fenómeno podría deberse a que el principio activo debe ser ingerido por las larvas para ejercer su efecto. A mayor densidad larvaria mayor es la competencia por el producto y puede llegar el momento en que la cantidad consumida por la larva no llegue a la concentración letal requerida. Por lo tanto, según recomendaciones de la OMS, las dosis deben ser ajustadas de acuerdo con la densidad larvaria presente en cada criadero (94, 95).

El estadio de desarrollo de las larvas de mosquitos también influye en la efectividad de *B. thuringiensis*. La talla y fortaleza física de las larvas en estadios tardíos le permiten tolerar las toxinas durante mayor tiempo. Sin embargo, las larvas recién eclosionadas (primer estadio temprano), muestran menor susceptibilidad que las del estadio subsiguiente (segundo estadio); lo que está en relación con su comportamiento de alimentación. Estas larvas permanecen mayor tiempo en la superficie e ingieren menor cantidad de partículas de la formulación, como consecuencia de la rápida sedimentación de las mismas (95). Al final del cuarto estadio larval y en pupas la alimentación cesa del todo por lo que dejan de ser susceptibles a *B. thuringiensis* (108).

La disponibilidad de alimento en los criaderos es otro factor a tener en cuenta. En las larvas bien alimentadas se produce una disminución de la eficacia del biolarvicida ya que al tener los requerimientos nutricionales necesarios serán más saludables y por tanto estarán en

capacidad de resistir hasta cierto punto el complejo mecanismo de acción de *B. thuringiensis* (94). Además, esta disponibilidad de alimentos es sinónimo de una mayor presencia de materia orgánica en el medio. En el año 2012, Tetreau *et al* demostraron que las toxinas Cyt se unen de manera irreversible a la materia orgánica. Al producirse esta unión las toxinas Cyt no pueden ejercer su mecanismo de acción sobre las larvas (96), disminuyendo la actividad larvicida.

En dependencia del rango de temperatura al que este expuesto el criadero este factor puede ejercer un efecto negativo o positivo sobre la actividad larvicida. Con larvas de *Ochlerotatus squamiger* frente al formulado VectoBac® TP (polvo) a base de *B. thuringiensis* serotipo H-14 se obtuvo una CL_{50} 2,4 veces mayor a 6°C que para 14°C (97). Por otra parte, Cao *et al* en 2012 demostraron que variaciones de la temperatura entre 15 y 30°C incrementan la toxicidad de *B. thuringiensis* (98). Esto puede estar dado porque con el aumento de la temperatura se incrementa el metabolismo de la larva. Esto conlleva a un crecimiento acelerado en las larvas por lo que consumen mayor cantidad de alimentos para satisfacer sus necesidades y de esta forma ingieren una mayor cantidad de las toxinas Cry y Cyt presentes en el medio (97, 98).

Un factor que influye de forma negativa en la actividad larvicida es la luz solar (radiaciones gamma y ultravioletas (UV)) ya que esta afecta la viabilidad de las esporas de los biolarvicidas (61). En un estudio llevado a cabo por Maldonado *et al.* (2002), se determinó que en suspensiones acuosas de *B. thuringiensis* la actividad larvicida se afectó después varios periodos de exposición a UV a 256 nm (99). Debido a la disminución de la eficacia de los formulados a base de *B. thuringiensis* expuestos a la radiación UV se propone la adición de sustancias fotoprotectoras (99, 100).

La presencia de sales en los criaderos puede tener impacto negativo (101) o favorecer (102) la actividad larvicida de *B. thuringiensis*. Esto depende de la capacidad intrínseca de cada cepa a la tolerancia de diferentes concentraciones de sales. En algunas cepas, el NaCl puede favorecer el proceso de esporulación y producción de delta-endotoxinas (102), lo que incrementa la actividad larvicida.

La posible influencia de estos factores sobre la actividad larvicida de los formulados elaborados a base de *B. thuringiensis*, sugiere la necesidad de un monitoreo constante de los mismos en aras de obtener mejores resultados en la reducción de poblaciones de mosquitos vectores.

II.4.11 Medios de cultivo para la producción de *B. thuringiensis*

La composición del medio de cultivo es importante debido a que los requerimientos nutricionales varían entre las serovariedades de *B. thuringiensis*. De esta forma, un medio de cultivo basado en la combinación de nutrientes para una variedad no es necesariamente adecuado para otra, por lo que la producción de delta-endotoxina depende no solo del aislado sino también del medio de cultivo (103). Içgen *et al* en 2002 reveló una regulación diferencial de las proteínas Cry, con la demostración de que la síntesis de una u otra proteína se favorecía en relación a los ingredientes del medio de cultivo (104). Por tanto, es difícil generar un medio que sea efectivo para todas las cepas, por lo que existen una gran variedad de medios de cultivo. En todos los casos es importante que contengan una fuente de carbono que suministre energía para los procesos anabólicos, una fuente de nitrógeno para los procesos de crecimiento, esporulación y síntesis de la proteína, y no menos importante la adición de sales de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , y Fe^{2+} (103, 105, 106).

Içgen *et al* evaluó la adición de minerales a diferentes concentraciones para determinar el efecto en el crecimiento y producción de proteínas Cry en *B. thuringiensis*. Como resultado de este estudio, se demostró que con la omisión de Mg^{2+} en el medio de cultivo se disminuyeron los procesos de crecimiento y esporulación, pero el mayor efecto se evidenció en la disminución de la producción del cristal (104). El calcio es un estimulador de la esporulación, sin embargo, no se observó efecto en el crecimiento o síntesis de las proteínas cry (104). Por otro lado, altas concentraciones de calcio afectan negativamente los tres procesos antes mencionados (104), su presencia puede disminuir el rendimiento de proteínas Cry4Ba, cry11Aa (107). Las concentraciones de Mn pueden ser tóxicas y afectar los procesos de crecimiento, esporulación y síntesis del cristal (107). En cambio, con la ausencia de Zn del medio de cultivo se produjo un ligero incremento en la síntesis del

crystal (104). Ben Khedher *et al*, 2013 demostraron que las sales $MnSO_4$ y $FeSO_4$ no ejercieron un efecto positivo en la producción de endotoxinas (108). La adición en conjunto de estos micronutrientes a los diferentes medios de cultivos es una práctica empleada por numerosos investigadores con la finalidad de obtener mayores rendimientos de delta-endotoxinas (109-111).

La producción de bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* es un proceso que requiere de medios de fermentación o de cultivos elaborados con materias primas de bajo costo. Estas pueden constituir desechos industriales. En la composición de estos medios complejos se utilizan con éxito diferentes fuentes de carbono (almidones, melazas) y de nitrógeno (harinas de: maíz, trigo, pescado, soya, extracto de levadura, residuos de levadura) (105, 108, 112).

Mourin *et al* emplearon un medio con agua de mar como fuente de minerales complementarios, con el propósito de generar un medio de cultivo más económico. El agua de mar suplió los minerales necesarios para la producción de delta endotoxina (113). De igual forma, Ben Khedhe *et al* demostraron que la adaptación de las células de *B. thuringiensis* al NaCl que se adiciona a medios de producción complejos y baratos fue beneficiosa para la obtención de elevados rendimientos de delta-endotoxinas (108).

El efecto conocido como represión catabólica es otro factor importante a considerar en la selección de un medio de cultivo para el crecimiento de *B. thuringiensis* y la producción de delta-endotoxinas (112). Esto se refiere a la inactivación de ciertos operones que metabolizan los azúcares (como el operon lac), en favor de la utilización de glucosa cuando esta es la principal fuente de carbono. El exceso de carbono en el medio de cultivo no solo ocasiona una represión catabólica sino que también reprime la producción de esporas y delta-endotoxinas (112).

II.4.12 Empleo de *B. thuringiensis* (Bactivec®) en Cuba para el control de *Ae. aegypti*

A finales de los 80 del siglo pasado se introduce en Cuba, provenientes de la extinta Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, la cepa *B. thuringiensis* var. *israelensis* SH-14 266/2 9-VII-98, para su evaluación y posterior desarrollo de biolarvicidas (21).

Actualmente, se produce y se comercializa, por Labiofam, el biolarvicida Bactivec® (*B. thuringiensis* var. *israelensis* SH14), para el control de *Ae. aegypti*. Diversos estudios demuestran la factibilidad de su uso para el control larval (19, 22, 23, 94). Estudios de laboratorio evidenciaron que con la aplicación del Bactivec® en recipientes que pueden funcionar como criaderos de *Ae. aegypti* se favorece la conducta de oviposición de las hembras de esta especie (22). Por tanto, en el terreno los criaderos tratados con productos a base de *B. thuringiensis* podrían funcionar como ovitrampas líticas. Por otro lado, estudios realizados con el propósito de evaluar la susceptibilidad o resistencia a *B. thuringiensis* en poblaciones de terreno de *Ae. aegypti* (19, 23) evidencian la susceptibilidad de este vector. De esto se deriva la factibilidad del empleo de productos a base de *B. thuringiensis* para el control larval de *Ae. aegypti* en nuestro país. Recientemente, González *et al* en 2019 demostraron baja residualidad del Bactivec® en condiciones de laboratorio (26). Estudios futuros deben estar encaminados a evaluar la residualidad de Bactivec® en condiciones de terreno con el propósito de reajustar los ciclos de aplicación del producto considerando las condiciones ambientales de Cuba.

Materiales y métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo y experimental en el período de tiempo comprendido entre 2007-2018, en los Laboratorios de Control Biológico de vectores del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK). El flujograma de trabajo del estudio se muestra en el anexo II.

III.2 Cepas de referencia

III.2.1 Cepas bacterianas

Cepa *B. thuringiensis* var. *israelensis* 1884, IPS-82 (estándar Internacional, Instituto Pasteur, Paris, Francia, *B. thuringiensis* serotipo H-14)

Cepa *B. thuringiensis* var. *israelensis* 266/2 9-VII-98 (biolarvicida comercial Bactivec, LABIOFAM, registrado en Cuba).

Cepa *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, (serotipos 3a y 3b) (no productora de beta exotoxina), designada como estándar de referencia para formulaciones de *B. thuringiensis* (114, 115) y suministrada por el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal INISAV, La Habana, Cuba.

Cepa *B. thuringiensis* NRD-12 (115) (productora de betaexotoxina) suministrada por el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal INISAV, La Habana, Cuba.

Las cepas se conservaron en agua destilada estéril en viales a 4°C (116).

III.2.2 Cepas de *Ae. aegypti*

Cepa Rockefeller, cepa de laboratorio susceptible a insecticidas, de origen caribeño, suministrada por el laboratorio del CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, del inglés, Center for Disease Control and Prevention) de San Juan, Puerto Rico.

Las larvas utilizadas en los ensayos se obtuvieron de la cría mantenida en las instalaciones del insectario del Departamento de Control de Vectores del IPK, siguiendo las normas establecida para el manejo de animales de experimentación (117). La temperatura durante el periodo de estudio se mantuvo a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ y una humedad relativa de $75\% \pm 2$.

Las tiras que contenían huevos de la cepa Rockefeller de *Ae. aegypti* se colocaron en cubetas plásticas y se sumergieron en un volumen de 2,5 L de agua a 37°C para inducir la eclosión de los huevos. Las larvas fueron mantenidas en el mismo volumen de agua con 0,7 g de harina de pescado (117) (producida en el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio, Mayabeque (CENPALAB, Cuba)), como alimento.

III.3 Animales de experimentación

Se emplearon ratones BALB/c adultos machos de 10 semanas de edad y peso entre 20 y 24g y *Rattus norvegicus*, cepa Wistar adultos machos de 7 semanas de edad, con peso promedio de 300 g, suministrados por el CENPALAB, con calidad higiénico sanitaria. Los animales se mantuvieron en condiciones sanitarias convencionales bajo un régimen de 12 h de luz- 12 h de oscuridad. La alimentación consistió en pienso concentrado para roedores suministrado por el CENPALAB. Tanto la cantidad de alimento como de agua se suministraron a ser consumidos libremente. Los animales se alojaron en cajas de macrolón, utilizando como cama el bagazo de caña desmeollado.

III.4 Colecta de muestras de suelo

El muestreo de suelos del archipiélago cubanos se realizó en el periodo comprendido entre 2007-2010. Abarcó tanto habitas naturales (zonas boscosas, pantanosas y costeras), como

en áreas cultivables y zonas urbanizadas. Las muestras (aproximadamente 3 g) fueron tomadas, en suelos secos, a 5 cm por debajo de la superficie (118) para evitar la inactivación bacteriana por la radiación UV. Los puntos de colecta se marcaron mediante un navegador de sistema de posicionamiento global (GPS, por sus siglas en inglés) (Garmin eTrex Summit, EEUU).

Las muestras se colocaron en tubos de vidrio estériles con auxilio de una espátula de madera y se identificaron con la letra y el número correspondiente, de acuerdo al orden de colecta en las diferentes regiones (oriente, occidente y centro), se clasificaron de la A a Z por región muestreada. A cada letra se le asignó un número (del uno al nueve) que se correspondía con las muestras colectadas en un mismo sitio. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Control Biológico, perteneciente al Departamento de Control de Vectores del IPK, Cuba y se almacenaron a temperatura ambiente (25°C) entre 1-6 meses a partir del momento de la colecta.

III.4.1 Procesamiento de las muestras

Se inoculó 0,5 g de muestra en tubos de cristal que contenían 5 mL de Caldo Nutriente (BioCen, Mayabeque, Cuba) (119) y se incubaron a 28°C por 24 h con agitación orbital a 300 rpm. Transcurrido el tiempo, se tomó una asada del cultivo y se estrió por agotamiento en placa Petri conteniendo 15 mL de Agar Nutriente (BioCen). Seguidamente, la placa se incubó a 28°C por 24 h. Este procedimiento se repitió para cada una de las muestras colectadas.

III.4.2 Identificación bacteriana

Las colonias se observaron bajo microscopio estereoscópico (Leyca, Suiza) y se aislaron según los criterios de morfología, textura, color y consistencia, sugestivas de género *Bacillus* (69). Las colonias que presentaron la morfología característica de *Bacillus* diámetro entre 1-1,5 mm de color blanco grisáceo, opacas, planas de consistencia ligeramente costrosa, y que presentaron indistintamente bordes de tipo irregular, lobulado o ramificado (69) se seleccionaron al azar (10 colonias por muestra, numeradas del 1 al 10) y

se sembraron en placas con medio sólido de Agar Nutriente (BioCen, Cuba) para su individualización.

Cada colonia seleccionada (cultivo puro) de cada cultivo se sembró en placas Petri con 15 mL de Agar Nutriente (BioCen, Cuba) y se incubó 24 h a 28°C. Se realizó la tinción de Gram (Anexo III) y se observó al microscopio óptico para la diferenciación en Gram positivos o Gram variables y Gram negativos. Adicionalmente, se buscó la presencia de esporas y cristales paraesporales.

A los bacilos Gram positivos y Gram variables, esporulados se les realizó la prueba de catalasa, seguidamente se realizó la prueba de detección de lecitinasa en aquellos en los cuales se observaron esporas elipsoidales (Anexo III) y se agruparon según el esquema de identificación primario (Anexo IV) (67, 69). La diferenciación de los bacilos pertenecientes al grupo *B. cereus* se complementó por medio de observación de la morfología de las colonias cultivadas en agar sangre y detección de la actividad hemolítica (Anexo V, Anexo VI) (67, 69). Se utilizaron las pruebas bioquímicas del sistema API, galería 50 CHB (BioMérieux, Francia) para la identificación de especies de Bacilos Gram positivos esporulados propuestas en el manual de Bergey's (67) (galería cuidadosamente estandarizada por el Subcomité de Taxonomía del Género *Bacillus* del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática) (67). La lectura de las pruebas de la galería 50 CHB se realizó a las 24 y 48 h, y se establecieron como positivos aquellos sustratos que cambiaron de color rojo a amarillo en cualquiera de las dos observaciones. Los perfiles bioquímicos fueron analizados mediante el sistema informático, ApiwebTM (BioMérieux, Francia) para la identificación de especies microbianas. Por razones de seguridad biológica, los aislamientos identificados como *B. anthracis* no hemolíticos en agar sangre fueron inactivados por esterilización en autoclave a 121°C durante una hora y eliminados por incineración.

En el caso particular de *B. thuringiensis* la confirmación de la especie se realizó por la observación de cuerpos paraesporales (67, 69) mediante tinción con violeta cristal (observación al microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania), con objetivo 100x, ocular 10x).

Los bacilos Gram negativos fueron identificados mediante el sistema automatizado VITEK 2 versión 0,3.0, 1 (BioMérieux, Francia).

III.5 Preparación del pre-inóculo

Se tomó una asada del cultivo puro (microorganismos identificados como *B. thuringiensis*) (acápite III.4.2), se sembró en placas Petri con 15 mL de Agar Nutriente (BioCen, Cuba) y se incubó por 24 h a 28°C. Una colonia de ese cultivo se transfirió a 5 mL de Caldo Nutriente (BioCen, Cuba) y se incubó en agitación a 150 rpm, por 18 h a 28°C. La turbidez de la suspensión bacteriana se ajustó al tubo 0,5 de la escala de Mac Farland (aproximadamente 10⁶ células/mL por conteo en cámara de Neubauer).

III.6 Bioensayos para la determinación de la actividad biolarvicida

Se tomó un mililitro de pre-inóculo (acápite III.5) se inoculó en 5 mL de Caldo Nutriente (BioCen, Cuba) suplementado con sales inorgánicas (12,5 mM MgSO₄; 0,05 mM MnSO₄; 1,2 mM FeSO₄; 1,2 mM ZnSO₄; 25 mM CaCl₂) (55, 67). Se incubó a 28°C durante 72 h, con agitación orbital a 300 rpm. Transcurrido este tiempo, se realizó la tinción con violeta cristal y la observación al microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) (1000x) en búsqueda de abundantes esporas y más de 80% de cuerpos paraesporales liberados (lisis celular).

III.6.1 Bioensayo de selección preliminar

La actividad larvicida preliminar de los aislamientos se determinó según la metodología descrita por Chaves *et al* en 2008 (120). Los bioensayos se realizaron a 25°C, en vasos plásticos se colocaron 25 larvas de tercer estadio tardío o cuarto temprano en 100 mL de agua declorinada sin alimento para larvas. En cada ensayo se añadieron 500 µL (30 mg/L) de cada aislamiento. Se utilizaron las cepas IPS-82 y 266/2 9-VII-98 como controles positivos y como negativo, medio de cultivo estéril. Cada experimento se repitió cuatro en semanas diferentes. Se realizó el conteo de larvas vivas a las 24 h después de aplicado cada aislamiento, para el cálculo de la mortalidad.

$$\text{mortalidad} = \text{total de larvas} - \text{larvas vivas}$$

Los resultados fueron expresados como porcentaje de mortalidad (mortalidad por 100) \pm la desviación estándar (DE).

III.6.2 Bioensayos para el cálculo de las concentraciones letales

Con los aislamientos que se obtuvo 100% de mortalidad se realizaron bioensayos cuantitativos para el cálculo de las concentraciones letales.

Los aislamientos seleccionados fueron sometidos a nuevos bioensayos a 25°C, y posteriormente se procedió a la determinación de la concentración letal necesaria para eliminar a 10, 50 y 90% de la población (CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀, respectivamente) evaluada. Un mililitro de pre-inóculo (acápite III.5) se adicionó a 500 mL de un medio de cultivo constituido por sacarosa (2 g/L), peptona bacteriológica (2 g/L), extracto de levadura (1 g/L), suplementado con sales inorgánicas (12,5 mM MgSO₄; 0,05 mM MnSO₄; 1,2 mM FeSO₄; 1,2 mM ZnSO₄; 25 mM CaCl₂) (55, 67, 109). Se incubó a 28°C con agitación orbital de 300 rpm durante 72 h.

Se pesó en una balanza analítica (Sartorius, Suiza) un mililitro de la suspensión bacteriana obtenida de cada aislamiento y de las cepas IPS-82 y 266/2 9-VII-98 antes y después del secado en la estufa (Memmert, Alemania) a 80°C por 24 h (peso seco). El experimento se realizó tres veces y se determinó la media aritmética por muestra. Se calculó la diferencia de las medias aritméticas del peso antes y después del secado. La concentración se expresó en mg/L.

Se prepararon suspensiones de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ de cada cultivo bacteriano (acápite III.5) en agua destilada estéril, y de cada dilución se aplicó 100, 300 y 800 μ L a los recipientes que contenían 25 larvas en 100 mL de agua de clorinada.

Después de 24 h a 25°C, se determinó la mortalidad (III.6.1) y los resultados fueron analizados en SPSS Statistics versión 17.0 mediante el análisis Probit. Las dosis que produjeron aproximadamente 50% de mortalidad de las larvas, para cada aislamiento, fueron utilizadas para el cálculo de las dosis finales. Tomando como referencia la dosis

determinada para cada aislamiento y multiplicando y dividiendo por 0,7 (7) cada resultado, se calcularon cuatro dosis por encima y cuatro por debajo, respectivamente. Con las nueve dosis determinadas para cada aislamiento y las cepas de referencia se realizaron los bioensayos cuantitativos definitivos, siguiendo la metodología de la OMS (95).

La corrección de la mortalidad se realizó según la fórmula de Abbot. Cuando la mortalidad en los controles se comportó entre 5 y 10%.

$$\% \text{ de mortalidad corregida} = \frac{x-y}{x} 100$$

Donde: X= % de larvas vivas en el grupo control, Y= % de larvas vivas en el grupo tratado.

Las concentraciones de suspensión bacteriana que produjeron entre 10 y 90% de mortalidad larvaria fueron consideradas útiles y sus resultados introducidos en el paquete estadístico SPSS Statistics versión 17.0. Se realizó análisis Probit (121) con aproximación logarítmica de la dosis, que permitió calcular las CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀ de cada aislamiento y de las cepas controles (95), así como los respectivos límites superiores e inferiores. Cada experimento se repitió cuatro veces en semanas diferentes.

Se compararon los valores de mortalidad larvaria mediante ANOVA de una vía, cuando se presentaron diferencias significativas se aplicó análisis *post hoc* de Tukey en SPSS Statistics versión 17.0 considerando una $P < 0,05$.

III.7 Determinación de proteínas, genes y plásmidos responsables de la actividad larvicida

III.7.1 Identificación de las proteínas Cry y Cyt en aislamientos de *B. thuringiensis*

Los aislamientos bacterianos con 100% actividad larvicida contra *Ae. aegypti* identificados como *B. thuringiensis* y las cepas IPS-82 y 266/2 9-VII-98 se cultivaron en placas Petri conteniendo 15 mL de Agar Nutriente, incubándolas a 28°C durante 24 h. El cultivo puro se utilizó para la preparación del pre-inóculo (acápite III.5). Un mL del pre-inóculo se transfirió a tubos que contenían 5 mL de caldo nutriente más (12,5 mM MgSO₄, 0,05 mM MnSO₄, 1,2 mM FeSO₄, 1,2 mM ZnSO₄, 25 mM CaCl₂) (67). Se incubó a 28°C en agitación

orbital a 300 rpm por 72 h. Transcurrido este tiempo, se realizó la tinción con violeta cristal y la observación al microscopio óptico 1000x (119) (Carl Zeiss, Alemania) en búsqueda de abundantes esporas y más de 80% de cuerpos paraesporales liberados (lisis celular).

Se centrifugó 1,5 mL del cultivo a 5 600 x g durante 5 min en centrífuga Eppendorf (Alemania). El sedimento fue lavado dos veces con 1 mL de 1 M NaCl, y tres veces con 1 mL de agua destilada estéril. Finalmente, el sedimento fue resuspendido en 100 µL de agua destilada estéril. La concentración de proteínas se determinó mediante método del ácido bicinonínico (BCA, siglas en inglés) (122). Se ajustó la concentración a 1 mg/mL y posteriormente, se añadió a 100 µL de la mezcla de proteínas igual volumen de tampón lisis 2x (1,5 mL tris 1 M; 1,25 mL beta mercaptoetanol, 5 mL 10% SDS; 2,5 mL glicerol; 0,01 g bromofenol azul; 10 mL agua destilada). La muestra se calentó durante 6 min a 100°C en baño de María (123).

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida – duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), con un gel concentrador a 5% y separador a 11% de acrilamida (Merck, Alemania) (124). Para ello, se aplicaron 10 µL de las muestras al sistema de geles y 5 µL del patrón, en un rango de peso molecular (PM) entre 15 y 225 kDa (Promega, EUA).

La corrida se efectuó bajo condiciones desnaturalizantes en mini-cámaras (Cleaver, Scientific Ltd, Inglaterra) a razón de 120 V por 60 min, con tampón Tris (0,5 mol/L), glicina (0,192 mol/L), SDS (0,1%), pH 8,3. Al finalizar la corrida electroforética, se realizó la tinción del gel separador con azul brillante de Comassie G-250 (Pharmacia LKB) y decolorado en solución de metanol a 30% (BDH, Inglaterra) y ácido acético a 10% (Merck, Alemania).

Los geles fueron visualizados en un trans-iluminador de luz blanca (Sigma, EUA) y seguidamente fotografiados. Las imágenes fueron procesadas y el PM de cada proteína se calculó mediante el programa informático GelQuant versión 2.7.0 (Bio-Imaging Systems, Israel).

Para la identificación de las proteínas Cry y Cyt en los aislamientos se tuvieron en cuenta los PM de las proteínas Cry (rango de 66-134 kDa) y de las Cyt (27-28 kDa) (125). Otras proteínas con menor actividad larvicida (28) fueron también identificadas.

III.7.2 Detección de genes *cry* y *cyt* en aislamientos de *B. thuringiensis*

La confirmación de la presencia de los principales factores de virulencia (*cry* y *cyt*) en los aislamientos nativos se realizó mediante la detección de los genes *cry* y *cyt* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés polymerase chain reaction).

Los aislamientos y las cepas IPS-82 y 266/2 9-VII-98 se cultivaron en placas Petri, simultáneamente, en idénticas condiciones, conteniendo 15 mL de Agar Nutriente (BioCen, Cuba), y se incubaron a 28°C durante 24 h.

Para la obtención del ADN de los aislamientos y de las cepas de referencia se transfirió una azada de células a 400 µL de tampón Tris-EDTA (TE) (1 M Tris; 0,5 M EDTA; pH 7,5) más 20 µL de lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) (150 mg/mL), se incubó a 37°C, 2 h. La extracción del ADN se realizó con el juego de reactivo Maxwell® 16 Tissue DNA Purification (Promega, EUA). El sobrenadante obtenido se transfirió a un vial eppendorf estéril y 2 µL de ADN fueron utilizados como molde en la mezcla de la PCR.

La calidad del proceso de extracción del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa a 0,8% en tampón tris borato EDTA (TBE 1X) (0,009 M tris-borato; 0,0002 M EDTA pH 8,3) conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/mL). La corrida se efectuó en la cámara de electroforesis (Electrofor, Italia) a un voltaje constante de 100 V suministrada por una fuente (Consort, Bélgica), durante 2 h y se visualizó en transiluminador (Macrovue 2011, Pharmacia LKB, Reino Unido) mediante UV.

En la identificación de los genes *cry* y *cyt* por la PCR se utilizaron los cebadores (Eurofins/Genomics, Alemania) descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados en la detección de genes *cry* y *cyt* en aislamientos de *B. thuringiensis*

Cebador (Cb)	Secuencia	T(°C)	Genes	Talla (pb)	Ref.
Cb-1	CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT (d)	52	<i>cyt1Aa</i>	477	(28)
	TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT(r)		<i>cyt1Ab</i> <i>cyt1Ba</i>	480 477	
Cb-2	ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC (d)	50	<i>cyt2Aa</i>	356	(28)
	TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC(r)		<i>cyt2Ba</i> <i>cyt2Bb</i> <i>cyt2Ca</i>	355 355 355	
Cb-3	GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT (d)	50	<i>cry2Aa</i>	526	(28)
	GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG (r)		<i>cry2Ab</i> <i>cry2Ac</i> <i>cry2Ad</i>	526 520 500	
Cb-4	TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG (d)	54	<i>cry4Aa</i>	459	(28)
	CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)				
Cb-5	CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC (d)	54	<i>cry4Bb</i>	321	(28)
	CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)				
Cb-6	CGCTTACAGGATGGATAGG (d)	50	<i>cry11Aa</i>	342	(28)
	GCTGAAACGGCACGAATATAATA (r)		<i>cry11Ba</i> <i>cry11Bb</i>	343 352	
Cb-7	TCAATGCTCCATCCAATG (d)	51	<i>cry10</i>	348	(28)
	CTTGTATAGGCCTTCCTCCG (r)				

d: directo; r: reverso; T(°C): temperatura óptima de hibridación, Ref: referencia.

Tabla 2. Cebadores utilizados en la detección de genes *cry* y *cyt* en aislamientos de *B. thuringiensis*. Continuación.

Cebador (Cb)	Secuencia	T(°C)	Genes	Talla (pb)	Ref.
Cb-9	ATATGAAATATTCAATGCTC(d)	46	<i>cry10Aa</i>	550	(83)
	ATAAATTCAAGTGCCAAGTA (r)				
Cb-11	TAGAAGATACGCCAGATCAAGC (d)	51	<i>cry11A</i> <i>cry11B</i>	305	(126)
	CATTTGTAAGTTGTAATCCC (r)			305	
Cb-12	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG (d)	51	<i>cyt1Aa</i> <i>cyt1Ab</i>	522	(126)
	GGTACACAATACATAACGCCACC (r)			525	
Cb-13	AACTCACACATCCTCCATCG (d)	50	<i>cry30</i>	265	(28)
	ATCGGAAGGCAATCATTCG (r)				

d: directo; r: reverso; T(°C): temperatura óptima de hibridación, Ref: referencia;

La mezcla de la PCR consistió en solución tampón verde 1X (Promega, EUA), 2 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,5 μM cada cebador (directo y reverso); 2,5 U Go taq Flexi DNA polimerasa (Promega, EUA); y 2 μL de ADN molde para un volumen final de 50 μL. Se incluyó un control negativo con todos los componentes de la PCR excepto el ADN que fue sustituido por agua.

La amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos: desnaturalización a 95°C por 1 min, temperatura de hibridación (según la temperatura específica de unión para cada cebador) (Tabla 2) por 1 min y extensión 72°C por 1 min. Finalmente, una extensión a 72°C por 5 min (termociclador (Mastercycler personal Eppendorf AG, Alemania)).

El producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa a 2% en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE 0,5X) (Tris-Borato 0,0045 M y EDTA 0,0001 M; pH 8,3)

conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/mL). La corrida se efectuó en la cámara de electroforesis (Electrofor, Rovigo, Italia-EUA)) a un voltaje constante de 250 V suministrado por una fuente (Consort, Bélgica), durante 45 min. El peso molecular del producto obtenido fue estimado utilizando el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder 100-1500 pb (Promega, EUA). La visualización se realizó en un transiluminador (Macrovue 2011, Pharmacia LKB, Reino Unido) mediante UV.

III.7.3 Determinación del patrón de ADN plasmídico de los aislamientos de *B. thuringiensis*

El ADN plasmídico de los aislamientos nativos y de las cepas IPS-82 y 266/2 9-VII-98 se obtuvo mediante el procedimiento descrito por Reyes-Ramírez e Ibarra, 2008 (127).

Con este propósito, un pre-inóculo de 5 mL (acápite III.5) con una densidad óptica en un rango entre 0,9 a 1,1 a una longitud de onda de 600 nm se adicionó en un erlenmeyer, conteniendo 50 mL de caldo LB (BioCen, Cuba). Se incubó a 30°C a 250 rpm 24 h, en zaranda. Posteriormente, las células vegetativas se centrifugaron a 20 200 x g por 15 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 20 mL de tampón TES (Tris-EDTA-Sacarosa); 30 mM Tris; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl; pH 8,0 más sacarosa a 20%, frío y se centrifugó a las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 2 mL de tampón de lisis (Tampón TES más 2 mg/mL de lisozima (Promega, EUA), y 1 µL/mL de RNasa (Promega, EUA) de una solución a 10 mg/mL) y se incubaron a 37°C durante 3h. La suspensión de esferoplastos obtenida fue suplementada con 3 mL de SDS a 8% en tampón TES e incubada a 68°C durante 10 min. Luego se agregó 1,5 mL de acetato de sodio 3 M (pH 4,8) y se incubó a -20°C durante 30 min. La suspensión se centrifugó a 20 200 x g a 4°C durante 20 min. Se realizaron las centrifugaciones necesarias para alcanzar una apariencia translúcida. El sobrenadante se filtró, se añadió dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C durante toda la noche. El ADN plasmídico enriquecido se centrifugó a 20 200 x g por 20 min a 4°C. El sedimento se disolvió en 100 µL Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) y se almacenó a -20°C (127).

El patrón plasmídico se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa a 0,5% en tampón tris borato EDTA (TBE 1X) (0,009 M tris-borato; 0,0002 M EDTA; pH 8,3) conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/mL). Se aplicaron 10 μ L de cada solución de ADN plasmídico más 2 μ L de tampón de carga (Promega, EUA) y 5 μ L de marcador de peso molecular DNA Wide Range (525-29950 pb) (Promega, EUA). La corrida se efectuó en la cámara de electroforesis (Electrofor, Italia (EUA)) a un voltaje constante de 2 V/cm durante 20 h con una fuente (Consort, Bélgica). La visualización se realizó mediante exposición del gel a luz UV en un transiluminador en busca de las semejanzas y diferencias de los patrones plasmídicos de los aislamientos nativos en comparación con las cepas de referencia IPS-82 y 266/2 9-VII-98. Adicionalmente, se identificaron los aislamientos con presencia de plásmidos por encima del ADN cromosomal (78, 125).

III.8 Determinación de la citotoxicidad de los aislamientos seleccionados sobre macrófagos peritoneales

El experimento de citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales se realizó con los aislamientos que presentaron CL₉₀ menores que las cepa 266/2 9-VII-98, mayor diversidad de proteínas activas, de genes contra dípteros y presencia de plásmidos por encima del ADN cromosomal.

A 100 mL de las suspensiones bacterianas (III.6) de los aislamientos nativos seleccionados y del cultivo de las cepas IPS-82 y 266/2 9-VII-98 se añadieron 0,53 g de Na₂CO₃ y se incubaron 1 h a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron cinco mililitros a 13 000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,45 μ m, el pH de la solución obtenida fue ajustado a 8,0 y se utilizó de forma directa (extracto acuoso) o diluida en alcohol a 80% (extracto hidroalcohólico). Ambas soluciones se mantuvieron en reposo durante 7 días a 4°C con agitación manual ocasional (3 veces al día por 1 minuto). Posteriormente, el solvente de las muestras fue evaporado en un Concentrator Plus (Eppendorf, Alemania) durante 4 h. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue re-suspendido en dimetilsulfóxido (DMSO; BDH, Poole, Inglaterra), hasta obtener una

concentración final de 20 mg/mL. En paralelo se incluyó, en ambas soluciones, un control solo con medio de cultivo.

Los ratones BALB/c (acápite III.2) fueron eutanizados por dislocación cervical y los macrófagos fueron extraídos del peritoneo del ratón mediante lavados con RPMI (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomicina 200 µg/mL; SIGMA, St. Louis, MO, EUA). La suspensión celular ($1-3 \times 10^6$ células/mL) se distribuyó en placas de 96 pozos (Greiner bio-one, Alemania) y se incubó 2h a 37°C en una atmósfera de CO₂ a 5% en CO₂CELL 50 -MMM Medcenter Einrichtungen (GmbH, Alemania). A las 2 h de incubación se eliminaron las células libres mediante tres lavados con solución salina fisiológica estéril (Quimefa, La Habana, Cuba).

A la monocapa de macrófagos peritoneales se les añadió 50 µL de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) a 10% y los antibióticos correspondientes como se mencionó anteriormente. En los pozos de las columnas dos y siete se adicionaron 48 µL de medio y 2 µL de los productos a evaluar. A partir de este se realizaron cinco diluciones seriadas 1:2 (tomando cada vez 50 µL), de manera que se evaluaron concentraciones desde 12,5 hasta 200 µg/mL. Posteriormente, a todos los pozos se les adicionó 50 µL de medio RPMI suplementado con suero y antibiótico. Se incluyeron controles de macrófagos con el vehículo (DMSO). Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ a 5%. A las 48 h se agregó a cada pozo 15 µL de una solución de 3-(4,5-timetildiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; SIGMA, St. Louis, MO, EUA) a 5 mg/mL, preparada en el momento de su uso, y se incubó la placa durante 4 h en las mismas condiciones. Finalmente, se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la sal de tetrazolio precipitada se disolvió en 100 µL de DMSO. La absorbancia (abs) se midió en un lector de microplacas de ELISA (MRX RevelationDy nex Technologies, Alemania) a 560 y a 630 nm como longitud de onda de referencia (128, 129). Se calcularon las absorbancias netas (lectura a 560 nm menos la lectura a 630 nm) y se graficaron las absorbancias resultantes contra las concentraciones evaluadas. Estas curvas dosis-respuestas se ajustaron mediante un modelo de regresión lineal y se determinó la

concentración citotóxica media (CC_{50}) a partir de la ecuación resultante de la recta. Se realizaron tres replicas para cada extracto y los resultados fueron expresados como el promedio de las CC_{50} obtenidas para cada experimento por separado con la DE.

Se consideraron aislamientos no citotóxicos aquellos con una CC_{50} mayor que la obtenida con los controles positivos utilizados.

III.9 Influencia de factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* sobre la actividad larvicida de los aislamientos

Con los aislamientos nativos considerados no citotóxicos y con las cepas IPS-82 y 266/2 9-VII-98 se realizaron otros bioensayos para determinar el efecto de diferentes factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* (temperatura, cloro, materia orgánica y sales) sobre la actividad larvicida. Para ello, 1 mL de pre-inóculo (acápite III.5) se adicionó a 500 mL de un medio de cultivo constituido por sacarosa (2 g/L), peptona bacteriológica (2 g/L), extracto de levadura (1 g/L), suplementado con sales inorgánicas (12,5 mM $MgSO_4$; 0,05 mM $MnSO_4$; 1,2 mM $FeSO_4$; 1,2 mM $ZnSO_4$; 25 mM $CaCl_2$) pH 7,0 (55, 67, 109). Se incubó a 28°C con agitación orbital de 300 rpm durante 72 h. Los bioensayos se llevaron a cabo según el procedimiento descrito en el acápite III.6.2. Para cada parámetro estudiado se utilizó como experimento control un bioensayo realizado a temperatura ambiente (25°C), en agua declorinada.

Temperatura: El efecto de la temperatura sobre la actividad larvicida fue determinado mediante bioensayos con agua declorinada expuestos a temperaturas de 30 y 35°C.

Cloro: Para determinar el efecto del cloro sobre la actividad larvicida de los aislamientos nativos se utilizó una concentración de cloro de 2,25 mg/L pH 6,8 (dosis recomendada por la OMS para el tratamiento de aguas de consumo humano) (41), utilizando como fuente de cloro dicloroisocianurato de sodio (NaDCC Hind Pharma, India).

Materia orgánica: Para determinar la influencia de la presencia de materia orgánica sobre la actividad larvica de las cepas nativas, los bioensayos se llevaron a cabo con 300 mg de hojarasca natural estéril en 100 mL de agua destilada.

Sal: El efecto del NaCl sobre la actividad larvica se determinó mediante bioensayos realizados en agua de cloro con una concentración de 5 g/L de NaCl.

Los bioensayos se repitieron 4 veces en semanas diferentes.

Se calcularon las CL_{50} , CL_{90} y CL_{95} de cada aislamiento y de las cepas de referencia bajo las diferentes condiciones ensayadas. Se calculó la relación CL_{95}/CL_{50} , usada como expresión de la eficiencia de la formulación contra una especie, que permite determinar el número de veces que es necesario aumentar CL_{50} para obtener la mortalidad de 95% de la población (101, 130). Fueron considerados como buenos valores de eficiencia ≤ 15 .

Se compararon las variables de temperatura mediante ANOVA de una vía, cuando se presentaron diferencias significativas se aplicó análisis post hoc de Tukey en SPSS Statistics versión 17.0 considerando una $P < 0,05$.

En el estudio de la influencia del cloro, la materia orgánica y las sales sobre la actividad larvica el análisis de las variables se realizó mediante la prueba t de Student en SPSS Statistics versión 17.0.

III.9.1 Efecto de los factores abióticos sobre las proteínas Cry y Cyt de *B. thuringiensis*

Se evaluó el efecto de los factores sobre la expresión de las proteínas Cry y Cyt en los aislamientos con los que se obtuvo un incremento significativo de la CL_{50} y CL_{90} o incremento de la relación CL_{95}/CL_{50} con respecto al control (25°C, agua de cloro). La influencia de materia orgánica sobre las proteínas Cry y Cyt no se evaluó por SDS-PAGE debido a que, según la literatura revisada (131), este factor no interfiere en la expresión proteica.

Los aislamientos nativos seleccionados se cultivaron en placas Petri conteniendo 15 mL de Agar Nutriente, incubándolas a 28°C durante 24 h según el procedimiento descrito en el acápite III.7.1.

Temperatura: Los cultivos esporulados y con presencia de cristales se incubaron a 25, 30, 35 y 40°C durante 72 h para determinar el efecto de la temperatura sobre las proteínas Cry y Cyt de *B. thuringiensis*.

Cloro: Para determinar el efecto del cloro sobre estas proteínas se utilizó NaDCC para una concentración final de cloro 2,25 mg/L en el cultivo y se incubó a temperatura ambiente por 24 h. En paralelo, se estableció un cultivo control sin cloro.

Seguidamente, se procedió a la extracción de proteínas de cada cultivo según se describe en el acápite III.7.1. Posteriormente, las mezclas proteicas fueron separadas por SDS-PAGE para determinar el efecto de la temperatura y el cloro sobre las proteínas Cry y Cyt (acápites III.7.1).

III.10 Selección de aislamientos libres de betaexotoxinas

.La determinación de la presencia/ausencia de betaexotoxinas se realizó en aislamientos nativos que presentaron CL₉₀ menor que la cepa 266/2 9-VII-98 y buena eficiencia (por debajo de 15) en presencia de los diferentes factores evaluados. Adicionalmente, se consideraron para la selección los aislamientos donde la temperatura y cloro ejercieron menos influencia sobre las proteínas Cry y Cyt.

Tanto las cepas controles (acápites III.2.1) como los aislamientos nativos seleccionados fueron reactivados en caldo nutriente pH 7,0 por 4 h a 37°C agitación orbital a 150 rpm. Se transfirió 2 mL del pre-inóculo (acápites III.5) a erlenmeyers con 200 mL de caldo nutriente suplementado con sales inorgánicas (12,5 mM MgSO₄; 0,05 mM MnSO₄; 1,2 mM FeSO₄; 1,2 mM ZnSO₄; 25 mM CaCl₂) (67) y se incubaron a 30°C por 72 h en agitación orbital a 150 rpm. Se centrifugó 25 mL de este cultivo a 13 000 x g 10 min a 4°C, tantas veces fue

necesario hasta lograr una completa clarificación. El sobrenadante se autoclaveó a 121°C por 20 min para inactivar las proteínas Cry y Cyt y se conservó a -20°C.

Se realizaron modificaciones al procedimiento descrito por Mac Innes y Bouwer (132) para la detección de betaexotoxinas en los aislamientos de *B. thuringiensis*. Brevemente, se colocaron 100 huevos de *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) por recipiente en 500 mL de agua a 37°C y se verificó la eclosión a las 4 h. A cada recipiente con larvas se añadió 66 mg de harina de pescado, como alimento, suspendidos en 10 mL de sobrenadante del cultivo de los aislamientos y cepas de referencia previamente autoclaveado. El proceso de alimentación se repitió durante 5 días consecutivos. Posteriormente, cada recipiente con las larvas en IV estadio se colocaron en jaulas independientes. Diariamente, se contaron los individuos vivos según el estadio de desarrollo, durante siete días. Los bioensayos se repitieron cuatro veces en semanas diferentes. Se calculó las medias de mortalidad y se compararon estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) (programa estadístico SPSS Statistics versión 17.0). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante la prueba de Tukey, considerando una $P < 0,05$.

A los aislamientos con los que se obtuvo mortalidad por encima de uno por ciento, mediante el bioensayo descrito con anterioridad, se les determinó la absorción (Eppendorf BioSpectrometer®plus, Alemania) de los cultivos clarificados y autoclaveados a 230, 260, 280 y 340 nm para corroborar la presencia betaexotoxinas (a 230 nm se detecta un mínimo de absorción y máximo 260 nm), siguiendo el procedimiento descrito por Galán en 1994 (133).

Se seleccionó el aislamiento con mayor actividad larvicida en presencia de factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* y ausencia de betaexotoxinas.

III.11 Selección del medio de cultivo que favorezca la expresión de los principales factores de virulencia y actividad larvica del aislamiento seleccionado

III.11.1 Evaluación de la influencia de las sales MgSO₄, FeSO₄ ZnSO₄ y NaCl sobre el crecimiento, esporulación y producción de delta-endotoxinas

Se procedió a la selección del medio de cultivo que favorece la presencia de los principales factores de virulencia y por tanto una mayor actividad larvica del aislamiento.

Se preparó el medio de cultivo (1 L) conformado por 1 g/L glucosa y 2 g/L extracto de levadura pH 7,0. El medio se envasó en erlenmeyers de 250 mL y se suplementó cada erlenmeyers con una de las siguientes sales: 12,5 mM MgSO₄; 1,2 mM FeSO₄; 1,2 mM ZnSO₄ y 25 mM NaCl (55, 67).

Un mililitro de pre-inóculo (acápite III.5) del aislamiento seleccionado (acápite III.10) se adicionó a cada medio y se incubaron a 28°C, en agitación orbital a 150 rpm, durante 72 h. Se tomaron muestras (1 mL) del cultivo a las 24, 48 y 72 h para realizar tinción de Gram (conteo de esporas, cuerpos paraesporales y determinación del porcentaje de estos) y preparación de suspensiones bacterianas para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Se prepararon 10 suspensiones decimales seriadas de cada cultivo desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰ y se adicionó 0,1 mL de cada suspensión en una placa Petri estéril. Posteriormente, se añadió 15 mL de Agar Nutriente a 60°C, se agitó en todas direcciones y se esperó hasta la completa solidificación del medio. Finalmente, las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 h y se realizó el conteo de UFC.

Se realizó transformación logarítmica en base 10 de los datos y se calculó la media y la DE. Se utilizó la herramienta “formato condicional” de Microsoft Excel 2010. Los resultados obtenidos se compararon mediante ANOVA de una vía. Cuando se presentaron diferencias significativas se aplicó análisis *post hoc* de Tukey en SPSS Statistics versión 17.0 considerando una $P < 0,05$.

Las sales con las que se obtuvo mayor crecimiento, esporulación y producción de cuerpos paraesporales se utilizaron en la conformación de los medios de cultivo (acápite III.11.2).

III.11.2 Evaluación de medios de cultivo con diferente composición

Se prepararon medios con diferente composición: medio 1: 2 g/L extracto de levadura y 1 g/L glucosa; pH 7,0 (55, 107, 109, 134), medio 2: 20 g/L levadura torula y 5 g/L almidón de maíz; pH 7,0 (21, 135, 136).

Ambos medios se suplementaron con las sales inorgánicas seleccionadas (acápite III.11.1) teniendo en cuenta que el uso simultáneo de estas ha sido notificado por otros autores (109-111). Un mililitro del pre-inóculo (acápite III.5) se adicionó a 250 mL de cada medio y se incubaron a 28°C.

Se colectaron muestras de los cultivos cada 6 h hasta las 72 h. A cada muestra se determinó pH y absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (Zuzi 421150, España). Además, se realizó tinción de Gram para la determinación de la pureza y conteo de esporas y cristales. Las muestras se inocularon en medio Agar Nutriente (BioCen, Cuba) y se realizó el conteo de UFC según el procedimiento descrito en el acápite III.11.1.

A las 72 h se determinó, además, el peso seco de los cultivos bacterianos obtenidos con cada medio según el acápite III.6. 2.

Al final del proceso de fermentación (72 h), de cada cultivo se tomó 1,5 mL y se procedió a la extracción y separación de proteínas, se siguieron los procedimientos descritos en el acápite III.7.1. Se compararon los patrones proteicos obtenidos con ambos medios.

III.11.3 Evaluación de la actividad larvicida del aislamiento cultivado en los diferentes medios.

Se llevaron a cabo los bioensayos según el procedimiento descrito con anterioridad (acápite III.6.2). Se calcularon las CL₁₀, CL₅₀, CL₉₀, CL₉₅ y CL₉₉ de cada formulación bacteriana (acápite III.6.2) en los diferentes medios.

Se seleccionó el medio con el que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento en el menor tiempo, elevado número de esporas y cuerpos paraesporales liberados, mayor número de UFC, mejor expresión de proteínas Cry y Cyt y menores CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅. En caso de no cumplirse todos los requisitos antes mencionados para un mismo medio, se seleccionó el medio con el que se reunieron los mejores resultados.

III.12 Evaluación de la toxicidad/patogenicidad aguda oral del aislamiento cultivado en el medio seleccionado utilizando como modelo biológico *Rattus norvegicus*, cepa Wistar

Los animales (acápite III.3) se distribuyeron en 2 grupos (tres animales por grupo), a uno (control) se le administró medio de cultivo estéril, y al grupo tratado (aislamiento cultivado en el medio seleccionado, acápite III.11). Se utilizó una dosis de 5×10^8 UFC del producto por animal tratado, en dosis única por vía oral mediante una cánula curva metálica, en un volumen constante de 2 mL por animal. Al grupo control solo se le administró 2 mL de medio de cultivo estéril. El estudio se prolongó durante 21 días tras la administración tanto en el grupo tratado como en el control (137).

Los animales fueron observados diariamente. Las observaciones incluyeron, entre otras, cambios en piel y pelaje, membranas mucosas y ojos, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora, y patrón de comportamiento. Se prestó atención a la posible ocurrencia de algunos signos como temblores, convulsiones, diarrea, letargo, salivación, sueño y coma.

Los pesos individuales fueron determinados el día anterior a la administración del aislamiento cultivado en el medio seleccionado y medio de cultivo estéril a las 3 h post-tratamiento, tres días, semanalmente, y a los 21 días antes de ser eutanizados. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS Statistics versión 17.0. Se realizaron pruebas de distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk, para una $P > 0,05$ se aplicó la correlación de Pearson.

Para estimar la eliminación de *B. thuringiensis* del cuerpo de las ratas, las heces de los animales del grupo tratado fueron recolectadas a las tres horas de administrados los aislamientos cultivados en el medio seleccionado y medio de cultivo estéril, y a los días 3, 7, 14, y 21 del ensayo (137) y cultivadas en Agar Nutriente (BioCen, Cuba), 28°C por 24 h. Se realizó la lectura, contando las colonias típicas de *Bacillus* crecidas en el medio de cultivo (de color blanco grisáceo, opacas, planas de consistencia ligeramente costrosa, y que presentaron indistintamente bordes de tipo irregular). Se seleccionaron y aislaron en placas que contenían Agar Nutriente 28°C por 24 h y, en paralelo bajo las mismas condiciones, se incluyó como control positivo un cultivo puro del aislamiento utilizado. Posteriormente, se analizó el perfil bioquímico obtenido a partir de las colonias mediante el sistema Api galería 50 CHB (acápite III.4.2). Para la confirmación de la especie de *B. thuringiensis* se realizó la tinción con violeta cristal (acápite III.4.2) en búsqueda de cristales paraesporales. Finalmente, se informaron como positivas aquellas colonias cuyas características morfológicas y bioquímicas coincidieron con las del aislamiento nativo utilizado.

A los 21 días del ensayo se eutanizaron los animales del grupo tratado y los controles, y se les realizó necropsias completas. La eutanasia se efectuó mediante una sobredosis (tres veces la dosis anestésica: 30 mg/kg) del anestésico tiopental sódico (barbitúrico) por vía intraperitoneal (138). Antes de realizar la necropsia se confirmó la muerte del animal mediante el cese de la respiración y del latido cardiaco, así como la ausencia de reflejos.

Se realizó un análisis visual para la búsqueda de cambios macroscópicos en los órganos. Se tomaron muestras de órganos (riñones, hígado, bazo, pulmones, sangre y nódulos linfáticos) (137). Una porción (0,5 g) de cada muestra se homogenizó en 1 mL de solución salina tamponada (compuesta por compuesto por 136 mmol/L NaCl; 8,1 mmol/L Na₂PO₄; 1,46 mmol/L K₂PO₄ y 3,48 mmol/L KCl; pH 7,2) mediante agitación (vortex) por 20 s. Cien microlitros de cada producto se diluyó y se extendió en placa Petri con Agar Nutriente y se incubó 18 h a 30°C para el posterior conteo (139) e identificación de colonias.

III.13 Determinación de la actividad larvicida residual del aislamiento cultivado en el medio seleccionado

Se determinó la actividad larvicida del aislamiento cultivado en el medio seleccionado y de la cepa 266/2 9-VII-98 (cultivada bajo las mismas condiciones) (acápite III.11.2) en un periodo de tiempo (efecto residual).

Los bioensayos de laboratorio se realizaron siguiendo la metodología de la OMS (95), simulando condiciones del terreno en cuanto al tipo de recipiente (plástico) y recambios de agua.

Se conformaron tres grupos (con y sin recambio de agua) constituidos cada uno por dos recipientes plásticos con 8 L de agua declorinada y 50 larvas (III-IV estadio).

A cada recipiente se aplicó como dosis (aislamiento cultivado en el medio seleccionado y cepa 266/2 9-VII-98) el resultado del múltiplo 9 por el valor de la CL_{90} obtenida en los bioensayos cuantitativos (acápite III.11.3) (95, 140).

La dosis se aplicó solo una vez al inicio del bioensayo. Se utilizaron recipientes controles (sin biolarvicida, solo medio de cultivo estéril). Los bioensayos se efectuaron a 26°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) de temperatura y 55% de humedad relativa. Se contaron las larvas sobrevivientes cada 2 h hasta 72 h. Los individuos vivos a las 72 h se extrajeron de los recipientes y se eliminaron. Semanalmente, se efectuó el recambio de agua en los recipientes que así lo requerían según se describe a continuación:

Recambio total: se eliminó toda el agua y se restituyó por 8 L de agua declorinada.

Recambio medio: se eliminaron 4 L y se restituyeron por 4 L de agua declorinada.

No recambio: no se eliminó el agua, solo se restituyó la que disminuyó como resultado del proceso de evaporación.

Las larvas se adicionaron, nuevamente, 24 h después de cada recambio de agua (95). Para obtener el valor de mortalidad larval, al total de larvas adicionadas en cada recipiente se le restó el número de larvas sobrevivientes y se expresó en porciento. El porcentaje de mortalidad larvaria fue corregido mediante la fórmula de Abbott cuando se observó mortalidad en los controles entre 5 y 10%.

Se realizaron cuatro réplicas de los bioensayos de laboratorio.

El experimento se detuvo cuando la mortalidad alcanzó valores $\leq 50\%$ durante dos semanas consecutivas (141).

Los datos de mortalidad larvaria fueron recogidos y sus resultados introducidos en el paquete estadístico SPSS Statistics versión 17.0. Los tiempos letales (TL) 50, 90 y 95 se determinaron mediante Probit (121) utilizando el programa estadístico SPSS Statistics versión 17.0 y los resultados se expresaron en horas, La mortalidad obtenida se analizó estadísticamente mediante un ANOVA de una vía y, cuando se presentaron diferencias significativas se aplicó análisis *post-hoc* mediante la prueba de Tukey. Se calculó el porciento de mortalidad larvaria, la media y su DE.

III.14 Consideraciones éticas

Con el muestreo de los suelos no se afectó la flora y fauna circundante. Los ensayos y procedimientos se realizaron tomando en consideración las Normas éticas y científicas para estudios biomédicos a partir de la Declaración de Helsinki (142). El protocolo de investigación se aprobó por el Comité de Ética Institucional del IPK con el número 21-16 (Anexo VII). Así mismo, se aseguró la confidencialidad y seguridad de los resultados. Solo tuvo acceso a los datos de investigación el personal previamente autorizado. Los sistemas de información tienen implantadas las medidas de seguridad necesarias para evitar la pérdida de los datos, la alteración de los mismos o que otras personas, no autorizadas, accedan a los mismos. Los resultados de la investigación se expusieron en eventos científicos y se publicaron en revistas nacionales e internacionales.

El trabajo con los animales de laboratorio se llevó a cabo en el área de riesgo biológico II del Bioterio, IPK. Se tomaron todas las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo con animales de laboratorios. El diseño utilizado redujo al mínimo el número de animales a emplear en este tipo de investigación. Este estudio se realizó en condiciones que garantizaron la observación del comportamiento de los animales, controlando al máximo los factores que pudieran afectarlos. Se siguieron las normas éticas para el trabajo con animales descritas en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo (Relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, 22 de septiembre de 2010) con el objetivo de provocar el menor sufrimiento (143). Las condiciones ambientales fueron estables y adecuadas en relación a temperatura y humedad, renovación de aire y fotoperiodo. Los animales se mantuvieron con una dieta certificada por el CENPALAB y se conservó la calidad y limpieza de los lechos.

Resultados

IV. RESULTADOS

IV.1 Aislamientos bacterianos provenientes de suelos del archipiélago cubano

Se colectaron 254 muestras de suelo del archipiélago cubano (Anexo VIII) y se obtuvieron 1322 aislamientos bacterianos. De estos, 1116 fueron bacilos Gram positivos esporulados (84,42%): 52,30% identificados como *B. cereus*, 28,70% como *B. thuringiensis* y las especies: *B. coagulans*, *B. sthearothermophilus*, *B. mycoides*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *Brevibacillus laterosporus*, *B. megaterium*; estuvieron incluidas en 19% restante. Además, se aislaron 116 bacilos Gram positivos no esporulados (12,50%) y 40 (3,02%) bacilos Gram negativos (*Pseudomonas aeruginosa* 2,72% y *Pseudomonas putida* 0,30%) (Fig. 5).

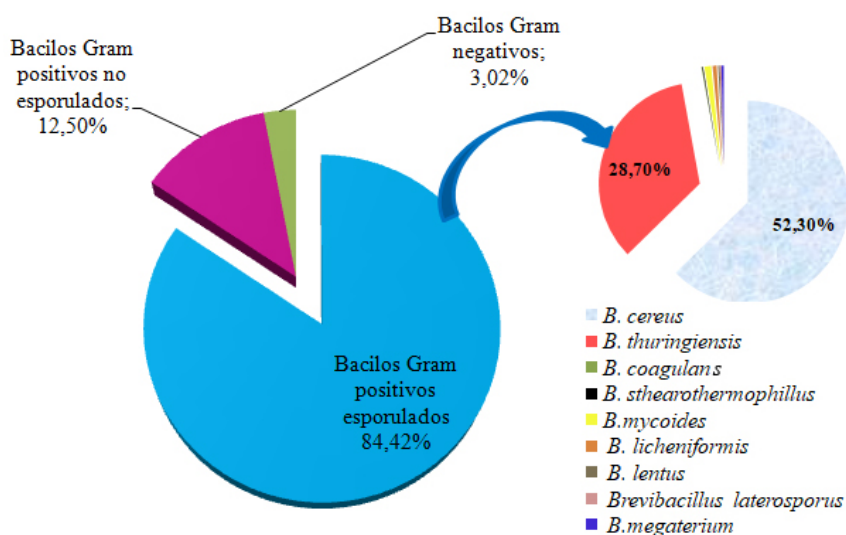


Figura 5. Porcentaje de aislamientos bacterianos obtenidos a partir de muestras de suelo del archipiélago cubano.

La presencia de cuerpos paraesporales (cristales) en 320 aislados permitió confirmar la especie *B. thuringiensis*. En la figura 6 se muestran los cuerpos paraesporales de forma ovalada en un aislamiento de *B. thuringiensis* nativo, similar a los observados en las cepas de referencias utilizadas (IPS- 82 y 266/2-9-VII-98).

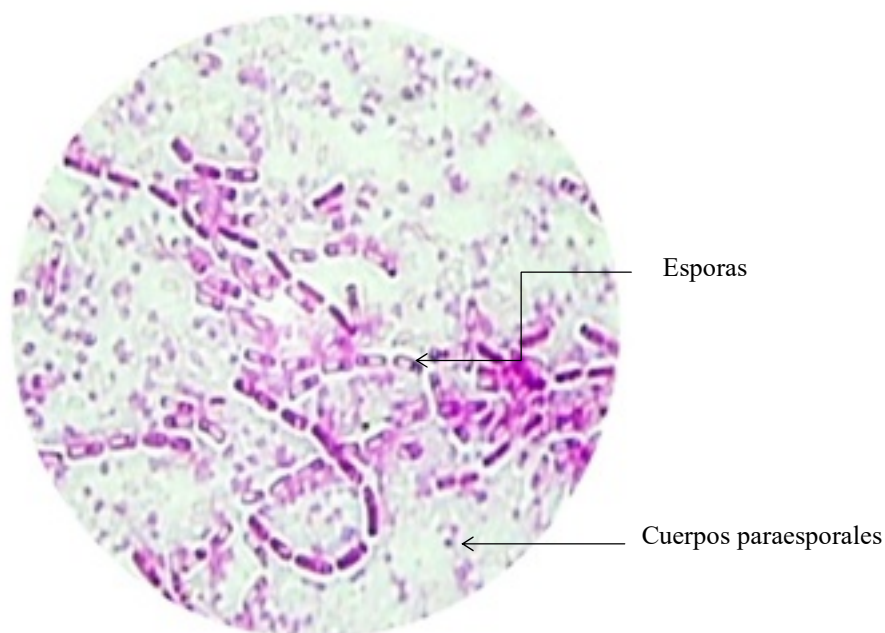


Figura 6. Microfotografía del aislamiento de *B. thuringiensis* L910 tomada por los autores. Observación al microscopio óptico (1000x).

De los 320 aislamientos identificados como *B. thuringiensis*, 19 (5,93%) fueron activos frente a *Ae. aegypti* (Tabla 3). En el anexo IX se reflejan los resultados de las pruebas que avalan la identificación como *B. thuringiensis*.

Los 19 aislamientos fueron obtenidos a partir de 13 muestras diferentes, de las 254 procesadas. En tres de las muestras se obtuvo más de un aislamiento con actividad larvicida (R8, L9, T3). Dieciocho de estos fueron obtenidos de la zona occidental y uno de la región oriental (Tabla 3).

En 12 (63,10%) de los aislamientos se determinó 100% de actividad, mientras que los siete (36,9%) restantes provocaron mortalidad de 40 y 52% (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad larvaria en presencia de suspensiones bacterianas esporuladas de *B. thuringiensis* obtenidas a partir de muestras de suelo con diferente ubicación geográfica

Muestra	Ubicación geográfica	Aislamiento	% de mortalidad± DE
A2	Santiago de Cuba (17,1°8,13'32"N- 60,8°8,37'7,6" O)	A21	100
A5	Cayo Largo del Sur (19,8°8,19'72" N- 81,4°7,40'29" O)	A51	100
C1	Cayo Iguana (20,1°7,58'13" N- 81,1°46,7'14" O)	C17	100
L9	La Habana (23°05'15,61''N, 82°20'47,12''O)	L95	100
		L910	100
M2	La Habana (23°4'45,71" N, 82°18'37,54" O)	M29	100
M9	Matanzas (23°06' 38,5''N, 81° 21' 59,1''O)	M910	52±1,82
O8	Cayo Largo del Sur (21°37'24,54''N, 81°29'29,39''O)	O89	52±2,45
R8	La Habana (23°07'43,59''N, 82° 17'52,41''O)	R84	100
		R85	100
		R87	100
		R89	100

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad larvaria en presencia de suspensiones bacterianas esporuladas de *B. thuringiensis* obtenidas a partir de muestras de suelo con diferente ubicación geográfica. Continuación.

Muestra	Ubicación geográfica	Aislamiento	% de mortalidad± DE
T2	Mayabeque (22°51'27,58" N, 82°01'04,18" O)	T22	40±1,633
T3	Mayabeque (22°45' 33,91"N, 81°45'55,75"O)	T31	40± 2,59
		T36	40±2,59
		T39	52±2,94
T5	Mayabeque (22°48'15,33"N, 81°52'07,66"O)	T52	40±2,94
U8	Artemisa. (22°50'39,9"N, 82°56' 36,9"O)	U81	100
X4	Artemisa (22°54'16,08"N, 83° 09'39,86"O)	X48	100
Controles		IPS-82	100
		266/2 9-VII-98	100

Los niveles de actividad se determinaron mediante el cálculo de las CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀ de los 12 aislamientos que provocaron 100% de mortalidad y de las cepas de referencia IPS-82 y 266/2 9-VII-98 (Fig. 7).

En 11 aislamientos nativos de *B. thuringiensis* se obtuvieron CL₅₀ y CL₉₀ menores que las de la cepa de referencia 266/2 9-VII-98 ($P \leq 0,05$). Con la cepa de referencia IPS-82 se obtuvieron CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀ menores ($P \leq 0,05$) que las obtenidas con los aislamientos nativos. Los valores de CL₉₀ más elevados correspondieron a C17.

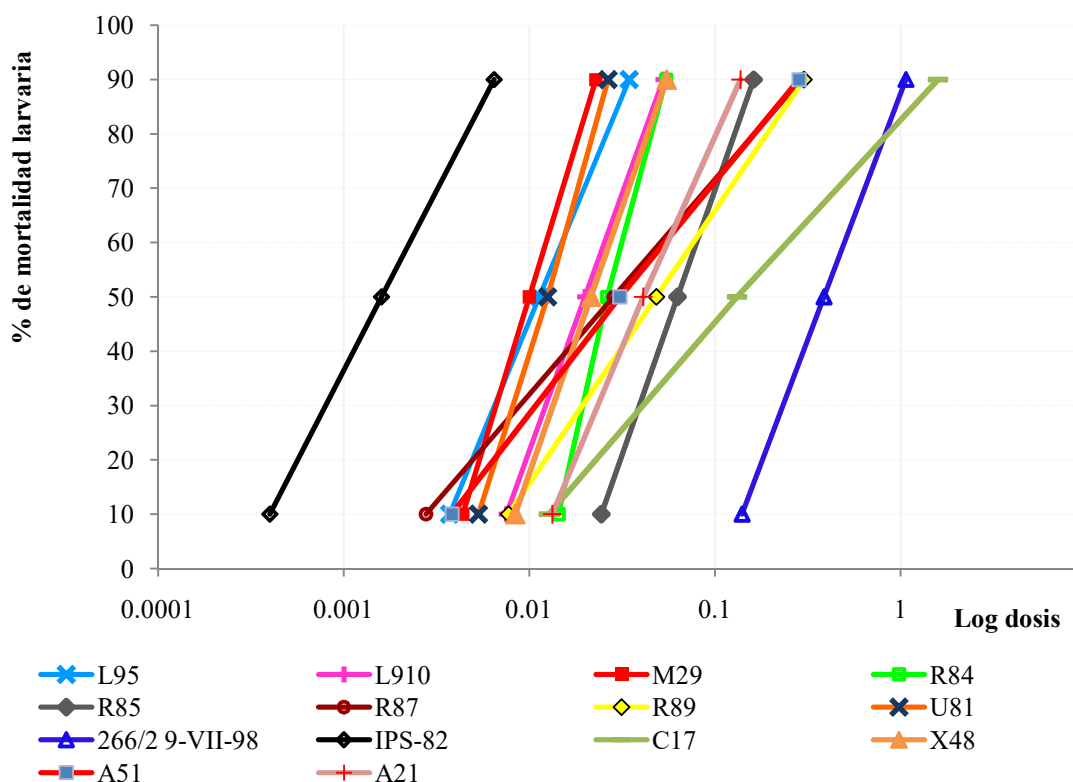


Figura 7. Valores de concentración de cada aislamiento de *B. thuringiensis* que causan 10 (CL₁₀), 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀) porciento de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti*. Los marcadores unidos por líneas representan las CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀, trazados sobre el eje vertical primario.

IV.2 Proteínas, genes y plásmidos presentes en aislamientos de *B. thuringiensis* con elevada actividad larvicida contra *Ae. aegypti*

Cada aislamiento fue caracterizado bioquímicamente mediante SDS-PAGE, procedimiento que permitió la separación de las proteínas Cry y Cyt, responsables de la actividad larvicida contra dípteros, de acuerdo a su PM.

En la figura 8 se observa una representación de los perfiles proteicos de nueve de los doce aislamientos estudiados con mayor actividad larvicida contra *Ae. aegypti*. Once de los aislamientos presentaron perfiles proteicos semejantes a las cepas controles con bandas de proteínas Cry a nivel de los 135, 78, 66 kDa y Cyt a los 27 kDa. El aislamiento C17 mostró un perfil proteico diferente, se observaron las principales bandas proteicas a nivel de los 100, 75 y 26 kDa (Cyt).

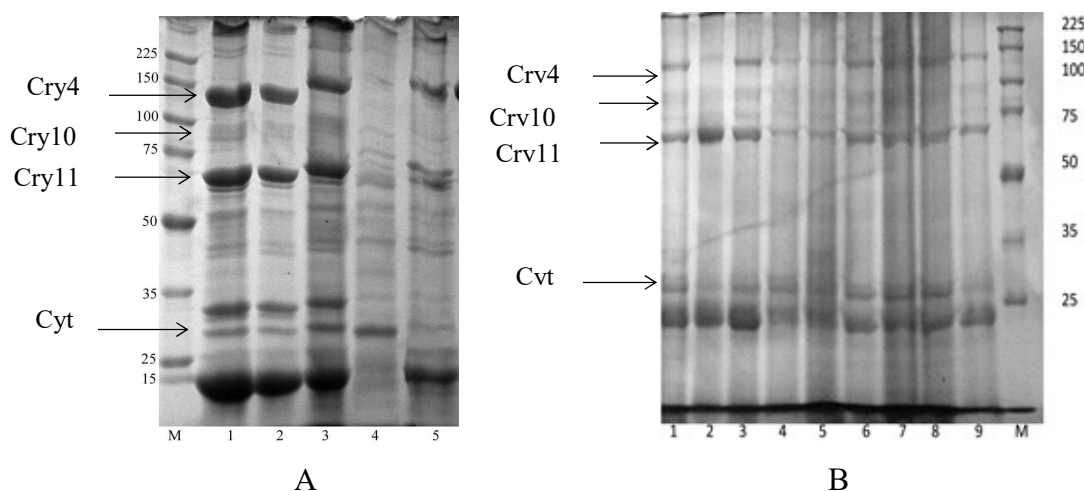


Figura 8. Perfil proteico de aislamientos de *B. thuringiensis* con actividad larvicida.

A- Carril 1-IPS-82, Carril 2- A21, Carril 3- 266/2 9-VII-98, Carril 4-C17, Carril 5-A51

B- Carril 1-IPS-82, Carril 2-266/2 9-VII-98, Carril 3-L95, Carril 4-L910, Carril 5-M29, Carril 6-R84; Carril 7-R85, Carril 8- R87, Carril 9-R89;

M, Marcador de peso molecular (kDa), Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega, EUA)

Los resultados obtenidos a partir de la detección de los genes *cry* y *cyt* de los aislamientos nativos y las cepas controles se muestran en la tabla 4. La presencia de *cytI* (*Aa*, *Ab*, *Ba*) se determinó en 91,6% de los aislamientos (cb-1, tabla 2). Con el aislamiento C17 se visualizó una banda a nivel de los 477 pb la cual puede corresponder con el gen *cytIB*, lo cual está dado fundamentalmente por la no amplificación de los genes *cytI* (*Aa*, *Ab*) con el cb-12 (tabla 2). Los genes *cytI* (*Aa*, *Ab*) se determinaron (cb-12, tabla 2) en 11 aislamientos para 91,6%. Por otra parte, la presencia de los genes *cyt2*, *cry4Aspe*, *cry4Bspe*, *cry11* (*Aa*, *Ba*, *Bb*) y *cry10* se determinó en todos los aislamientos analizados (100%) (cb 2, 4, 5, 6 y 7 tabla 2). Los genes *cry10Aa* se detectaron solamente en los aislamientos L910 y M29 (16,60%) (cb-9, tabla 2). Con el cebador 11 (*cry11(A, B)*) se obtuvo una banda a nivel de los 305 pb en 10 aislamientos con excepción de A21 y C17. En la cepa control (IPS-82) se detectaron los genes *cytI*, *cyt2*, *cry4Aspe*, *cry4Bspe*, *cry11* (*Aa*, *Ba*, *Bb*), *cry10*, *cry10Aa*, *cry11(A, B)* y en la cepa 266/2 9-VII-98 *cytI*, *cyt1Aa*, *cyt2*, *cry4Aspe*, *cry4Bspe*, *cry11* (*Aa*, *Ba*, *Bb*), *cry10*, *cry11(A, B)*. La presencia de los genes *cry2* y *cry30* (cb-3 y 13, respectivamente) no se determinó en ninguno de los aislamientos analizados ni en las cepas controles.

Tabla 4. Genes *cry* y *cyt* identificados en los aislamientos de *B. thuringiensis* nativos del archipiélago cubano.

Cepas/Aislamiento	Genes <i>cry</i> y <i>cyt</i>
IPS-82*	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry10Aa</i> , <i>cry11(A, B)</i>
266/2 9-VII-98*	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i>
A21	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i>
A51	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A,B)</i>
C17	<i>cyt1Ba</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i>
L95	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i>
L910	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry10Aa</i> , <i>cry11(A, B)</i>
M29	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry10Aa</i> , <i>cry11(A, B)</i>
R84	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i>
R85	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i>
R87	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i>
R89	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i> ,
U81	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11spe(Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i>
X48	<i>cyt1(Aa,Ab,Ba)</i> , <i>cyt2</i> , <i>cry4Aspe</i> , <i>cry4Bspe</i> , <i>cry11 (Aa, Ba, Bb)</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11(A, B)</i>

*cepas de referencia

Los doce aislamientos presentaron más de un plásmido. En la figura 9 se observa el ADN plasmídico de los aislamientos. Los patrones de ADN plasmídicos de los aislamientos que migraron bajo el ADN cromosomal se compararon con los patrones de las cepas de referencias utilizadas. Los aislamientos A21 y A51 mostraron un perfil plasmídico semejante a IPS-82, pero diferente de la cepa 266/2 9-VII-98. Por otro lado, el perfil plasmídico de C17 fue diferente a los patrones observados para el resto de los aislamientos (Fig. 9). Los aislamientos L95, L910, M29, R84, R85, R87, R89, U81 y X48 presentaron un patrón plasmídico similar a IPS-82 con plásmidos entre los 4000 y 7000 pb. En todos los aislamientos excepto en C17 se detectó un plásmido por encima del ADN cromosomal, el cual podría corresponder con pBtoxis.

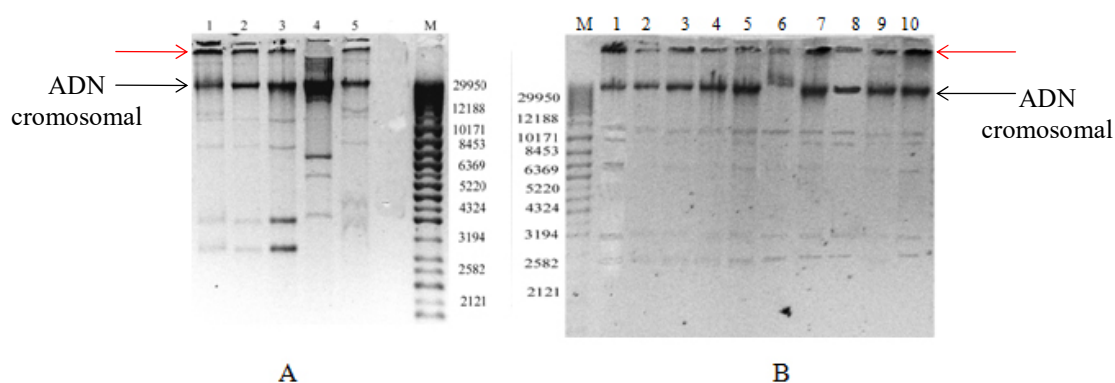


Figura 9. Perfiles plasmídicos de aislamientos nativos con elevada actividad larvicida.

A. Carril 1-IPS-82; Carril 2, A21; Carril 3, A51; Carril 4, C17; Carril 5; Carril 266/2 9-VII-98; M Analytical Marker DNA wide Range (Promega) (en pb).

B. M Analytical Marker DNA wide Range (Promega) (en pb); Carril 1-IPS-82; Carril 2- M29; Carril 3-L95; Carril 4-L910; Carril 5-R84; Carril 6-R85; Carril 7-R87; Carril 8-R89; Carril 9-U81; Carril 10-X48.

La flecha roja indica plasmido por encima del ADN cromosomal.

El aislamiento C17 fue excluido del estudio debido al elevado valor de concentración necesaria para obtener 90% de mortalidad (CL_{90}) en larvas de *Ae. aegypti* comparada con el resto de los aislamientos e inclusive mayor que la cepa utilizada como referencia 266/2 9-VII-98. Además, mostró un perfil proteico con ausencia de algunas toxinas Cry, pocos genes *cry* y *cyt* y ausencia de plasmido por encima de ADN cromosomal.

IV.3 Citotoxicidad de los aislamientos nativos seleccionados sobre macrófagos peritoneales

De los 11 aislamientos evaluados, los extractos acuosos de: A21, L95, L910, M29, R84, R85 y U81 así como los hidroalcohólicos de: A21, L95, L910, M29, R84, R87, R89 y U81 no mostraron citotoxicidad dado por el valor de Concentración Citotóxica Media (CC_{50}) superior a los controles y por encima de 200 $\mu\text{g/mL}$ como se muestra en la tabla 5. El resto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos, excepto los obtenidos a partir del aislamiento X48, fueron considerados también no citotóxicos porque aun obteniéndose CC_{50} inferiores a 200 $\mu\text{g/mL}$ la CC_{50} fue mayor que los controles ($P < 0,05$) (Tabla 5). El aislamiento X48 fue excluido del estudio por presentar CC_{50} significativamente menores ($P < 0,05$) que los controles.

Tabla 5. Citotoxicidad de extractos acuosos e hidroalcohólicos de aislamientos de *B. thuringiensis* colectados en Cuba sobre macrófagos peritoneales.

Extractos	CC ₅₀ ± DE (µg/mL)
Medio solo - Extracto acuoso	> 200
Medio solo - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento A21 - Extracto acuoso	> 200
Aislamiento A21 - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento A51 - Extracto acuoso	137,8 ± 1,9^e
Aislamiento A51 - Extracto hidroalcohólico	195,9 ± 6,3
Aislamiento L95 - Extracto acuoso	> 200
Aislamiento L95 - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento L910 - Extracto acuoso	> 200
Aislamiento L910 - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento M29 - Extracto acuoso	> 200
Aislamiento M29 - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento R84 - Extracto acuoso	> 200
Aislamiento R84 - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento R85- Extracto acuoso	> 200
Aislamiento R85 - Extracto hidroalcohólico	147,5 ± 5,5^f
Aislamiento R87 - Extracto acuoso	134,0 ± 9,0^{d,e}
Aislamiento R87 - Extracto hidroalcohólico	> 200

DE: Desviación estándar.

CC₅₀: Concentración Citotóxica Media

Letras diferentes significa que difieren estadísticamente ($P < 0,05$)

Resaltado en negrita se destacan las CC₅₀ que se obtuvieron por encima de las CC₅₀ de los controles (IPS-82 y 266/2 9-VII-98).

Tabla 5. Citotoxicidad de extractos acuosos e hidroalcohólicos de aislamientos de *B. thuringiensis* colectados en Cuba sobre macrófagos peritoneales. Continuación.

Extractos	CC ₅₀ ± DE (µg/mL)
Aislamiento R89 - Extracto acuoso	152,4 ± 4,5^f
Aislamiento R89 - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento U81 - Extracto acuoso	> 200
Aislamiento U81 - Extracto hidroalcohólico	> 200
Aislamiento X48 - Extracto acuoso	93,3 ± 6,5 ^b
Aislamiento X48 - Extracto hidroalcohólico	69,4 ± 0,9 ^a
Cepa IPS-82 - Extracto acuoso	130,1 ± 2,7 ^d
Cepa IPS-82 - Extracto hidroalcohólico	106,5 ± 3,9 ^{bc}
266/2 9-VII-98 - Extracto acuoso	116,9 ± 8,4 ^c
266/2 9-VII-98 - Extracto hidroalcohólico	116,5 ± 2,2 ^c

DE: Desviación estándar.

CC₅₀: Concentración Citotóxica Media

Letras diferentes significa que difieren estadísticamente ($P < 0,05$)

Resaltado en negrita se destacan las CC₅₀ que se obtuvieron por encima de las CC₅₀ de las cepas controles (IPS-82 y 266/2 9-VII-98).

IV.4 Influencia de factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* sobre los aislamientos nativos

En tabla 6 se muestra la actividad entomopatógena de 10 de los aislamientos nativos y las cepas controles (IPS-82 y 266/2 9-VII-98) a 25, 30 y 35°C. A 25°C el aislamiento A51 mostró mayor actividad larvicida que la cepa IPS-82 mientras que A21 mostró mayor actividad a 30°C. Con los aislamientos A21, A51, R84 y R85 se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) de la CL₉₀ a 30°C con respecto a 25°C (Tabla 6).

Los resultados obtenidos a 35°C evidencian que un mayor número de aislamientos, A21, A51, L910, R84, R85, R87 y R89 tienen mayor actividad que el control IPS-82. Entre los aislamientos A21 y R84 no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) en cuanto a la

actividad obtenida a 30°C con respecto a 35°C al comparar los valores de CL₉₀. En A21 se disminuyeron significativamente ($P<0,05$) los valores de CL₅₀ y CL₉₀ a 30 y 35°C, con respecto a 25°C. Las CL₅₀ y CL₉₀ disminuyeron significativamente ($P<0,05$) para A51 a medida que se incrementa la temperatura. Con los aislamientos L910, R85 y R89 se obtuvo una disminución significativa de las CL₉₀ a la temperatura de 35°C (Tabla 6).

El cloro provocó efectos negativos sobre la actividad larvica en la mayoría de los aislamientos nativos. Las CL₅₀ y CL₉₀ se incrementaron significativamente en A21, A51, M29, R84, R85 y U81 (Tabla 6). Sin embargo, la eficiencia del aislamiento A21 mejoró en agua clorada con relación al agua no clorada a 25°C. Las CL₅₀ y CL₉₀ de A51, L910 y M29 se mantuvieron en el mismo rango tanto en agua clorada como en agua declorinada. La CL₉₀ de R89 se redujo significativamente en agua clorada con relación a agua no clorada a 25°C (Tabla 6).

El aislamiento A51 presentó a 25 y 30°C mejores valores de CL₉₀ que la cepa control IPS-82. A 35°C se obtuvo un incremento de aislamientos (A21, A51, L910, R84, R87, R89) con CL₉₀ menores que la obtenida para la cepa control IPS-82. En presencia de agua clorada los aislamientos A21, A51, L910, R85 y U81 también presentaron CL₉₀ menores que la obtenida para la cepa control IPS-82 (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad larvicida (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre lavas de *Ae. aegypti* a diferentes temperaturas y en presencia de agua clorada.

Cepa/ Aislamiento	Variable	25°C	30°C	35°C	Agua clorada 25°C
A21	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00374 (0,00329-0,00422)	0,00133^{ac} (0,00121-0,00145)	0,0007^{abc} (0,00062-0,00079)	0,02342^{ac} (0,02052-0,02707)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01278 (0,0106-0,01609)	0,00411^{ac} (0,00352-0,00508)	0,00464^{ac} (0,0037-0,00606)	0,05545^{ac} (0,04470-0,07637)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,0181 (0,01455-0,02400)	0,005704^{ac} (0,00487-0,00790)	0,0079^{ac} (0,00603-0,01105)	0,0689^{ac} (0,05568-0,10375)
	Eficiencia	4,84	4,29	11,2	2,94
A51	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00153 (0,00135-0,00173)	0,0007^{ac} (0,00061-0,00080)	0,00002^{abc} (0,000001-0,00007)	0,01132^{ac} (0,00901-0,01404)
	CL ₉₀ (LI- LS)	0,00455 (0,00374-0,00593)	0,001602^{ac} (0,00132-0,00211)	0,00012^{abc} (0,00007-0,00030)	0,04702^{ac} (0,03150-0,10350)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,00621 (0,00491-0,00855)	0,00226^{ac} (0,00202-0,03230)	0,00035^{abc} (0,00023-0,00093)	0,047^{ac} (0,03730-0,05800)
	Eficiencia	4,05	3,74	13,78	4,14

Resultado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98

Los valores de CL están expresados en mg/L

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua de clorada a 25°C)

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) de 35°C con respecto a 30°C

c: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98

Tabla 6. Actividad larvicida (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* a diferentes temperaturas y en presencia de agua clorada. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	25°C	30°C	35°C	Agua clorada 25°C
L95	CL ₅₀ (LI-LS)	0,09819 (0,08325-0,11700)	0,07864 ^a (0,06237-0,10706)	0,0614a (0,05490-0,069680)	0,12627 (0,11321-0,14025)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,2175 (0,17275-0,30899)	0,38221 (0,23742-0,82760)	0,2024 (0,15830-0,28520)	0,2314 (0,19980-0,28970)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,2724 (0,23088-0,3247)	0,5983 (0,34174-1.5000)	0,9345 (0,83600-1,05940)	0,27534 (0,23099-0,3615)
	Eficiencia	2,77	7,6	15,22	2,14
L910	CL ₅₀ (LI-LS)	0,01019 (0,00941-0,01093)	0,0101 (0,00808-0,01300)	0,00199^{abc} (0,00179-0,00219)	0,0173^c (0,01460-0,02122)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,0192 (0,01757-0,02185)	0,02119 (0,01577-0,03689)	0,00593^{abc} (0,00520-0,00695)	0,0346^c (0,02680-0,05490)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,02316 (0,0206-0,02706)	0,02614 (0,01864-0,0508)	0,00808^{abc} (0,00689-0,00989)	0,04157^c (0,01849-0,24528)
	Eficiencia	2,55	2,59	4	2,42

Resultado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98

Los valores de CL están expresados en mg/L

LI: Límite inferior LS: Límite superior,

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua de clorinada a 25°C)

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) de 35°C con respecto a 30°C

c: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98

Tabla 6. Actividad larvicida (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* a diferentes temperaturas y en presencia de agua clorada. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	25°C	30°C	35°C	Agua clorada 25°C
M29	CL ₅₀ (LI-LS)	0,06569 (0,05833-0,07440)	0,05458 (0,04310-0,07440)	0,02447 (0,02111-0,03178)	0,10393 ^{ac} (0,09322-0,11521)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,13652 (0,11449-0,17510)	0,32005 (0,18700-0,83119)	0,06622 (0,05640-0,15280)	0,2148 ^{ac} (0,18660-0,25910)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,1678 (0,1368-0,2250)	0,5284 (0,2779-0,71686)	0,08746 (0,07544-0,11357)	0,2639 ^{ac} (0,2237-0,33110)
	Eficiencia	2,56	9,62	3,57	2,53
R84	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00954 (0,00862-0,10358)	0,00293^c (0,00254-0,00337)	0,00284^c (0,00244-0,00339)	0,03412 ^a (0,02797-0,04334)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01913 (0,01741-0,02162)	0,00717^{ac} (0,00588-0,00958)	0,00803^{ac} (0,00610-0,01230)	0,1465 ^{ac} (0,09805-0,28373)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,02573 (0,0235-0,0298)	0,00924^{ac} (0,00800-0,01219)	0,0108^{bc} (0,00779-0,01794)	0,16262 ^{ac} (0,14396-0,22360)
	Eficiencia	2,72	3,15	3,8	5,16

Resultado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98

Los valores de CL están expresados en mg/L

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua de clorada a 25°C)

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) de 35°C con respecto a 30°C

c: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98

Tabla 6. Actividad larvicida (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* a diferentes temperaturas y en presencia de agua clorada. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	25°C	30°C	35°C	Agua clorada 25°C
R85	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00793 (0,00697-0,00901)	0,00189^c (0,00153-0,00220)	0,00107^c (0,00091-0,00126)	0,01244^c (0,01097-0,01425)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,017 (0,01478-0,02176)	0,00496^{ac} (0,00410-0,00665)	0,00507^{ac} (0,00359-0,00855)	0,02232^{ac} (0,01925-0,03167)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,0217 (0,01792-0,02847)	0,00652^{ac} (0,00516-0,00959)	0,00788^{ac} (0,00518-0,01498)	0,02772^{ac} (0,02223-0,04034)
	Eficiencia	2,77	3,45	7,37	2,15
R87	CL ₅₀ (LI-LS)	0,02897 (0,02616-0,03232)	0,00565 ^a (0,00500-0,00643)	0,00253 ^a (0,00199-0,00325)	0,038 (0,03280-0,04600)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,07831 (0,06713-0,09530)	0,0105 (0,00886-0,01351)	0,01242 (0,00821-0,02462)	0,1072 (0,08040-0,16730)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,104 (0,0866-0,13102)	0,0125 (0,0109-0,0151)	0,0195 (0,01182-0,04533)	0,1425 (0,12460-0,18640)
	Eficiencia	3,58	2,21	7,7	3,75

Resultado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98

Los valores de CL están expresados en mg/L

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua de clorinada a 25°C)

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) de 35°C con respecto a 30°C

c: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98

Tabla. 6. Actividad larvica (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* a diferentes temperaturas y en presencia de agua clorada. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	25°C	30° C	35°C	Agua clorada 25° C
R89	CL ₅₀ (LI-LS)	0,07146 (0,06444-0,07903)	0,01252 (0,00527-0,01637)	0,00529 ^a (0,00302-0,00649)	0,04899 (0,04208-0,05907)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,17308 (0,14962-0,20820)	0,05094 ^a (0,03350-0,27200)	0,01191 ^a (0,01020-0,04760)	0,1374 ^{ac} (0,10310-0,21440)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,2223 (0,1873-0,27823)	0,07584 ^a (0,043416-0,78746)	0,01499 ^a (0,00799-0,09271)	0,1841 ^c (0,1313-0,31279)
	Eficiencia	3,14	6,06	2,83	3,76
U81	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00461 (0,00424-0,00491)	0,00163^{ac} (0,00145-0,00181)	0,00466 (0,00346-0,00683)	0,01682^{ac} (0,01250-0,03050)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,00905 (0,00810-0,01043)	0,00332^{ac} (0,00285-0,00409)	0,04605 ^{ab} (0,02259-0,15460)	0,0672 ^a (0,03501-0,03630)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,01095 (0,0096-0,01304)	0,00406^{ac} (0,00339-0,00523)	0,08895 ^{ab} (0,03814-0,3774)	0,0996 ^a (0,04610-0,74310)
	Eficiencia	2,37	2,48	19,08	5,9

Resultado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98

Los valores de CL están expresados en mg/L

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua de clorada a 25°C)

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) de 35°C con respecto a 30°C

c: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98

Tabla 6. Actividad larvicida (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* a diferentes temperaturas y en presencia de agua clorada. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	25°C	30°C	35°C	Agua clorada 25°C
IPS-82	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00224 (0,00170-0,00273)	0,00067 ^a (0,00061-0,00073)	0,00567 ^{ab} (0,00490-0,00680)	0,01803 ^a (0,01440-0,02332)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,00567 (0,00457-0,00749)	0,00177 ^a (0,00157-0,00207)	0,02417 ^{ab} (0,01740-0,03865)	0,07023 ^a (0,04757-0,13180)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,00892 (0,00731-0,01174)	0,002128 (0,001805-0,00262)	0,0364 ^{ab} (0,0246-0,06371)	0,121 ^a (0,08250-0,23779)
	Eficiencia	3,3	3,17	6,41	6,73
266/2 9- VII- 98	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00758356 (0,0081-0,0097)	0,00534 ^a (0,00482-0,00584)	0,003494 ^a (0,00294-0,00429)	0,03057 ^a (0,0283-0,0329)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01983 (0,01779-0,02265)	0,01205 (0,01059-0,01421)	0,012454 (0,00882-0,02197)	0,061522 ^a (0,056-0,096)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,025 (0,02184-0,0294)	0,01518 (0,013-0,0186)	0,01785 (0,02529-0,0356)	0,07495 ^a (0,0666-0,08735)
	Eficiencia	3,3	2,8	5,1	2,5

Resaltado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98

Los valores de CL están expresados en mg/L

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua de clorada a 25°C).

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) de 35°C con respecto a 30°C.

c: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98.

El efecto de la temperatura sobre los principales factores de virulencia (proteínas cry y cyt) de los aislamientos nativos fue evaluado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. En la figura 10 se muestra una representación de los diferentes patrones proteicos obtenidos al estudiar los aislamientos de *B. thuringiensis*. Las bandas correspondientes a las principales proteínas Cry y Cyt fueron observadas a 25°C. Posterior al tratamiento a 35 y 40°C las bandas de las proteínas Cry 4, Cry 10 y Cry11 (130, 78 y 70 kDa, respectivamente), disminuyeron su intensidad en los aislamientos A21, R85 y U81. Por otra parte, se observó reducción de la intensidad de las bandas correspondiente a las proteínas Cyt (27kDa) a 35 y 40°C en A21, A51, R85 y U81. En los aislamientos L910 y R84 las toxinas Cyt fueron degradadas solamente a 40°C (Fig. 10).

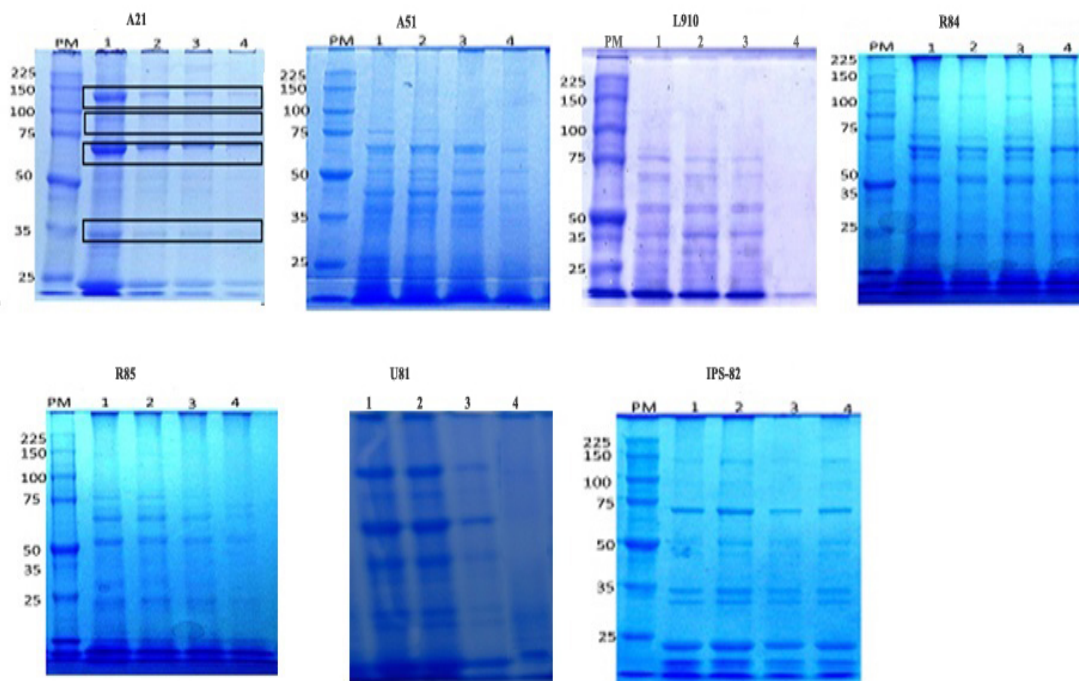


Figura 10. Perfil proteico de aislamientos con actividad larvicida a diferentes temperaturas. Aislamientos A21, A51, L910, R84, R85, U81 y cepa IPS-82.

PM: Marcador de peso molecular (kDa)

Carril de 1-4: temperaturas de 25, 30, 35 y 40°C, respectivamente.

De arriba hacia abajo señalado con un rectángulo se muestran las bandas proteicas correspondientes con Cry4 (135kDa), Cry 10 (78kDa), Cry 11 (72kDa) y Cyt (26-27kDa).

En la figura 11 se observa una representación del patrón proteico en cinco de los aislamientos estudiados, en presencia y ausencia de cloro. El análisis proteico no reveló ninguna reducción visible de los principales factores de virulencia de los aislamientos en estudio (Fig 11).

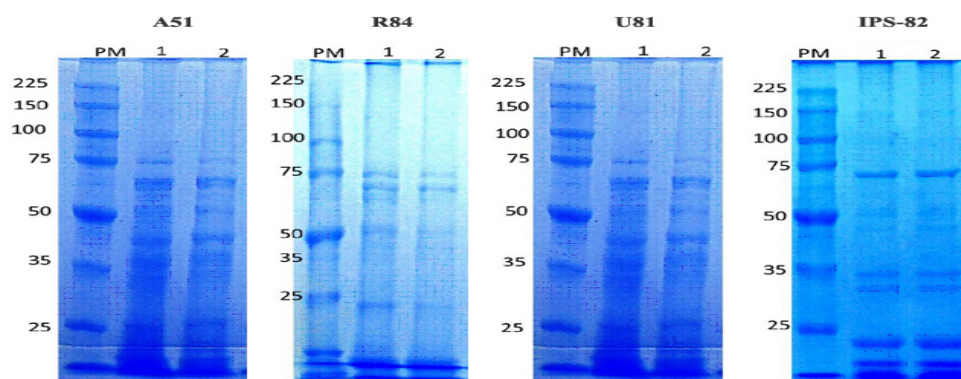


Figura 11. Perfil proteico de aislamientos con actividad larvicida a en presencia y ausencia de cloro.

Aislamientos, A51, R84, U81 cepa IPS-82

Carril: 1 a 25°C; Línea 2: en presencia de cloro.

PM: Marcador de peso molecular (kDa)

Las CL_{50} , CL_{90} , y CL_{95} de los aislamientos nativos y las cepas controles en presencia de NaCl se muestran en la tabla 7. El NaCl afectó solo la CL_{50} de R84. Con los aislamientos R85, R87, R89 y U81 la actividad larvicida se favoreció por la presencia de NaCl, mientras que la actividad de A21 y A51 no se afectó. La eficiencia de los aislamientos no se afectó por la presencia de NaCl.

La actividad larvicida de A21, A51, L95, L910, M29 y R85 se afectó por la presencia de materia orgánica. A pesar de esos resultados, las CL_{90} de A21, A51, L910, R84 y U81 y fueron menores que las obtenidas con la cepa 266/2 9-VII-98. Solamente el aislamiento R85 mejoró la eficiencia en presencia de materia orgánica con respecto a los resultados obtenidos en agua declorinada a 25°C (Tabla 7).

En presencia de NaCl y materia orgánica solo los aislamientos A51y U81 presentaron valores de CL_{90} menores que los obtenidos para la cepa control IPS-82 (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad larvica (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* en presencia de materia orgánica y NaCl.

Cepa/ Aislamiento	Variable	Agua decolorinada	NaCl	Materia orgánica
A21	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00374 (0,00329-0,00422)	0,003458^b (0,0053-0,0085)	0,01259614^{ab} (0,011-0,0143)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01278 (0,0106-0,01609)	0,0101^b (0,01-0,0242)	0,03272043^{ab} (0,0245-,0461)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,0181 (0,01455-0,02400)	0,01590^b (0,01167-0,0294)	0,045^{ab} (0,0351-0,065)
	Eficiencia	4,84	4,5	3,5
A51	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00153 (0,00135-0,00173)	0,0018^b (0,00168-0,00198)	0,0031381^{ab} (0,00267-0,00378)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,00455 (0,00374-0,00593)	0,00467^b (0,004105-0,00545)	0,00729^{ab} (0,00572-,0104)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,00621 (0,00491-0,00855)	0,0061^b (0,00525- 0,007343)	0,0093^{ab} (0,0070-,01412)
	Eficiencia	4,1	3,4	3
L95	CL ₅₀ (LI-LS)	0,09819 (0,08325-0,11700)	0,14716 (0,07035- 0,0863)	0,13549 (0,1137-0,166)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,2175 (0,17275-0,30899)	0,2693 (0,175- 0,244)	0,36246 ^a (0,272-0,563)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,2724 (0,23088-0,3247)	0,266 (0,224-0,331)	0,4787 ^a (0,3429-0,8084)
	Eficiencia	2,8	1,8	3,53

Resultado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98.

Los valores de CL están expresados en mg/L

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua decolorinada a 25°C).

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98.

Tabla 7. Actividad larvica (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* en presencia de materia orgánica y NaCl. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	Agua declorinada	NaCl	Materia orgánica
L910	CL ₅₀ (LI-LS)	0,01019 (0,00941-0,01093)	0,0123 ^b (0,00986- 0,0158)	0,01458^{ab} (0,00127-0,0017)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01931 (0,01757-0,02185)	0,0244 ^b (0,0186- 0,0451)	0,03384^{ab} (0,0027-0,005)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,02316 (0,0206-0,02706)	0,0298 (0,0217- 0,055)	0,043^{ab} (0,033-0,062)
	Eficiencia	2,2	2,4	3
M29	CL ₅₀ (LI-LS)	0,06569 (0,05833-0,07440)	0,09141 ^b (0,07743-0,01119)	0,36047 ^{ab} (0,3196-0,399)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,13652 (0,11449-0,17510)	0,20381 ^b (0,1562- 0,3178)	0,70980 ^{ab} (0,6163-0,8782)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,1678 (0,1368-0,2250)	0,2556 (0,1875- 0,4337)	0,8603 ^{ab} (0,7242- 1.126)
	Eficiencia	2,6	2,8	2,4
R84	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00954 (0,00862-0,10358)	0,0182 ^{ab} (0,0167- 0,0198)	0,00817^{ab} (0,0076-0,0087)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01913 (0,01741-0,02162)	0,03266 ^b (0,02916- 0,03786)	0,01830^{ab} (0,01654-0,0207)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,02573 (0,0235-0,0298)	0,0385 (0,0337- 0,04613)	0,0231^b (0,02045-0,0265)
	Eficiencia	2,7	2,1	3

Resaltado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98.

Los valores de CL están expresados en mg/L.

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua declorinada a 25°C).

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98.

Tabla 7. Actividad larvica (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* en presencia de materia orgánica y NaCl. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	Agua declorinada	NaCl	Materia orgánica
R85	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00793 (0,00697-0,00901)	0,00466^b (0,0044-0,005)	0,05309 ^{ab} (0,0335-0,139)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01700 (0,01478-0,02176)	0,01007^b (0,00916- 0,0114)	0,29586 ^{ab} (0,1195-2.56)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,0217 (0,01792-0,02847)	0,01255^b (0,01115- 0,0144)	0,48 ^{ab} (0,169-5.9)
	Eficiencia	2,8	2,7	9,04
R87	CL ₅₀ (CL)	0,02897 (0,02616-0,03232)	0,0057ab (0,0052- 0,0063)	0,03349 (0,0303-0,037)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,07831 (0,06713-0,09530)	0,01516^{ab} (0,01343- 0,01754)	0,07681 ^b (0,0667-0,0916)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,104 (0,0866-0,13102)	0,02 ^a (0,0173- 0,024)	0,09725^b (0,0825-0,1198)
	Eficiencia	3,6	3,5	3
R89	CL ₅₀ (LI-LS)	0,07146 (0,06444-0,07903)	0,0109 ^{ab} (0,00972- 0,01194)	0,08009 ^{ab} (0,068-0,0955)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,17308 (0,14962-0,20820)	0,0342 ^{ab} (0,0297- 0,0408)	0,18715 ^b (0,1477-0,266)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,2223 (0,1873-0,27823)	0,04719 ^{ab} (0,0397- 0,05913)	0,238 ^b (0,181-0,3614)
	Eficiencia	3,1	4,3	2,97

Resaltado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98.

Los valores de CL están expresados en mg/L.

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua declorinada a 25°C).

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98.

Tabla 7. Actividad larvicida (concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₅) y eficiencia de los aislamientos de *B. thuringiensis* sobre larvas de *Ae. aegypti* en presencia de materia orgánica y NaCl. Continuación.

Cepa/ Aislamiento	Variable	Agua declorinada	NaCl	Materia orgánica
U81	CL ₅₀ (LI-LS)	0,004611 (0,00424-0,00491)	0,00124^{ab} (0,00115- 0,00134)	0,00379^b (0,0036-0,0041)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,00905 (0,00810-0,01043)	0,00268^{ab} (0,00245- 0,003625)	0,00720^b (0,0066-0,0082)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,01095 (0,0096-0,01304)	0,00335^{ab} (0,00297- 0,0038)	0,0088^b (0,0077-0,0101)
	Eficiencia	2,4	2,7	2,31
IPS-82	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00224 (0,00170-0,00273)	0,00207 (0,0019- 0,00226)	0,00583 ^a (0,0039-0,0084)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,00567 (0,00457-0,00749)	0,0054 (0,005- 0,0063)	0,01092 ^a (0,0077-0,0294)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,00892 (0,00731-0,01174)	0,0071 (0,0061- 0,0086)	0,0131 ^a (0,0088-0,0444)
	Eficiencia	3,3	3,4	2,24
266/2 9-VII-98	CL ₅₀ (LI-LS)	0,00758356 (0,0081-0,0097)	0,00891 ^a (0,0081- 0,001)	0,02412 (0,0188-0,025)
	CL ₉₀ (LI-LS)	0,01983 (0,01779-0,02265)	0,01982 (0,018- 0,023)	0,04149 ^a (0,06367-0,09436)
	CL ₉₅ (LI-LS)	0,025 (0,02184-0,0294)	0,025 (0,022-0,0293)	0,1062 ^a (0,086-0,144)
	Eficiencia	3,3	2,8	4,4

Resaltado en negrita se destacan los valores de CL menores que la cepa utilizada como control 266/2 9-VII-98.

Los valores de CL están expresados en mg/L.

LI: Límite inferior LS: Límite superior

a: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control (bioensayo en agua declorinada a 25°C).

b: Valores de CL con diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a los obtenidos con la cepa control 266/2 9-VII-98.

Los aislamientos A21, A51, R84, R85 y U81 fueron seleccionados para continuar el estudio basado en los siguientes resultados: los aislamientos nativos A21 y A51 presentaron CL₉₀ y CL₉₅ menores que la cepa 266/2 9-VII-98 frente a los factores evaluados. Por otra parte, el aislamiento R85 presentó CL₉₀ y CL₉₅ menor que la cepa 266/2 9-VII-98 a las tres temperaturas evaluadas, con cloro y NaCl. Con el aislamiento U81 se obtuvo disminución de los valores de CL₉₀ y CL₉₅ en presencia de materia orgánica y NaCl, mientras que R84 solo a las tres temperaturas evaluadas.

IV.5 Selección de aislamientos libres de betaexotoxinas

La cepa NRD-12 (control positivo de betaexotoxinas) y el aislamiento nativo A51 exhibieron una elevada toxicidad (73,95% y 65,50% de mortalidad, respectivamente) contra *Ae. aegypti* (Tabla 8), lo cual resultó estadísticamente significativo con respecto al control negativo y el resto de los aislamientos (ANOVA, F=49,96 *P*<0,05). Los aislamientos A21, R84, R85 y U81 mostraron mortalidad por debajo de 15 %, destacándose A21 con 0% de mortalidad.

Tabla 8. Actividad de los sobrenadantes autoclaveados de aislamientos nativos y cepas controles de *B. thuringiensis* sobre *Ae. aegypti*.

Cepa/ aislamiento	% de mortalidad
HD-1 Control(-)	0,67
NRD-12 Control (+)	73,95
IPS-82	0
A21	0
A51	65,5
R84	5,44
R85	0,77
U81	13,2

En la figura 12 se observan los valores de absorción para los sobrenadantes de los aislamientos que presentaron una mortalidad mayor a 1% y para los controles positivos y negativos utilizados en el estudio de detección de betaexotoxinas. El aislamiento A51 presentó mínimos y máximos de absorción similar al observado para la cepa productora de beta exotoxinas (NRD-12 acápite III.2) con valores de absorbancia máxima mayor que el observado para el control positivo. Con el aislamiento U81 se obtuvieron resultados similares. Sin embargo, los valores de absorbancia máxima y mínima fueron menores que los obtenidos con el control positivo. Por su parte, R84 presentó mínimos y máximos de absorción diferentes al control positivo y al negativo.

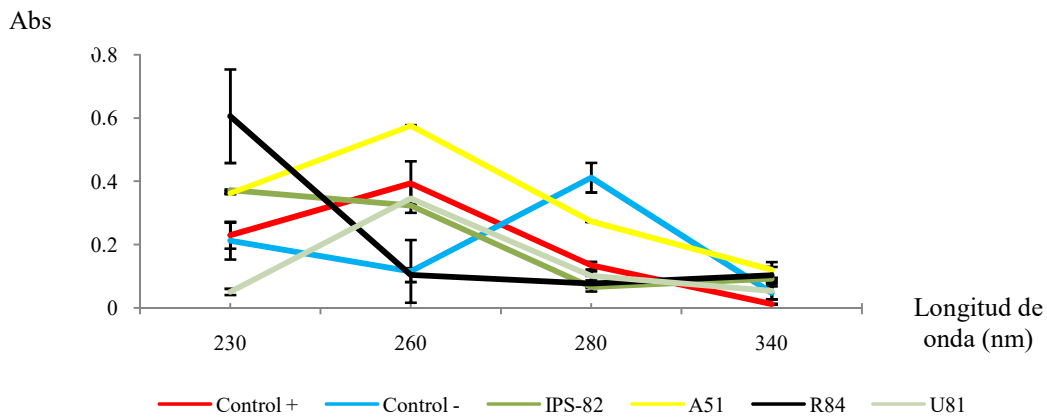


Figura 12 Absorción de luz UV de los sobrenadantes autoclaveados de cultivos de *B. thuringiensis*.
Abs: Absorbancia

Teniendo en cuenta la alta actividad larvicida del aislamiento A21 frente a factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* (acápite IV.4) y a la ausencia total de actividad insecticida en el sobrenadante del cultivo centrifugado y autoclaveado se seleccionó este aislamiento para continuar el estudio.

IV.6 Medio de cultivo que favorece la expresión de los principales factores de virulencia y actividad larvicida en el aislamiento A21

El medio de cultivo es esencial para obtener mejores rendimientos en la producción de biolarvicidas.

Al observar la tinción de Gram a las 72 h de crecimiento del cultivo con presencia de $MgSO_4$ y $NaCl$ se encontró poco crecimiento vegetativo (20%) y un gran número de esporas y cristales liberados al medio producto de la lisis celular (80%). Sin embargo, en presencia de $FeSO_4$ y $ZnSO_4$ el número de esporas y cristales liberados al medio no sobrepasó 10%.

En la figura 13 se observa el logaritmo de UFC del aislamiento A21 a las 72 h en presencia de $MgSO_4$ y $NaCl$. Se observó que el crecimiento bacteriano en presencia de estas sales fue mayor ($P < 0,05$) que en el medio de cultivo sin sales, o con el resto de las sales evaluadas. Por esta razón, $NaCl$, $MgSO_4$, fueron las sales seleccionadas para la preparación de los medios de cultivo

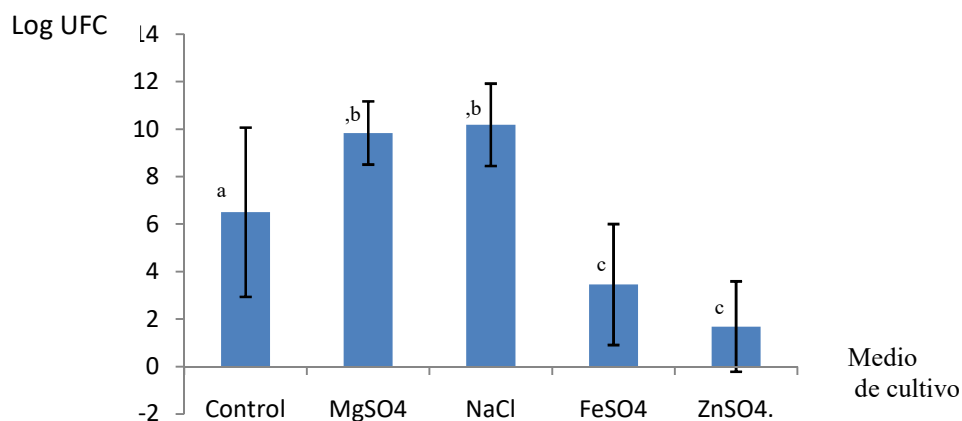


Figura 13. Crecimiento a las 72 h del aislamiento A21 de *B. thuringiensis* en medio de cultivo (control) y suplementado con sales inorgánicas.

Los valores de UFC fueron transformados logarítmicamente.

Letras diferentes significa que difieren estadísticamente ($P < 0,05$)

A las muestras tomadas cada 6 h de los cultivos bacterianos crecidos en los medios 1 (30 g/L extracto de levadura y 10 g/L glucosa; 12,5 mM MgSO₄; 25 mM NaCl; pH 7,0) y medio 2 (20 g/L levadura torula y 5 g/L almidón de maíz; 12,5 mM MgSO₄; 25 mM NaCl; pH 7,0) se les realizó la tinción de Gram. Como resultado se obtuvo a las 6 h de cultivo mayor crecimiento vegetativo con algunas esporas y cristales en el interior celular para el caso del medio 2, mientras que en el medio 1 el crecimiento vegetativo resultó escaso. En las muestras tomadas a las 12 h de incubación, se obtuvo con el medio 2, crecimiento vegetativo abundante, con esporas y cristales ya libres en el medio, mientras que para el medio 1 el crecimiento vegetativo fue abundante también, pero con las esporas y cristales aún en el interior celular, hasta las 18 h donde se comenzaron a expulsar al medio.

Para las muestras tomadas con posterioridad desde las 24 hasta las 66 h para ambos medios de cultivo, el crecimiento vegetativo y las esporas y cristales libres en el medio, fueron aumentando paulatinamente, hasta llegar a las 72 h de incubación. En este tiempo, se pudo apreciar disminución del crecimiento vegetativo con incremento de esporas y cristales (80%) libres para los dos medios.

Para el medio 2, se observó que su fase de crecimiento exponencial terminó sobre las 12 h de iniciado el cultivo, con una fase estacionaria a partir de las 12 hasta las 48 h aproximadamente, obteniéndose a las 54 h un valor de absorbancia máxima de 0,69. Para el medio 1, la fase de crecimiento exponencial terminó entre las 48-54 h de iniciado el cultivo, comenzando la fase estacionaria, que se extiende hasta las 72 h del experimento con un máximo de absorbancia de 1,473 (Fig. 14).

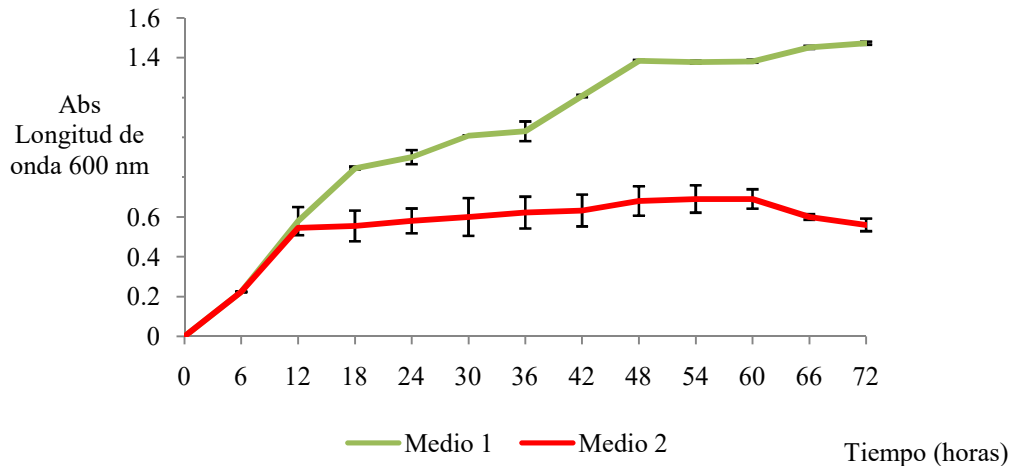


Figura 14. Curvas de crecimiento del aislamiento A21 en los medios evaluados.
Abs: Absorbancia

Se monitoreó el pH para controlar sus variaciones en el tiempo y determinar su influencia sobre el crecimiento. En el medio 1 el pH se mantuvo oscilando en valores entre 5 y 6, mientras que en el medio 2, luego de un descenso de pH de 6,98 a 5,34, los valores se mantuvieron estables entre 4,83 y 5 (Fig.15).

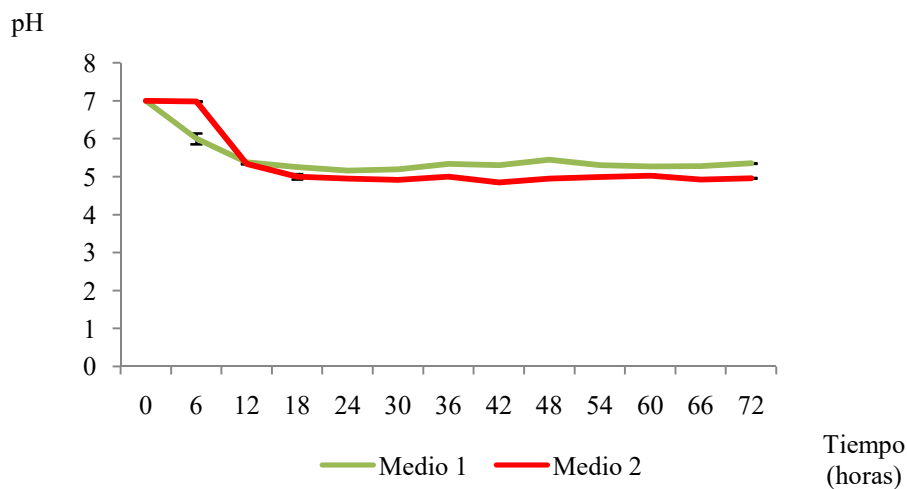


Figura 15. Curvas de pH en los medios evaluados para el crecimiento del aislamiento A21.

En las muestras tomadas de cultivos de 72 h con los diferentes medios de cultivo, se observó crecimiento hasta la dilución de 10^{-8} con 1 UFC para el medio 2, mientras que para el medio 1 solo fue apreciable el crecimiento hasta la dilución de 10^{-4} con 5 UFC. Además,

el crecimiento obtenido a la dilución de 10^{-1} resultó mayor para el medio 2 con 950 UFC, mientras que con el medio 1 se obtuvieron 800 UFC.

La figura 16 muestra el perfil proteico del aislamiento A21 de *B. thuringiensis* cultivado en diferentes medios de cultivo.

En el medio 1 las principales bandas proteicas con actividad contra dípteros estuvieron menos representadas (78 y 70 kDa), mientras que con el medio 2 se observaron a nivel de los 130, 78, 70 (Cry4, Cry10 y Cry11) y 28 kDa (Cyt) (Fig. 16)

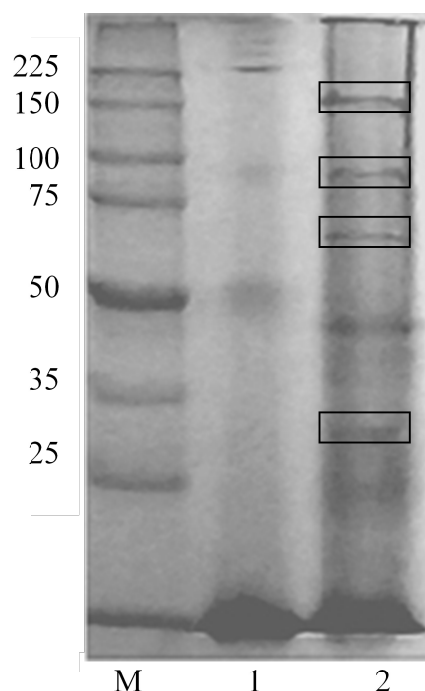


Figura 16. Perfil proteico del aislamiento A21 cultivado en diferentes medios.

M. Marcador de peso molecular (kDa)

1. Medio 1, 2. Medio 2

En el carril 2 aparecen marcados con rectángulos de arriba hacia abajo las bandas correspondientes a los PM 130, 78, 70 (Cry4, Cry10 y Cry11) y 28 kDa (Cyt).

En la tabla 9 se muestran los valores de CL₁₀, CL₅₀, CL₉₀, CL₉₅ y CL₉₉, del aislamiento A21, con sus respectivos límites inferiores y superiores, obtenidos en los diferentes medios de cultivo. Las CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₉ obtenidas con el medio 2, fueron 0,00075; 0,00189 y 0,00401 mg/L respectivamente, menores a las obtenidas para el medio 1.

Tabla 9. Valores de concentraciones letales (CL) del aislamiento A21 obtenidos en los diferentes medios.

CL	Medio 1 (mg/L)	Medio 2 (mg/L)
CL₁₀	0,07995	0,00029*
LI-LS	0,05103–0,10239	0,00023–0,00035
CL₅₀	0,15641	0,00075*
LI-LS	0,12572–0,20237	0,00066–0,00085
CL₉₀	0,30578	0,00189*
LI-LS	0,22932–0,5399	0,00153–0,00250
CL₉₅	0,3698	0,00245
LI-LS	0,26600–0,72890	0,00193–0,00345
CL₉₉	0,56000	0,00401
LI-LS	0,34880–1,29000	0,00294–0,00631

LI: Límite inferior, LS: Límite superior

*Valores con diferencia significativa ($P < 0,05$)

Considerando los resultados obtenidos se seleccionó el medio 2, conformado por levadura torula y almidón de maíz como idóneo para continuar los experimentos con el aislamiento seleccionado.

IV.7 Toxicidad/patogenicidad aguda oral del aislamiento A21 cultivado en el medio 2 utilizando como modelo biológico *Rattus norvegicus*, cepa Wistar

Al administrar por vía oral el aislamiento A21 cultivado en el medio 2 y el medio de cultivo estéril, no se notificaron muertes, ni signos clínicos de toxicidad durante los 21 días en que transcurrió el experimento. El comportamiento y el aspecto físico de los animales durante las supervisiones fueron normales para la especie constatándose: comportamiento espontáneo en respuesta a la manipulación del usuario, pelo en buen estado, no presencia de secreciones en los sistemas auditivo, visual y respiratorio, respiración estable. No se obtuvieron diferencias significativas en el peso de los animales tratados con el aislamiento A21 ($P=0,902$) (media de 327, 2111) (DE $\pm 6,05$) y los tratados con medio de cultivo estéril ($P=0,539$) (media de 336.4778) (DE $\pm 5,73071$). No se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes grupos ($P=0,283$).

Se obtuvo crecimiento de colonias sugestivas del género *Bacillus* en las heces de un solo animal después de las 3 h de la administración del aislamiento A21 cultivado en el medio 2 y en el resto de los animales tratados en el día 3 (Tabla 10).

La ausencia de cuerpos paraesporales y un perfil bioquímico diferente al obtenido para el aislamiento A21 (Anexo IX) de las colonias sugestivas del género *Bacillus* obtenidas en el grupo tratado con medio de cultivo estéril y en dos colonias obtenidas en el grupo tratado con A21 (a los 3 días), permitió confirmar que no se correspondían con *B. thuringiensis*. El resto de las colonias obtenidas en el grupo tratado con A21 cultivado en el medio 2 presentaron cuerpos paraesporales y perfil bioquímico igual a A21, por lo que fueron clasificadas como *B. thuringiensis* (Tabla 10, Anexo IX).

Tabla 10. Resultados del conteo de colonias sugestivas de *Bacillus* en heces posterior a la administración de A21 cultivado en el medio 2.

Animales tratados con:	# de animales	Tiempo de toma de muestras				
		3h	3 días	7 días	14 días	21 días
Medio de cultivo estéril	1	0	1×10^{-1}	0	0	0
	2	0	1×10^{-1}	1×10^{-1}	0	0
	3	0	1×10^{-1}	0	0	0
Aislamiento A21 cultivado en medio 2	4	0	2×10^{-2}	0	0	0
	5	0	1×10^{-1}	0	0	0
	6	1×10^{-1}	2×10^{-1}	0	0	0

En el análisis de infectividad, a los 21 días del ensayo, a partir de las muestras de órganos tomadas de los animales sacrificados (riñones, hígado, bazo, pulmones, sangre y nódulos linfáticos) tanto del grupo tratado y los controles, no se obtuvo crecimiento bacteriano.

IV.8 Efecto residual del aislamiento A21 cultivado en medio 2

Considerando los resultados de CL₉₀ del aislamiento A21 cultivado en el medio 2, mostrados en la Tabla 9, se calculó la dosis para el tratamiento de los recipientes en los experimentos de cálculo de efecto residual (acápite III.13), siendo esta de 0,01701 mg/L.

En la tabla 11 se reflejan los valores de CL obtenidos con la cepa 266/2 9-VII-98 utilizada en este estudio como control. Con los resultados de CL₉₀ se calculó la dosis para el tratamiento de los recipientes (acápite III.13) siendo esta de 0,19512 mg/L

Tabla 11. Valores de concentraciones letales (CL) obtenidos con la cepa 266/2 9-VII-98

CL	Medio 2 (mg/L)
CL₁₀ LI-LS	0.00416 (0.00343-0.00482)
L₅₀ LI-LS	0.00952 (0.00876-0.01027)
CL₉₀ LI-LS	0.02168 (0.01930-0.02438)
CL₉₅ LI-LS	0.02662 (0.02346-0.03139)
CL₉₉ LI-LS	0.03944 0.03295-0.05005

LI: Límite inferior, LS: Límite superior

Con la mortalidad calculada cada 2 h en cada grupo de estudio, en el experimento de actividad larvica residual, se procedió al cálculo de los TL. Los TL₅₀, TL₉₀ y TL₉₅ entre la semana uno y la seis no se determinaron ya que a las 2 h de exposición de las larvas a A21 causó 100% de mortalidad para los tres grupos (recambio total, parcial y no recambio de agua).

En la Tabla 12 se muestran los TL₅₀, TL₉₀ y TL₉₅, con sus respectivos límites de confianza, desde la semana 7 hasta la semana 14 del experimento. Los valores de TL₅₀ menor y mayor obtenidos fueron de 0,134 y 9,251 h en las semanas 9 y 14 respectivamente para no

recambio. El valor de TL₉₀ menor se pudo apreciar en la semana siete para el tratamiento de recambio total con un valor de 1,204 h y en la semana 13 se evidenció para el tratamiento sin recambio de agua, un valor de 100,331 h, siendo el mayor de este grupo. En la semana siete se obtuvo el valor más pequeño de TL₉₅, resultando de 1,149 h para el tratamiento de recambio total, y en la semana 13 se apreció el mayor valor obtenido de TL₉₅, de 213,003 h para el grupo sin recambio de agua (Tabla 12). A partir del recambio 15 no se obtuvo valores de mortalidad significativos hasta después de las 24 h por lo que no se realizó el cálculo de los TL.

Los TL₅₀, TL₉₀ y TL₉₅ de mortalidad larvaria obtenida con la cepa 266/2 9-VII- 98, en la semana uno (sin recambio) fueron de TL₅₀ (LI-LS) 4,16 h (3,48-5,35); TL₉₀ (LI-LS) 8,38 h (7,28-11,26); TL₉₅ (LI-LS) 15,23 h (11,36-22,14) para los tres grupos (recambio total, parcial y no recambio de agua). En la segunda semana los tiempos letales 50, 90 y 95 (LI-LS) fueron de 4,05 h (3,41-5,24); 12,45 h (11,21-14,47) y 17,10 h (15,09-20,30) para el grupo de recambio total. Con el grupo de recambio medio se obtuvieron TL₅₀ (LI-LS) de 4,22 h (3,20-4,48), TL₉₀ (LI-LS) de 12,15 h (10,17-14,11) y TL₉₅ (LI-LS) de 16,15 h (14,23-19,21). Con el grupo de no recambio de agua los TL (LI-LS) fueron de 3,45 h (3,15-4,09) (TL₅₀), 10,59 h (9,00-13,01) (TL₉₀) y 14,56 h (12,25-18,05) (TL₉₅). A partir del tercer recambio no se obtuvieron valores de mortalidad significativos hasta después de las 24 h por lo que no se realizó el cálculo de los tiempos letales.

Tabla 12. Valores de TL₅₀, TL₉₀ y TL₉₅ con sus respectivos límites de confianza, determinados para el aislamiento A21 contra *Ae. aegypti*, utilizando en diferentes grupos de recambio de agua (total, parcial, y no recambio).

# de R	R. de agua	Tiempos letales (h)		
		TL ₅₀ (LI-LS)	TL ₉₀ (LI-LS)	TL ₉₅ (LI-LS)
7	Total	0,228 (0,002 – 1,040)	1,204 (0,117 – 1,502)	1,149 (0,206 – 2,003)
	Parcial	0,325 (0,006 – 1,209)	1,146 (0,222 – 2,179)	2,038 (0,590 – 2,406)
	No r	0,345 (0,007 – 1,200)	1,217 (0,258 – 2,245)	1,739 (1,082 – 2,504)
8	Total	0,449 (0,057 – 1,308)	1,599 (1,111 – 2,443)	2,292 (1,307 – 4,004)
	Parcial	0,477 (0,062 – 1,350)	2,100 (1,185 – 2,541)	2,436 (1,441 – 4,157)
	No r	0,49 (0,062 – 1,380)	2,144 (0,793 – 2,592)	2,500 (1,471 – 4,192)
9	Total	0,228 (0,127 – 0,365)	2,350 (1,374 – 3,051)	3,583 (3,034 – 5,168)
	Parcial	0,592 (0,365 – 1,267)	5,060 (4,038 – 6,157)	9,299 (8,128 – 11,090)
	No r	0,134 (0,067 – 0,235)	1,145 (0,717 – 2,132)	2,105 (1,376 – 3,112)
10	Total	1,325 (1,056 – 2,012)	6,079 (4,340 – 6,500)	8,579 (7,496 – 10,249)
	Parcial	1,163 (1,316 – 1,430)	4,983 (4,283 – 6,166)	7,528 (6,510 – 9,123)
	No r	1,093 (0,519 – 1,293)	3,368 (2,404 – 4,035)	4,483 (4,061 – 5,489)

R o r. recambio; LI: límite inferior; LS: límite superior

Tabla 12. Valores de TL₅₀, TL₉₀ y TL₉₅ con sus respectivos límites de confianza, determinados para el aislamiento A21 contra *Ae. aegypti*, utilizando en diferentes grupos de recambio de agua (total, parcial, y no recambio). Continuación.

# de R	R. de agua	Tiempos letales (h)		
		TL ₅₀ (LI-LS)	TL ₉₀ (LI-LS)	TL ₉₅ (LI-LS)
11	Total	1,163 (1,306 – 1,444)	5,028 (4,255 – 6,311)	8,014 (6,479 – 9,375)
	Parcial	2,228 (1,472 – 2,204)	8,307 (7,351 – 7,368)	12,375 (10,552 – 14,055)
	No r	0,58 (0,416 – 1,179)	2,509 (2,338 – 3,226)	4,199 (3,361 – 5,266)
12	Total	0,221 (0,043 – 1,007)	9,139 (5,190 – 14,247)	25,195 (15,248 – 42,141)
	Parcial	1,135 (0,205 – 2,012)	29,078 (20,229 – 44,364)	82,501 (53,384 – 52,303)
	No r	0,148 (0,025 – 0,444)	6,256 (3,257 – 10,177)	17,015 (9,511 – 28,515)
13	Total	1,429 (1,114 – 2,393)	20,486 (14,406 – 29,215)	43,584 (30,511 – 66,116)
	Parcial	5,260 (3,351 – 7,437)	75,436 (55,459 – 11,115)	160,489 (109,504 – 67,135)
	No r	7,369 (4,654 – 9,555)	100,331 (72,407 – 51,317)	213,003 (142,101 – 68,361)
14	Total	4,100 (3,233 – 5,071)	21,435 (18,141 – 26,020)	35,270 (29,375 – 44,007)
	Parcial	7,148 (6,193 – 9,001)	41,412 (35,216 – 49,351)	68,141 (57,169 – 84,194)
	No r	9,251 (7,308 – 10,492)	51,278 (44,092 – 61,203)	84,375 (70,113 – 04,392)

R o r. recambio; LI: límite inferior; LS: límite superior

La mortalidad larvaria determinada a las 24, 48 y 72 h de exposición a A21 cultivado en medio 2 no mostró diferencias significativas ($P>0,05$) hasta la semana 14, entre los diferentes tratamientos de recambio de agua. Sin embargo, en el total de mortalidad a las 24 h del experimento, se obtuvieron diferencias significativas entre las semanas 8 y 12 ($P=0,003$), 8 y 13 ($P=0,003$), 9 y 12 ($P=0,003$), 9 y 13 ($P=0,003$), 10 y 12 ($P=0,003$), 11 y 13 ($P=0,006$). De manera similar a las 48 h, se encontraron diferencias significativas, entre las semanas 8 y 12 ($P=0,045$), 8 y 13 ($P=0,045$), 10 y 12 ($P=0,045$), 10 y 13 ($P=0,045$), 11 y 13 ($P=0,050$).

En la figura 17 A se observan los porcentajes de mortalidad larvaria de *Ae. aegypti* tratados con el aislamiento A21 con recambio total, parcial y no recambio de agua a las 72 h de exposición en cada semana. La mortalidad larvaria a las 72 h se mantuvo entre 98 y 100% para los tres niveles de recambio de agua hasta la semana 14, a partir de la cual se observó una disminución en la mortalidad sin diferencias significativas en cuanto a los tratamientos de recambio de agua. Sin embargo, a partir de las semanas 25 hasta 29 la mortalidad larvaria disminuyó de manera significativa ($P<0,05$).

Con la cepa 266/2 9-VII- 98 se alcanzó 100% de mortalidad durante las primeras 2 semanas en los tres grupos. En las semanas cuarta y quinta comenzó a disminuir la mortalidad larvaria con diferencias significativas ($P\leq 0,002$) en relación al recambio de agua. Para la sexta semana no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad larvaria del grupo de recambio total y recambio medio de agua ($P=0,424$) pero si entre esos dos grupos y el de no recambio ($P=0,000$). En la séptima semana se obtuvieron diferencias significativas ($P<0,05$) en la mortalidad larvaria de los tres grupos (Fig.17 B).

En las tres primeras semanas del experimento no se obtuvo diferencia significativa ($P>0,5$) en la mortalidad larvaria obtenida tanto con A21 como con la cepa 266/2 9-VII- 98. Sin embargo, a partir de la cuarta semana se presentaron diferencias ($P\leq 0,025$).

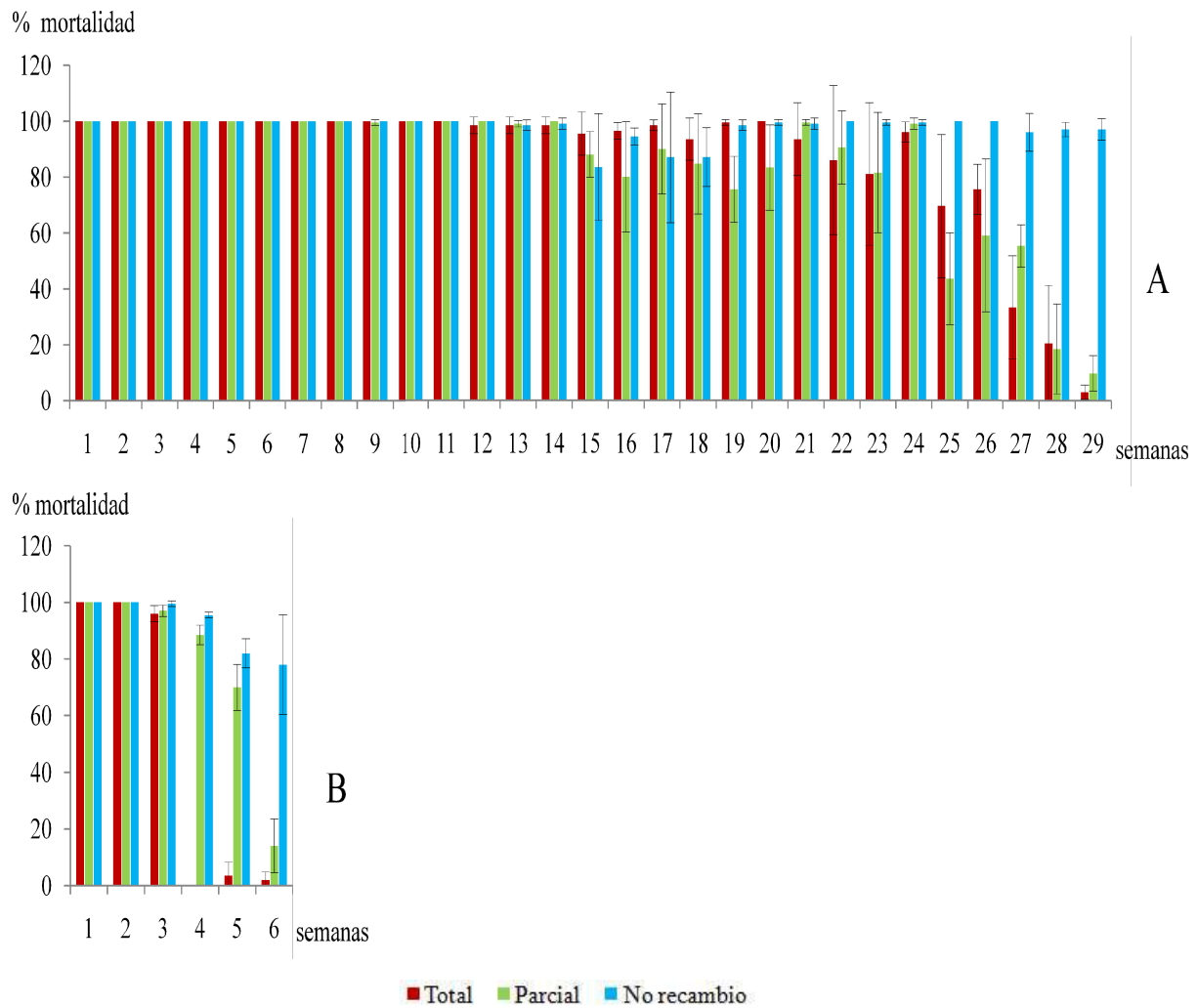


Figura 17. Porcentajes de mortalidad larvaria de *Ae. aegypti* y DE en los diferentes grupos de recambio de agua por tratamiento con *B. thuringiensis*.

A: aislamiento nativo A21.

B: 266/2 9-VII- 98

Discusión

V. DISCUSIÓN

V.1 Selección de aislamientos nativos de *B. thuringiensis* en cuanto actividad larvicida contra *Ae. aegypti*, factores de virulencia y citotoxicidad

En este trabajo se describe la búsqueda, identificación y caracterización de aislamientos nativos de *B. thuringiensis* con alto potencial insecticida sobre *Ae. aegypti*, principal vector en Las Américas de dengue, chikunguya, Zika y fiebre amarilla (3). La primera etapa en cualquier estudio que tenga como objetivo evaluar el potencial de *B. thuringiensis* para el control de insectos es la explotación de la biodiversidad natural mediante la búsqueda de aislamientos nativos con propiedades insecticidas sobre la especie diana (27, 28, 31, 32, 144).

Esta investigación, al igual que otras realizadas en el control de plagas agrícolas (119, 123, 145), pone de manifiesto que el ecosistema de Cuba es un importante reservorio de *B. thuringiensis*, tanto por la abundancia como por la diversidad de los aislamientos presentes. Un índice que refleja dicha riqueza es el porcentaje de aislamientos de *B. thuringiensis* obtenido en el presente estudio. Carreras *et al* obtuvieron un elevado número de aislamientos de *B. thuringiensis* a partir de diversas muestras obtenidas del archipiélago cubano (27). La presencia de esta bacteria en los suelos de Cuba puede estar favorecida por las características de los suelos ferralíticos con predominio de minerales, contenido de hierro libre que no excede 3% y pH que no sobrepasa el valor de 7 (119, 146).

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas y en cuanto al aspecto/coloración/ hemólisis de las colonias en agar sangre, posibilitaron la agrupación de los aislamientos dentro del grupo *B. cereus*. La observación de cristales proteicos en la fase

de esporulación permitió la diferenciación de *B. thuringiensis* del resto de las especies pertenecientes al grupo *B. cereus* (especies cercanas filogenéticamente). Las escasas diferencias fenotípicas y genotípicas entre las especies *B. cereus* y *B. thuringiensis* ha sido previamente informada por otros autores (147) y recopilada en el Manual de Bergey de Sistemática de Archaea y Bacterias (67, 148).

Del total de aislamientos de *B. thuringiensis*, obtenidos en este estudio, 3,73% exhibieron una actividad larvicida contra *Ae aegypti* que provocó 100% de mortalidad. De manera similar, estudios realizados en lugares tan distantes como Arabia Saudita (71) y más cercanos a Cuba como Brasil (27) informaron bajos números de aislamientos con actividad contra este vector (1,56 y 0,24%, respectivamente). Cabe destacar la amplia variedad de aislados de *B. thuringiensis* informados en la bibliografía con actividad contra otros insectos- plagas (98, 145) no objeto de estudio en esta investigación. Además, en el ambiente natural, los aislados de *B. thuringiensis* no insecticidas a menudo son más prevalentes que sus contrapartes insecticidas (149, 150), por lo que se plantea que esta especie no debe considerarse solo como un patógeno de insectos sino como saprófito ambiental (71, 149). Esto explicaría el porcentaje restante de aislados de *B. thuringiensis* obtenidos en nuestro estudio que no presentó actividad contra dípteros.

En los once aislamientos nativos con CL_{90} menores que la cepa control 266/2 9-VII-98 se encontraron patrones de proteínas similares, las que confieren elevada actividad contra dípteros: Cry4 (135 kDa), Cry11 (78 kDa), Cry10 (66 kDa) y Cyt (27 kDa) (15, 28, 83, 120, 151). Además, se identificó en los aislamientos un megaplasmido por encima del ADN cromosomal que de acuerdo a los genes detectados en estos (*Cry4Aa*, *Cry4Ba*, *Cry10Aa*, *Cry11Aa*, *Cyt1Aa*, *Cyt2Ba* y *Cyt1Ca*), puede sugerir la presencia del plásmido pBtoxis. Este plasmido, porta dicha información genética y ha sido descrito para cepas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* con actividad contra dípteros (74, 78). Por otra parte, el aislamiento C17 que mostró patrones proteicos diferentes al resto de los aislamientos, con menor expresión de proteínas responsables de la actividad contra dípteros, ausencia de plásmidos por encima del ADN cromosomal, un patrón genético diferente, presentó, como es de esperar, menor actividad larvicida ($CL_{90} > 266/2$ 9-VII-98). En el estudio realizado

por Ibarra *et al* (2003), a partir de aislados de suelos de México, Brasil y Colombia, con actividad larvicida contra mosquitos, obtuvieron resultados similares (28). Esto sugiere la variabilidad de combinaciones de genes *cry* con actividad contra mosquitos existente en la naturaleza.

Los estudios genéticos permitieron también la diferenciación entre los aislamientos. La amplificación del gen *cry 10* se obtuvo en los 12 aislamientos, mientras que la variante genética de *cry10* (*cry10Aa*), solo se obtuvo en la cepa control IPS-82 y en los aislamientos M29 y R84. Según la literatura científica revisada solo se ha descrito para el gen *cry10* la variante genética *cry10Aa* en aislados activos contra dípteros (27, 79, 83). Por tanto, la amplificación de una secuencia del gen *cry10* en aislamientos donde no está presente la variante *cry10Aa* permite sugerir la posibilidad de que otras variantes de este gen estén presentes en el resto de los aislamientos. De igual manera, la amplificación en el aislamiento A21 de los genes *cry11Aa*, *Ba* y *Bb* con el cebador 6 pero no con el cebador 11 nos sugiere la presencia de variantes genéticas que pueden diferir del resto los aislamientos con elevada actividad larvicida. Se conoce que los aislamientos de *B. thuringiensis* presentan 80% de sus genes conservados; y que la variabilidad genética de esta especie viene dada por la adquisición de genes esenciales y no esenciales de otros microorganismos, debido a que esta especie posee un pangenoma abierto. Entre las subespecies de *B. thuringiensis* se pueden encontrar semejanzas filogenéticas aunque también pudieran manifestarse algunas diferencias las cuales se han determinado fundamentalmente mediante secuenciación (78). Las pocas diferencias encontradas en los 11 aislamientos con elevada actividad larvicida sugieren realizar la secuenciación del genoma cromosomal y plasmidico. Esto posibilitaría encontrar diferencias entre aislamientos provenientes de una misma muestra (R84, R85, R87 y R89) y robustecer los estudios de diferenciación y caracterización genética de los aislamientos.

La elevada actividad larvicida contra mosquitos de las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* se atribuyen a complejas interacciones entre sus proteínas (14). Las combinaciones: Cry4Aa y Cry4Ba (14, 152), Cry4Aa y Cry11Aa, Cry4Ba y Cry11Aa , Cry10Aa y Cyt2Ba (14), Cry10Aa con Cyt1Aa(14, 83). Cyt2Ba con Cry4Aa, Cyt1Aa y Cry11Aa (14), generan

una actividad contra *Ae. aegypti* superior al resultado que se consigue con la suma de los efectos individuales. La detección de las variantes genéticas que codifican para las proteínas Cry y Cyt en los aislamientos: A21, A51, M29, L95, L910, R84, R85, R87, R89, U81, X48; nos permite inferir la posible presencia de estas combinaciones proteicas, lo que justificaría la elevada actividad larvicida de los aislamientos.

Contar con aislamientos con un mayor número de proteínas Cry y Cyt activas contra dípteros retrasaría aún más el desarrollo de la resistencia debido a que las proteínas Cyt actúan como receptores adicionales de las proteínas Cry e incrementan la actividad de estas (14, 153). Se notifica resistencia en campo y a nivel de laboratorio a *B. thuringiensis* en larvas de *Cx. quinquesfasciatus* y *Cx pipiens* (60, 93). Sin embargo, para *Ae. aegypti* solo se alcanzan niveles insignificantes de resistencia a nivel de laboratorio. En ambos géneros de dípteros la resistencia se comporta inestable y en ausencia de presión de selección se revierte a 50% transcurridas tres generaciones (14, 60, 93).

Un estudio realizado en el laboratorio muestra que larvas de *Cx. quinquesfasciatus* sometidas a presión de selección con proteínas Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa (individuales o en combinación) aisladas de *B. thuringiensis* desarrollaron niveles de resistencia variables y resistencia cruzada. En cambio, en presencia de concentraciones moderadas de Cyt1Aa la resistencia disminuye, manteniéndose en la cepa resistente niveles de sensibilidad comparable con la cepa sensible (tipo salvaje) (14). Por tanto, la detección de los genes que codifican para las proteínas Cyt1A, B y Cyt 2 en los aislamientos A21, A51, M29, L95, L910, R84, R85, R87, R89, U81, X48 predicen una baja resistencia en el terreno a productos elaborados a base de estos aislamientos.

Una vez dilucidada la interrogante de cuáles eran los aislados con mayor actividad contra larvas de *Ae. aegypti*; la selección de aquellos que presentaran baja toxicidad contra macrófagos es una condicionante primordial en aras de obtener precandidatos promisorios para el desarrollo de biolarvicida. Los macrófagos son efectores esenciales de la respuesta del sistema inmune contra los microorganismos. La habilidad que poseen algunas especies del género *Bacillus* como *B. cereus* (especie cercana filogenéticamente a *B. thuringiensis*)

de eliminar las células de macrófagos explica la persistencia y diseminación de las cepas virulentas en mamíferos (154). En diez de los aislamientos se obtuvieron concentraciones citotóxicas media por encima de los valores obtenidos con los controles (IPS-82, 266/2 9-VII-98), lo que indica seguridad en el uso de estos aislamientos en futuras formulaciones.

En resumen, se continuó el estudio con los aislamientos: A21, A51, L95, L910, M29, R84, R85, R87, R89, U81. La selección estuvo dada por: elevada actividad larvicida ($CL_{90} < CL_{90}$ 266/2 9-VII-98), mayor número de proteínas con actividad contra dípteros, diversidad de genes *cry* y *cyt*; y plásmido por encima del ADN cromosomal que favorecen la actividad larvicida contra *Ae. aegypti*; además de menor citotoxicidad contra macrófagos peritoneales que los controles IPS-82 y 266/2 9-VII-98.

V.2 Influencia de diferentes factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* sobre la actividad larvicida de los aislamientos nativos.

Resulta alentador contar con aislamientos nativos de *B. thuringiensis* con combinaciones de genes *cry* y *cyt* que pueden estar codificadas por el plásmido pBtoxis, con expresión de proteínas altamente tóxicas contra dípteros y menor citotoxicidad contra macrófagos que las cepas utilizadas como referencia (IPS-82 y 266/2 9-VII-98). Sin embargo, la influencia de factores (incremento de la temperatura, presencia de cloro, sales y materia orgánica) asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* sobre *B. thuringiensis*, constituye otro aspecto importante a considerar.

Según la literatura consultada, la actividad insecticida de *B. thuringiensis* puede ser afectada por diversos factores tales como: temperatura y calidad del agua de los criaderos, entre otros (154, 155).

En Cuba el promedio anual de temperatura ha aumentado desde 1951, y en 1997 y 1998 alcanzó los valores más altos a lo largo de la historia. En general, el promedio de temperatura de los años posteriores a 2000 fue el más cálido de todos los registros climáticos disponibles (156, 157). En la estación seca aumentó +2,0°C y en la lluviosa

(junio-agosto): +0,8°C, con un mayor porcentaje de días con un máximo temperatura $\geq 30^{\circ}\text{C}$ (158).

La variabilidad climática influye en la dinámica de la población de vectores, y en la distribución y la transmisión de enfermedades (159, 160). Un incremento de las precipitaciones y de las temperaturas favorece la proliferación de los vectores y por tanto, se genera más transmisión de enfermedades (161, 162). Bajo estas condiciones, es importante considerar la utilización de biolarvicidas que mantengan una alta actividad a valores de temperatura superiores al promedio anual.

Siete aislamientos nativos aumentaron su actividad cuando la temperatura se incrementó de 25 a 30°C y cinco aislamientos de 30 a 35°C. Otros autores informan un aumento de la actividad larvicida de *B. thuringiensis* var. *israelensis* sobre larvas de *Chironomus kiiensis*, con una variación de temperatura de 15 a 30°C (98). Sin embargo, Mulla *et al* en 1990 no obtuvieron diferencias en la actividad larvicida de *B. thuringiensis* (Vectobac AS12, ABG-6164 y AC-513695) contra *Cx. quinquesfasciatus* con semejantes variaciones de temperatura del agua (163). Con un incremento de la temperatura de 25 a 30°C se obtuvo una reducción en CL₉₀ en los aislamientos A21, A51, R84, R85, R87, R89 y U81. Este fenómeno podría estar condicionado a que con un incremento de la temperatura se aceleran los procesos metabólicos y el crecimiento de las larvas de *Ae. aegypti*, lo que conlleva al incremento de sus necesidades alimenticias. En consecuencia, la larva necesita de una alimentación rápida y por tanto, ingiere una mayor cantidad de toxinas Cry y Cyt (98, 164), esporas y células vegetativas de *B. thuringiensis* presentes en el medio.

Con un incremento mayor de la temperatura (25–35°C) se obtuvo reducción de la expresión de las toxinas Cry y Cyt de los aislados A21, A51 y U81. Como consecuencia de la baja expresión de estas proteínas en nuestros aislamientos disminuiría las interacciones proteicas Cry4 y Cry11, Cry10 y Cyt (14, 83) y Cyt con Cry4, y Cry11Aa (14), lo que podría justificar la disminución significativa de la actividad larvicida (U81) y el incremento de la relación CL₉₅/CL₅₀ (eficiencia) en los aislamientos A21 y A51.

La degradación de las proteínas Cry debido al incremento de la temperatura se notifica en estudios realizados por Zhang *et al* (2015) y He *et al* (2017). Zhang *et al* demostraron que el incremento de la temperatura fue el factor de mayor influencia en la degradación de la proteína Cry1Ac (165). Así mismo, He *et al* visualizaron una reducción de las proteínas Cry a 50°C y demostraron que la micro-encapsulación de los cristales proteicos ejerce un efecto protector al incremento de la temperatura (155).

Como es conocido en Cuba se produce un incremento mayor de las temperaturas en los meses de verano (156), por lo que resultó útil el estudio de la expresión de las proteínas Cry y Cyt de los aislamientos a 40°C. La reducción de la expresión de las proteínas Cry y Cyt en los aislamientos nativos y cepas controles a esta temperatura es un importante aspecto a considerar en la conservación de las formulaciones acuosas de *B. thuringiensis* (fundamentalmente a temperaturas superiores a 40°C).

Aún con la disminución de la expresión de las proteínas Cry y Cyt a 35°C con el incremento de la temperatura, los aislamientos A21, A51, R84, R85 mantuvieron una actividad larvicida superior a la cepa 266/2 9-VII-98, lo que los hace excelentes candidatos para el desarrollo de formulaciones mejor adaptadas a los efectos del cambio climático.

El incremento de la temperatura aumenta la incidencia de enfermedades transmitidas por el agua y los alimentos (158). El cloro es el desinfectante de agua doméstico más utilizado en para prevenir estas enfermedades (166). Los principales sitios de reproducción de *Ae. aegypti* lo constituyen los recipientes utilizados para almacenar agua (38) usualmente tratados con cloro. Por lo tanto, un biolarvicida ideal debe mantener su actividad larvicida en agua clorada.

Los resultados de los bioensayos en agua clorada mostraron un aumento significativo de la CL₅₀ y CL₉₀, lo que evidencia una disminución de la actividad larvicida de *B. thuringiensis* en agua clorada. Resultados similares fueron obtenidos por Rydzanicz *et al* en 2010 donde informan que la contaminación del agua por la presencia de cloro inhibió la actividad larvicida (59). También, Sinigre *et al* obtuvieron una clara correlación inversa entre la

cantidad de cloro en el agua y la mortalidad larval (167). Sin embargo, en los aislamientos nativos a pesar de la disminución de la actividad larvicida no se observó una reducción en la intensidad de las bandas correspondientes a las toxinas Cry y Cyt en geles de poliacrilamida. Al parecer, el efecto negativo del cloro no se produce sobre la expresión de las proteínas. Esto podría deberse a la poca selectividad que muestra este oxidante sobre diferentes componentes celulares (168): desactiva los sitios enzimáticos, disminuye las funciones biológicas de las proteínas (59) y produce efectos nocivos en el ADN (169). Además, las aguas cloradas afectan la permeabilidad de la membrana citoplasmática (170), lo que puede provocar la muerte celular e inhibir el crecimiento de *B. thuringiensis* (171).

Las diferentes capas de proteínas presentes en la espora actúan como barrera protectora contra los ataques químicos, incluidos los agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el hipoclorito de sodio, el dióxido de cloro o el ozono (172). En presencia de productos liberadores de cloro se produce pérdida de refractividad, separación de las capas de la corteza de las esporas, descarga extensa de Ca^+ , ácido dipicolínico y ADN y finalmente la lisis (173). Sin embargo, las esporas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* son más resistentes al cloro que las esporas de *B. anthracis* o *B. cereus* (171). Tal vez, debido esta resistencia, no todas las esporas se afectaron por el efecto del cloro y un número considerable de estas se mantuvieron viables en los aislamientos nativos, lo que posibilitó el efecto larvicida. A pesar de la disminución de la actividad larvicida en presencia de cloro los aislamientos A21, A51, L910 y R85 presentaron una mayor actividad que la cepa de control 266/2 9-VII-98.

Se conoce que los biolarvicidas cuyo ingrediente activo son cepas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* presentan baja actividad en criaderos ricos en materia orgánica (57). En seis aislamientos y en las cepas controles la actividad larvicida se afectó de forma significativa. Esta disminución puede estar dada porque la materia orgánica propicia que las larvas diversifiquen la fuente de alimento y en consecuencia ingieran una menor concentración de toxinas, esporas y células vegetativas de *B. thuringiensis*. Adicionalmente, las proteínas Cyt liberadas al medio por los aislamientos pueden unirse de manera irreversible a la materia

orgánica impidiendo de esta forma su función sinérgica en conjunto con las proteínas Cry. Este efecto de interacción de las proteínas Cyt con la materia orgánica se informó por Tetreau *et al* en 2012 (96). A pesar de que la actividad larvicida de los aislamientos A21, A51, L910, R84 y U81 se afectó por la presencia de materia orgánica, estos presentaron menores CL₅₀ y CL₉₀, que la cepa 266/2 9-VII-98.

Por otra parte, el efecto del NaCl sobre la actividad larvicida de *B. thuringiensis* se ha estudiado por diferentes autores obteniendo como resultado comportamientos diferentes. En este estudio no se manifestó efecto negativo del NaCl sobre la actividad larvicida de los aislamientos ni de las cepas utilizadas como control. En los aislamientos R85, R87, R89 y U81 y en la cepa 266/2 9-VII-98 se obtuvo un incremento significativo de la actividad larvicida, lo cual puede estar dado por características específicas de cada aislamiento. Resultados similares fueron obtenidos por Dawson *et al* en 2019, no obtuvieron reducción de la actividad larvicida de *B. thuringiensis* en presencia de Na⁺ y Cl⁻ (174). Se conoce que en algunas cepas de *B. thuringiensis* el NaCl favorece el proceso de esporulación y producción de delta-endotoxinas (102) lo que conlleva a una mayor actividad. Sin embargo, otros estudios como el de Jude *et al* informan una reducción significativa de la actividad larvicida de *B. thuringiensis* contra *Ae. aegypti* en presencia de NaCl (175).

Como conclusión de este acápite podemos plantear que aún con la degradación de algunos de sus principales factores de virulencia a 35°C, los aislamientos nativos A21, A51, R84, R85 y U81 mostraron mayor actividad larvicida que la cepa 266/2 9-VII-98 en presencia de diferentes factores (temperatura, presencia de: cloro, NaCl y materia orgánica), lo que podría ser útil para garantizar una mayor estabilidad de su actividad larvicida en criaderos naturales de *Ae. aegypti* en Cuba.

A pesar de los resultados alentadores obtenidos es necesario resaltar la necesidad de llevar a cabo bioensayos para evaluar la influencia de la luz UV sobre la actividad larvicida de estos aislamientos. Se conoce que una de las debilidades de las formulaciones de *B. thuringiensis* cuando son aplicadas en terreno se debe a la degradación de las toxinas producto de la luz UV (136, 176, 177). Por otra parte, aún cuando en nuestro país no se han encontrado

diferencias de susceptibilidad a *B. thuringiensis* entre las poblaciones de terreno y las cepas de laboratorio de *Ae. aegypti* (19, 23) es imprescindible evaluar la actividad larvicida de aislamientos nativos en poblaciones de *Ae. aegypti* de terreno.

V.3 Selección de aislamientos libres de betaexotoxina

La obtención de aislamientos nativos libres de beta-exotoxinas es un punto clave en nuestro estudio. Algunas cepas de *B. thuringiensis* producen betaexotoxinas, toxinas termoestables, secretadas en el sobrenadante de los cultivos, de amplio espectro de acción. Como consecuencia del efecto teratógeno que pueden provocar las mismas sobre células de mamíferos, y su acción inespecífica sobre diferentes órdenes de insectos, la OMS prohíbe la utilización de productos que las contengan (87).

Se describen varios métodos para la determinación de beta-exotoxinas (Bioensayos, ELISA, PCR, cromatografía) (178), de los cuales la cromatografía de fase reversa es muy utilizada, por ser un procedimiento rápido (179). Sin embargo, la cromatografía tiene como desventaja el riesgo de proporcionar resultados falsos negativos, lo que podría conllevar a la exclusión de aislamientos tóxicos (132, 178). Por este motivo, los bioensayos continúan siendo el método más utilizado (132, 178, 180). Los ensayos se describen principalmente en *Musca domestica* (132, 178), pero el trabajo con esta especie resulta bastante engorroso (178) y la dieta que requiere, basada fundamentalmente en leche en polvo (132), encarecería el estudio. Por esta razón, se realizaron modificaciones al bioensayo descrito por Mac Innes y Bouwer (132), y se utilizó a *Ae. aegypti* como especie diana. Se obtuvo una elevada mortalidad tanto con el control positivo como con el aislamiento A51. La presencia de esta toxina se corroboró en el aislamiento A51 al observar máximos y mínimos de absorción a 260 y a 230 nm, respectivamente, lo que se corresponden con lo informado para esta toxina (133). La presencia de esta toxina termoestable en el aislamiento A51 explica el incremento significativo de la actividad larvicida con aumento de la temperatura de 25-35°C, aun cuando se observa una reducción de la expresión de proteínas Cyt.

La ausencia de betaexotoxinas en los aislamientos A21, R84, R85 y U81 sugiere su potencialidad para el desarrollo de biolarvicidas. Sin embargo, se seleccionó A21 para continuar los estudios por presentar una mayor actividad larvicida en presencia de diferentes factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti*.

V.4 Medio de cultivo que favorece la expresión de los principales factores de virulencia y la actividad larvicida del aislamiento A21

Posterior a la selección del aislamiento adecuado (A21), es esencial contar con un medio de cultivo donde se obtengan mejores rendimientos en términos de: biomasa, expresión de proteínas Cry, Cyt y mayor actividad larvicida.

Un importante componente del medio de cultivo que favorece la esporulación y la producción de Cry y Cyt, son las sales (55). Los resultados obtenidos confirman que la presencia de sales de NaCl y MgSO₄ favorece el crecimiento vegetativo, la producción de esporas y cristales en el aislamiento A21. La adición en conjunto de sales ha sido informada previamente por varios autores con el objetivo de incrementar los rendimientos de delta-endotoxinas (109, 111, 181).

La acumulación de grandes cantidades de proteínas Cry y Cyt requieren de la producción estable de estas durante la fase estacionaria del crecimiento (182). La omisión de Mg²⁺ en el medio de cultivo disminuye el crecimiento y esporulación, pero el efecto más evidente ocurre en la disminución de la producción del cristal (104). En un estudio efectuado por Ozkan *et al* en 2003 (107) se obtuvo que la esporulación y producción de las toxinas Cry4B y Cry11A se favorece en presencia de Mg²⁺ en el medio de cultivo resultado que coincide con lo obtenido para el aislamiento A21.

Otras investigaciones demostraron que la utilización del agua de mar en el proceso de fermentación favorece el incremento de la producción de esporas y delta-endotoxinas (cristales) (113). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio donde la presencia de NaCl favoreció el proceso de esporulación y producción de delta-endotoxinas en el aislamiento A21. Además, se conoce que el Na⁺ no solo promueve un

mayor crecimiento del microorganismo, sino que también es importante en la formación de la pared de las esporas, las hace más resistente al calor y a los rayos UV (102).

El Fe es un mineral que se usualmente se utiliza en el medio de cultivo en forma de sulfato, se consume por los microorganismos de manera compleja y es esencial para llevar a cabo reacciones bioquímicas importantes como la síntesis de ATP (183). En altas concentraciones tiene un efecto inhibitor en la producción de endotoxinas y promueve la actividad de proteasas (183). En nuestro estudio el crecimiento bacteriano en presencia de esta sal se inhibió, lo que pudiera explicarse por su efecto negativo sobre la síntesis de los cuerpos paraesporales; resultados similares se informaron en investigaciones previas (55). Esta consecuencia negativa sobre el crecimiento y esporulación de A21 también se obtuvo en presencia de $ZnSO_4$. El Zn resulta tóxico para los microorganismos, pero en bajas concentraciones es un excelente inductor del crecimiento y formador de esporas y endotoxinas (184), sin embargo en algunas cepas ejerce una influencia negativa sobre la síntesis de las proteínas Cry (107).

En dependencia de la variedad de *B. thuringiensis* cambian los requerimientos nutricionales, por lo que se hace indispensable la selección de forma acertada del medio de cultivo para garantizar su efectividad. En todos los casos es importante que contengan una fuente de carbono, que suministre energía para los procesos anabólicos (106), pues la ausencia de la misma puede causar disminución en el proceso de esporulación, y por ende poca formación de toxinas proteicas (109).

En este trabajo los medios de cultivo utilizados presentaban como fuentes de carbono, glucosa (medio 1) y almidón de maíz (medio 2). Se conoce que de la fuente de carbono del medio depende el factor conocido como represión catabólica. Este proceso consiste en la inactivación de ciertos operones que metabolizan los azúcares (como el operón lac), en favor de la utilización de glucosa cuando esta u otras fuentes de carbono se encuentran en altas concentraciones. Un exceso de carbono no solo ocasiona una represión catabólica sino que también inhibe la producción de esporas, muy relacionadas con la síntesis de proteínas Cry (112). El medio de cultivo que contribuyó a un mayor crecimiento bacteriano fue el

medio 2 con almidón de maíz. Similares resultados se obtuvieron por Zouari en 2007 y refieren que el almidón de maíz presenta menor regulación represiva de la producción de toxina en comparación con la glucosa (185).

Las fuentes de nitrógeno utilizadas en los medios de cultivo fueron extracto de levadura (medio 1) y levadura torula (medio 2), requisito indispensable para el crecimiento, esporulación y síntesis de las proteínas, por sus aportes en vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento (67).

El pH es otro factor que podría variar según la composición del medio de cultivo. En este estudio durante la fase exponencial del crecimiento se obtuvo una reducción del pH tanto en el medio 1 como en el medio 2. Sin embargo, en la fase estacionaria de crecimiento el pH en los dos medios de cultivo se mantuvo en valores estables. Awad *et al*, 2015 informaron resultados similares durante la fase exponencial del crecimiento. Esto podría estar dado por el consumo acelerado de la fuente de carbono que conlleva a una reducción del pH (110). Sin embargo, estos autores refieren un incremento del pH en la fase estacionaria (110).

En el medio 2 se obtuvo un mayor crecimiento del microorganismo en relación al medio 1. El almidón constituye una fuente de carbono, se metaboliza lentamente y de forma continua, ofreciendo la cantidad y disponibilidad de energía óptima para la síntesis del cristal proteico. Durante este proceso, el pH se mantiene ligeramente alcalino, de forma estable, lo que contribuye a la acción de las proteasas (186). La producción de esporas y cristales se incrementa en la fase estacionaria del crecimiento (110). Con el medio 2 (levadura torula y almidón) se alcanza en menor tiempo esta fase y se extiende a 48 h.

De la composición del medio de cultivo también depende la expresión de las toxinas proteicas (113). El aislamiento A21 de *B. thuringiensis* mostró una expresión diferencial de proteínas en dependencia del medio de cultivo, obteniéndose una mayor expresión de los principales factores de virulencia con el medio 2. La mayor actividad larvicida de *B. thuringiensis* está en función de una mayor producción de endotoxinas (principales factores

de virulencia) durante la fase estacionaria de crecimiento (110, 113). De igual manera, con A21 cultivado en medio 2 se obtuvo mayor actividad larvicida, lo que coincide con una mayor expresión de toxinas. Adicionalmente, se conoce que el almidón de maíz (ingrediente del medio 2) estimula la ingestión de alimentos por parte de la larva y de esta manera se facilita el consumo de toxinas Cry y Cyt (135), por lo que la presencia de este compuesto pudo ejercer una acción positiva sobre la actividad larvicida de A21.

En el medio 2, compuesto por levadura torula, almidón de maíz y suplementado con las sales de NaCl y MgSO₄, se favoreció la expresión de los principales factores de virulencia y actividad larvicida del aislamiento A21, lo que sugiere su utilización en el desarrollo de futuras formulaciones que contengan como ingrediente activo dicho aislamiento.

Los resultados obtenidos con este medio sientan pautas que facilitan la optimización de las condiciones de cultivo en etapas posteriores. Además, estudios de metabolómica esclarecerían los mecanismos que favorecen la producción de toxinas (cry y cyt) y la esporulación en el aislamiento A21. Estos estudios podrían contribuir a alcanzar un mayor rendimiento durante el proceso fermentativo.

V.5 Toxicidad/ patogenicidad (modelo biológico *Rattus norvegicus*, cepa Wistar) aguda oral del aislamiento A21

Teniendo en cuenta la elevada actividad contra larvas de *Ae. aegypti* del aislamiento A21 y que los principales sitios de cría de *Ae. aegypti* lo constituyen recipientes utilizados para el almacenamiento de aguas de consumo humano (38, 39) nos propusimos la evaluación de la inocuidad del aislamiento A21 cultivado en medio 2.

En el ensayo realizado para evaluar la toxicidad/patogenicidad de A21 cultivado en medio 2 no se encontraron diferencias entre los animales tratados y no tratados. Resultados similares fueron informados por Bishop *et al* (1999) (187) y Berlitz *et al* (2012) (188) después del tratamiento oral de ratones con *B. thuringiensis*. De igual manera, en estudios realizados por Mancebo *et al* (2003) con *Rattus norvegicus* se obtuvieron resultados semejantes (137). El aclaramiento de *B. thuringiensis* en heces se obtuvo a los tres días de

administrado el aislamiento A21 cultivado en medio 2. Estos resultados coinciden con lo informado por Mancebo *et al* (2003) en cuanto a la eliminación rápida de *B. thuringiensis* (137).

A los 21 días de iniciado el estudio, después de realizado el sacrificio de las ratas, no se obtuvo crecimiento bacteriano en las muestras analizadas lo que confirma la poca diseminación del aislamiento A21 al ser administrado por vía oral. La poca patogenicidad de *B. thuringiensis* var. *israelensis* administrado por vía oral en ratas fue demostrada en 2003 y 2011 por Mancebo *et al* (137, 189). Se plantea la hipótesis de que la poca distribución sistémica de *B. thuringiensis* se debe a que este microorganismo queda confinado en el tracto gastrointestinal sin colonizarlo y es eliminado posteriormente a través de las heces (137, 188). Los principales factores de virulencia (Cry) de *B. thuringiensis* requieren de pH alcalinos para ejercer su mecanismo de acción (15, 190) y el pH del tracto gastrointestinal de los mamíferos no ofrece estas condiciones lo que provoca la degradación y expulsión de estas proteínas (188). Los resultados obtenidos en el ensayo realizado, bajo condiciones experimentales, evidencian la no toxicidad / patogenicidad de A21 cultivado en el medio 2, lo que sugiere la posible utilización de este aislamiento como ingrediente activo de futuras formulaciones.

V.6 Actividad residual de A21 cultivado en medio 2

Los depósitos de almacenamiento de agua para el consumo humano representan los principales sitios de cría de *Ae. aegypti* en Cuba (38). El constante recambio de agua en los mismos conlleva a la eliminación del principio activo de los biolarvicidas, por lo que quedan expuestos a la re-infestación (191). Los programas de control de vectores a menudo no cuentan con los recursos o el personal necesario para la revisión de viviendas y el tratamiento de los almacenamientos de agua a intervalos frecuentes, por lo que se hace necesario contar con biolarvicidas con efecto residual para el control de mosquitos (191).

Los resultados de los TL muestran que el aislamiento A21 cultivado en medio 2 ejerce su actividad larvicida en menor tiempo que la cepa 266/2 9-VII-98 cultivada en iguales

condiciones. Estos tiempos letales obtenidos con el aislamiento A21, también resultaron menores que los obtenidos por Sukesí *et al* en 2019 al realizar tratamiento de las larvas de *Ae. aegypti* con una suspensión de *B. thuringiensis* (TL₅₀ de 2 h) (192).

En este estudio se obtuvo poca actividad larvicida residual con la cepa 266/2 9-VII-98 y la misma se afectó por los recambios de agua en los recipientes. Sin embargo, con el aislamiento A21 cultivado en medio 2 se obtuvo una elevada mortalidad, prolongada en el tiempo, sin diferencias significativas ($P > 0,05$) en cuanto a los grupos de recambio. Esto puede estar dado por características propias del aislamiento. Tomas *et al*, 2002 plantean que las características fenotípicas y genotípicas (expresión de componentes estructurales y proteínas de adhesión a las superficies) específicas de cada bacteria intervienen en los mecanismos de adhesión a las superficies (193). Las esporas de *B. thuringiensis* tienen una elevada hidrofobicidad que les confiere un elevado potencial adhesivo a diversos materiales demostrado en el año 2015, por Gomes de León *et al* (194). Por tanto, se sugiere la posibilidad de adhesión de las esporas del aislamiento A21 a las superficies de los recipientes utilizados, lo que facilitaría la interacción entre las larvas - esporas y cristales. En larvas muertas infectadas con *B. thuringiensis*, ocurren los procesos de proliferación, esporulación y como resultado se liberan esporas y cristales al medio (195). La conducta alimentaria de las larvas es fundamental, ya que la persistencia del producto también puede estar relacionada con el reciclado de toxinas como consecuencia de la ingestión de larvas muertas (196).

Teniendo en cuenta que se utilizó un único tipo de recipiente, y considerando la capacidad de adhesión de los aislamientos de *B. thuringiensis* a determinadas superficies (194), se recomendaría realizar estudios de residualidad en diferentes recipientes.

En mayor medida la evaluación de la residualidad de *B. thuringiensis* se ha realizado con productos comerciales (24, 26, 54, 191, 197). En condiciones de laboratorio, Cetin *et al* informan una mortalidad de más de 96% con VectoMax® WSP (producto que contiene una mezcla de *B. thuringiensis* cepa AM65-52 y *L. sphaericus* cepa ABTS 1743) a los 24 días de iniciado el experimento, sin recambio de agua (54). Por otra parte, con VectoBac WDG

(formulación seca de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* cepa AM65-52, en gránulos dispersables en agua) a 16 mg/L se informó 100% de mortalidad y con VBC-60066 a 80 mg/L (Bactimos PT Larvicida biológico, gránulos extruidos e ingrediente activo *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, cepa AM65-52) 99,7% por 180 días (197). La frecuencia de uso del agua y recambio de esta puede alterar la disponibilidad del agente controlador. Lee y Zairi en 2005 obtuvieron con VectoBac® ABG 6511 decrecimiento de la actividad larvicida según la frecuencia de recambio de agua, arrojando valores de mortalidad para *Ae. aegypti* de más de 95% hasta 45 días con recambio de agua, 10 días más que para el tratamiento sin recambio. Según los autores, con poco recambio de agua las toxinas de *B. thuringiensis* están disponibles durante más tiempo, pero también se presenta un período de actividad subóptima más prolongado que en uno con alta frecuencia de recambio (198). Recientemente, González *et al* informan, actividad elevada del Bactivec® hasta los 6 recambios de agua. Posterior a esto, la mortalidad disminuyó de manera significativa directamente proporcional al tipo de recambio de agua realizado en los recipientes. Sin embargo, con el producto Rapidall NP3 (formulación en polvo, ingrediente activo *B. thuringiensis* var. *israelensis*) obtuvieron 100% de mortalidad larvaria durante 11 semanas, independientemente de la proporción de recambio de agua (26).

Ritchie *et al* en 2010 plantean que en estudios de campo y semicampo la actividad larvicida está influenciada por diversos factores que intervienen de manera negativa como son las precipitaciones, fluctuaciones de temperatura, presencia de materia orgánica y densidad larvaria (191). Como resultado de estos estudios, obtuvieron una mortalidad de 100% a 3 semanas de iniciado el experimento, tanto para VectoBac® WG como para la solución acuosa a base de *B. thuringiensis*. Después de este tiempo la eficacia y la residualidad de la solución acuosa se redujo (191). En Cambodia en un estudio en el que se aplicó como biolarvicida VectoBac® WG y VectoBac® (suspensión acuosa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* cepa AM65-52) se registró buena eficacia para ambos productos por 3 semanas, pero sin recambios de agua (199). De igual manera, Uragayala *et al* en 2018 obtuvieron una disminución de la actividad residual del Bactivec® en criaderos naturales *Ae. aegypti* a los 10-14 días de iniciado el tratamiento con una dosis de 1 ml/50 L sin recambio de agua (24).

Como conclusión podemos plantear que aún en presencia de diferentes recambios de agua se obtuvo una actividad residual superior con el aislamiento A21 a la de la cepa 266/2 9-VII-98 utilizada como control. Estos resultados avalan la selección de este aislamiento como posible candidato para el futuro desarrollo de biolarvicidas.

V.7 Consideraciones generales

Los estudios sobre el control larval de *Ae. aegypti* con *B. thuringiensis* llevados a cabo en Cuba, se circunscriben fundamentalmente a la cepa proveniente de la extinta Unión de repúblicas Socialistas Sovietica 266/2 9-VII-98 ingrediente activo del Bactivec® (19, 21-23, 94). Luego de un extenso periodo de trabajo, este constituye el primer estudio donde se identifican y caracterizan aislamientos nativos *B. thuringiensis* con elevada actividad larvicida contra dípteros. La presencia de los principales factores de virulencia contra *Ae. aegypti* descritos en esta especie y la menor toxicidad contra macrófagos de 10 de los aislamientos nativos de *B. thuringiensis* con relación a los controles, permitió su selección para continuar el estudio.

Adicionalmente, esta constituye la primera investigación que evalúa el efecto de algunos factores abióticos sobre la actividad larvicida de aislamientos nativos de *B. thuringiensis* procedentes de muestras de suelo. Cinco aislamientos mostraron mayor actividad larvicida que la cepa 266/2 9-VII-98 en presencia de diferentes factores (temperatura, presencia de: cloro, NaCl y materia orgánica), lo que podría ser útil para garantizar una mayor estabilidad de la actividad larvicida en criaderos naturales de *Ae. aegypti* en Cuba.

La detección de betaexotoxinas es un factor clave en cualquier investigación que se proponga en un futuro la obtención de biolarvicidas. Debido a la inespecificidad de esta toxina contra diferentes órdenes de insectos (87, 178) y la actividad tóxica sobre células de mamíferos, se prohíbe por la OMS la liberación de productos que la contengan (87). La ausencia total de esta toxina y la elevada actividad larvicida, en presencia de diferentes factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti* del aislamiento A21 garantizó la selección final del mismo.

Se ha demostrado que los medios de cultivo conformados por almidón funcionan como agentes fagoestimulantes (dietéticos), lo que favorece la alimentación por parte de la larva y de esta forma se incrementa el efecto larvicida de las delta-exotoxinas (135). El cultivo del aislamiento A21 en medio 2 conformado por levadura torula, almidón de maíz, NaCl, MgSO₄ favoreció una elevada expresión de sus principales factores de virulencia y actividad larvicida contra *Ae. aegypti*, de ahí la selección de este medio. Teniendo en cuenta que los principales sitios de cría de *Ae. aegypti* lo constituyen recipientes utilizados para el almacenamiento de agua de consumo humano (38, 39) y que la toxicidad contra mamíferos de *B. thuringiensis* puede estar relacionada con otros factores de virulencia diferentes a las delta- endotoxinas y betaexotoxinas (188), evaluar toxicidad aguda oral del aislamiento A21 constituyó otro de los objetivos del estudio. El cultivo del aislamiento A21 en medio 2 no evidenció toxicidad aguda oral en ratas Wistar, lo que sugiere la seguridad en la utilización de este aislamiento y medio de cultivo en el desarrollo de futuras formulaciones. Es conocido que los productos a base de *B. thuringiensis* presentan poca residualidad (24, 26) ante eventos de recambios de agua en los criaderos de *Ae. aegypti* por lo que la elevada residualidad obtenida con el aislamiento A21 cultivado en medio 2 es de importancia vital para predecir su posible utilidad en la elaboración de biolarvicidas.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

- La selección preliminar de los aislamientos de *B. thuringiensis* nativos A21, A51, L95, L910, M29, R84, R85, R87, R89 y U81 se basó en la elevada actividad larvicida contra *Ae. aegypti*, diversidad de genes y proteínas cry y cyt, así como menor citotoxicidad contra macrófagos que las cepas utilizadas como referencia, características que podrían ser útiles para el desarrollo de futuros biolarvicidas.
- Cinco aislamientos nativos mostraron mayor actividad larvicida que la cepa 266/2 9-VII-98 (ingrediente activo del Bactivec) en presencia de diferentes factores (diferentes temperaturas, presencia de: cloro, NaCl y materia orgánica), lo que podría garantizar una mayor estabilidad de la actividad larvicida en criaderos naturales de *Ae. aegypti* en Cuba.
- La ausencia total de betaexotoxinas en A21 y su elevada actividad larvicida en presencia de diferentes factores asociados a los criaderos de *Ae. aegypti*, sugiere el empleo de este aislamiento en el desarrollo de biolarvicidas.
- Con el medio 2 conformado por levadura torula, almidón de maíz y las sales NaCl y MgSO₄ se obtuvo una mayor expresión de los principales factores de virulencia y mayor actividad larvicida contra *Ae. aegypti* de A21, lo que avala su posible utilización en el desarrollo de formulaciones a base de este aislamiento.

- Con el aislamiento A21 cultivado en medio 2 administrado a *Rattus norvegicus* no se evidenció toxicidad aguda oral, lo que sugiere la seguridad de su utilización en el desarrollo de futuras formulaciones.
- La elevada actividad larvicida residual del aislamiento A21 lo convierte en un candidato promisorio para el desarrollo de biolarvicidas netamente cubanos.

Recomendaciones

VII. RECOMENDACIONES

- Analizar las relaciones filogenéticas entre los aislamientos con mayor actividad larvívica y la cepa 266/2 9-VII-98.
- Realizar los estudios de escalado a nivel de fermentador del cultivo del aislamiento A21.
- Evaluar la actividad larvívica del aislamiento A21 en poblaciones de *Ae. aegypti* de terreno.

Referencias bibliográficas

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ONU. World population prospects: the 2012 revision. New York:United Nations: Department of Economic & Social Affairs, Population Division, 2013.
2. Braack L, Gouveia de Almeida AP, Cornel AJ, Swanepoel R, de Jager C. Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasites Vectors*. 2018;11(1):29.
3. Espinal MA, Andrus JK, Jauregui B, Waterman SH, Morens DM, Santos JI, *et al*. Emerging and Reemerging Aedes-Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. *Am J Public Health*. 2019;109(3):387-92.
4. WHO. Global vector control response 2017–2030. Resolution WHA7016: An integrated approach for the control of vector-borne diseases. Geneva: World Health Organization; 2017. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259205/1/9789241512978-eng.pdf> (Consultado 24 noviembre 2018)
5. WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization: 2017. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255011/1/9789241565448-eng.pdf> (Consultado 24 noviembre 2018)
6. Bisset J, Rodríguez M. Estrategias de control de *Aedes aegypti*. In: Sanchez A, editor. Dengue. La Habana: Editorial Ciencias Medicas. ECIMED; 2014.

7. WHO, FAO, UN. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas : directrices para el control de calidad de plaguicidas. Ginebra : Organización Mundial de la Salud: WHO, 2011 Contract No.: WHO/HTM/NTD/WHOPES/2011.4. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70791>(Consultado 23 de marzo 2014)
8. Rodríguez MM, Bisset JA, Milá LH, Calvo E, Díaz C, Alain Soca L. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. Rev Cubana Med Trop. 1999;51(2):83-8.
9. Bisset J, Rodriguez MM, Ricardo Y, Ranson H, Perez O, Moya M, *et al.* Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. Med Vet Entomol. 2011;25(3):233-9.
10. Araujo AP, Araujo Diniz DF, Helvecio E, Barros RA, Oliveira CM, Ayres CF. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. Parasites Vectors. 2013;6: 297-306.
11. Bisset J, Rodríguez M, Piedra L, Cruz M, Gutiérrez G, Ruiz A. Reversal of resistance to the larvicide temephos in an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory strain from Cuba. J Med Entomol. 2019;57(3):801-6.
12. Day JF. Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. Insects. 2016;7(4):65-87.
13. WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. In: Data WLC-i-P, editor. Geneva, Switzerland: WHO; 2009. Disponible en: <http://who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis> (Consultado 8 de enero 2011)
14. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. Toxins. 2014;6:1222-43.

15. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*. 2014;6(12): 3296–325.
16. Melo A, Soccol V, Soccol C. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(2):317-26.
17. Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. *Bacillus thuringiensis*. *Bioeng Bugs*. 2010;1(1):31-50.
18. Soberón M, López-Díaz JA, Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*. 2013;41:87-93.
19. Menéndez Z, Rodríguez J, Gato R, Companioni A, Díaz M, Bruzón RY. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L.) strains from Havana to a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Rev Cubana Med Trop*. 2012;64(3):324-9.
20. Carvalho KdS, Crespo MM, Araújo AP, da Silva RS, de Melo-Santos MAV, de Oliveira CMF, et al. 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*. 2018;11(1):673-84.
21. Montero G, Espino R, García I, Díaz M. Efectividad del *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14 en criaderos de *Anopheles albimanus* en las condiciones naturales de Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 1986;24(2):165-71.
22. Rodríguez Rodríguez J, Menéndez Díaz Z, García García I, Díaz Pérez M, Sánchez JE, Gato Armas R. Conducta de oviposición de *Aedes aegypti* (L.) en presencia de *Macrocyclops albidus* (J.) y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en condiciones de laboratorio. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;59(1):73-5.

23. Gato R, Díaz M, Bruzón RY, Menéndez Z, González A, Hernández Y, *et al.* Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Rev Cubana Med Trop. 2008;60(1):74-7.
24. Uragayala S, Kamaraju R, Tiwari S, Ghosh SK, Valecha N. Field testing & evaluation of the efficacy & duration of effectiveness of a biolarvicide, Bactivec® SC (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SH-14) in Bengaluru, India. Indian J Med Res. 2018;147(3):299-307.
25. Tissera HA, Samaraweera PC, Jayamanne BDW, Janaki MDS, U Chulasiri MPP, Rodrigo C, *et al.* Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* in integrated vector control of *Aedes* sp. in Sri Lanka: a prospective controlled effectiveness study. Trop Med Int Health. 2018;23(2):229-35.
26. González A, Companioni A, Menéndez Z, Anaya J, García I, Lorenzo CM, *et al.* Evaluación de la eficacia larvicida de Rapidall NP3 (*Bacillus thuringiensis*) contra *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Rev Cubana Med Trop. 2019;71(1).
27. dos Santos Lobo K, Soares-da-Silva J, da Silva M, Tadei WP, Polanczyke RA, Soares Pinheiro VC. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. Rev Bras Entomol. 2018;62(1):5-12.
28. Ibarra JE, del Rincón MC, Ordúz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, *et al.* Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. Appl Environ Microbiol. 2003;69(9):5269-74.
29. Karungu S, Huang D, Atoni E, Rumberia C, Agwanda B, Hu X, *et al.* Isolation, identification and evaluation of mosquito entomopathogenic *Bacillus* species and related genera from randomly selected sites in Kenya. Afr J Microbiol Res. 2018;12(12):290-9.

30. Salama HS, Abd El-Ghany NM, Saker MM. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. *J Genet Eng Biotechnol.* 2015;13(2):101-9.
31. Ahmed AM, Hussein HI, El-Kersh TA, Al-Sheikh YA, Ayaad TH, El-Sadawy HA, *et al.* Larvicidal Activities of Indigenous *Bacillus thuringiensis* Isolates and Nematode Symbiotic Bacterial Toxins against the Mosquito Vector, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Arthropod-Borne Di.* 2017;11(2):260-77.
32. Djenane Z, Nateche F, Amziane M, Gomis-Cebolla J, El-Aichar F, Khorf H, *et al.* Assessment of the Antimicrobial Activity and the Entomocidal Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Algeria. *Toxins.* 2017;9(4):139-58.
33. Young PR, Ng LFP, Hall RA, Smith DW, Johansen CA. Arbovirus Infections. In: Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, editors. *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)*. London: W.B. Saunders; 2014. p. 129-61.e3.
34. Beckham JD, Tyler KL. Arbovirus Infections. *Continuum (Minneap, Minn).* 2015;21(6 Neuroinfectious Disease):1599-611.
35. Cuba. Dengue en la Región de las Américas. Factográfico de Salud Cuba: Biblioteca Médica Nacional. 2019. Disponible en: <http://files.sld.cu/bmn/files/2019/10/factografico-de-salud-octubre-2019.pdf> (Consultado 20 de diciembre 2019).
36. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16055
37. Fuentes O. Vectores del dengue. Transmision e interaccion virus-vector. In: Sanchez T, editor. *Dengue*. La Habana: Editorial de Ciencias Medicas, ECIMED; 2014. p. 512.

38. Marquetti MC, Suárez S, Bisset J, Leyva M. Reporte de hábitats utilizados por *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2005;57(2):159-61.
39. Marquetti MC, Carrazana M, Leyva M, Bisset J. Factores relacionados con la presencia de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) en dos regiones de Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2010;62(2):112-8.
40. Barrera R. Control de los mosquitos vectores del dengue y del chikunguña: ¿es necesario reexaminar las estrategias actuales? Biomedica. 2015;35(3): 297–9.
41. WHO. Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: World Health Organization, 2008. Disponible en: https://who.int/water_sanitation_health/ (Consultado 10 de septiembre 2014).
42. Devine GJ, Eza D, Ogusuku E, Furlong MJ. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2008;25:74-100.
43. Liu N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. Annu Rev Entomol. 2015;60(1):537-59.
44. Bisset JA, Marín R, Rodríguez MM, Severson DW, Ricardo Y, French L, *et al.* Insecticide Resistance in Two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Strains From Costa Rica. J Med Entomol. 2013;50(2):352-61.
45. Rawal D. A review on different strategies used for biological control of mosquitoes. Int J Mosq Res. 2019;6(5):41-3.
46. Marimuthu S, Rahuman AA, Kirthi AV, Santhoshkumar T, Jayaseelan C, Rajakumar G. Eco-friendly microbial route to synthesize cobalt nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against malaria and dengue vectors. Parasitol Res. 2013; 112(12):4105-12

47. Sauka D, H., Benintende G, B. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev Argent Microbiol. 2008;40(2):124-40.
48. Gómez-Vargas W, Valencia-Jiménez K, Correa-Londoño G, Jaramillo-Yepes F. Nuevas tabletas larvicidas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: evaluación del efecto larvicida sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Colombia. Biomédica. 2018;38:95-105.
49. Baxter RHG. Chemosterilants for Control of Insects and Insect Vectors of Disease. *Chimia (Aarau)*. 2016;70(10):715-20.
50. Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, *et al*. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(3):295-311.
51. Caragata EP, Rocha MN, Pereira TN, Mansur SB, Dutra HLC, Moreira LA. Pathogen blocking in Wolbachia-infected *Aedes aegypti* is not affected by Zika and dengue virus co-infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(5):e0007443.
52. Badii M, Flores A, Wong L. Fundamentos y perspectivas de control biológico. M. H. Badii, A. E. Flores y L. J. Galán (eds.).UANL, Monterrey, México. 2000.
53. Abd-Alla AMM, Meki IK, Demirbas-Uzel G. Insect Viruses as Biocontrol Agents: Challenges and Opportunities. In: El-Wakeil N, Saleh M, Abu-hashim M, ed. *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications: Practical Aspects to Deal Biologically with Pests and Stresses Facing Strategic Crops*. Cham: Springer International Publishing. 2020; p. 277-95.
54. Cetin H, Oz E, Yanikoglu A, Cilek JE. Operational Evaluation Of Vectomax® WSP (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* + *Bacillus sphaericus*) Against Larval *Culex pipiens* in Septic Tanks. *J Am Mosq Control Assoc*. 2015;31(2):193-5.

55. El-Bendary MA. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. J Basic Microbiol. 2006;46(2):158-70.
56. Gómez-Garzón C, Hernández-Santana A, Dussán J. Comparative genomics reveals *Lysinibacillus sphaericus* group comprises a novel species. BMC Genom. 2016;17(1):709-19.
57. Lacey L. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. J Am Mosq Control Assoc. 2007; 23(sup12): 133-63.
58. Luna-Finkler C, Finkler L. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters. In: Farzana Perveen, ed: Insecticides-Advances in Integrated Pest Management. 2012; p. 613-26.
59. Rydzanicz K, Sobczyński M, Guz-Regner K. Comparison of the Activity and Persistence of Microbial Insecticides Based on *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* in Organic Polluted Mosquito-Breeding Sites. Polish J of Environ Stud. 2010;19(6):1317-23.
60. Wirth MC, Walton WE, Federici BA. Evolution of Resistance in *Culex quinquefasciatus* (Say) Selected With a Recombinant *Bacillus thuringiensis* Strain-Producing Cyt1Aa and Cry11Ba, and the Binary Toxin, Bin, From *Lysinibacillus sphaericus*. J Med Entomol. 2015;52(5):1028-35.
61. Zogo B, Tchiekoi BNC, Koffi AA, Dahounto A, Ahoua Alou LP, Dabiré RK, *et al.* Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malaria vector, *Anopheles gambiae*. Malar J. 2019;18(1):55-64.
62. Scholte E-J, Knols B, Samson R, Takken W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. J Insect Sci. 2004;4:19- 33.

63. Marcombe S, Chonephetsarath S, Thammavong P, Brey PT. Alternative insecticides for larval control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Lao PDR: insecticide resistance and semi-field trial study. *Parasites Vectors*. 2018;11(1):616- 24.
64. Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007;49(4):423-35.
65. Brühl CA, Després L, Frör O, Patil CD, Poulin B, Tetreau G, *et al.* Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). *Sci Total Environ*. 2020;274:137800.
66. Sauka DH, Basurto-Ríos RE, Ibarra JE, Benintende GB. Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotrop Entomol*. 2010;39:767-73.
67. Logan NA, Vo PD. *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust; 2009.
68. Margalit J, Dean D. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.). *J Am Mosq Control Assoc*. 1985;1(1):1-7.
69. Parry J, Turnbull P, Gibson J. A colour atlas of *Bacillus* species. London: Wolfe Medical Books.1983.
70. Osman GEH, El-Ghareeb D, Already R, Assaeedi ASA, Organji SR, Abulreesh HH, *et al.* Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a Comprehensive Review. *Egypt J Biol Pest Co*. 2015;25(1):271-88.
71. El-kersh TA, Al-sheikh YA, Al-akeel RA, Alsayed AA. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *Afr J Biotechnol*. 2012;11(8):1924-38.

72. Argôlo-Filho RC, Loguercio LL. *Bacillus thuringiensis* Is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. *Insects*. 2013;5(1):62-91.
73. Hernández-Rodríguez CS, Ferré J. Ecological distribution and characterization of four collections of *Bacillus thuringiensis* strains. *J Basic Microbiol*. 2009;49(2):152-7.
74. Xu C, Wang B-C, Yu Z, Sun M. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*. 2014;6(9):2732-70.
75. Rosas-Garcia NM. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative. *Recent Pat Biotechnol*. 2009;3(1):28-36.
76. Liu X, Zuo M, Wang T, Sun Y, Liu S, Hu S, *et al*. Proteomic analysis of the influence of Cu²⁺ on the crystal protein production of *Bacillus thuringiensis* X022. *Microb Cell Fact*. 2015;14:153.
77. Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, Jones AF, Murphy L, Quail MA. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(10): 5082–95.
78. Alves GB, Melo FL, Oliveira EE, Haddi K, Costa LTM, Dias ML, *et al*. Comparative genomic analysis and mosquito larvicidal activity of four *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strains. *Scientific Reports*. 2020;10(1):5518-30
79. Crickmore N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature US University of Sussex. UK: Neil Crickmore; 2011 (actualización 2018. Disponible en: <http://www.btnomenclature.info/>).
80. Gillis A, Fayad N, Makart L, Bolotin A, Sorokin A, Kallassy M, *et al*. Role of plasmid plasticity and mobile genetic elements in the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. *FEMS microbiol rev*. 2018;42(6):829-56.

81. Soberón M, Portugal L, Garcia-Gómez B-I, Sánchez J, Onofre J, Gómez I, *et al.* Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2018;93:66-78.
82. Katayama H, Yokota H, Akao T, Nakamura O, Ohba M, Mekada E, *et al.* Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein to Human Cells from Non-Insecticidal Parasporal Inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J Biochem.* 2005;137(1):17-25.
83. Hernández-Soto A, Del Rincón-Castro MC, Espinoza AM, Ibarra JE. Parasporal Body Formation via Overexpression of the Cry10Aa Toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa Synergism. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(14):4661-7.
84. Whalon ME, Wingerd BA. Bt: Mode of action and use. *Arch Insect Biochem.* 2003;54(4):200-11.
85. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):775-806.
86. Cohen S, Albeck S, Ben-Dov E, Cahan R, Firer M, Zaritsky A, *et al.* Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *J Mol Biol.* 2011;413(4):804-14.
87. Liu X, Ruan L, Peng D, Li L, Sun M, Yu Z. Thuringiensin: A thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. *Toxins.* 2014;6:2229-38.
88. Soberón M, Fernández LE, Pérez C, Gill SS, Bravo A. Mode of action of mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon.* 2007;49(4):423-35.

89. Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodríguez-Almazan C, Pardo L, *et al.* Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb Biotechnol.* 2013;6(1):17-26.
90. Deist BR, Rausch MA, Fernandez-Luna MT, Adang MJ, Bonning BC. Bt toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins.* 2014;6(10):3005-27.
91. Ibarra J, Del Rincón C, Galindo E, Patiño M, Serrano L, García R, *et al.* Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Microbiología.* 2006;48(2):113-20.
92. Stalinski R, Laporte F, Després L, Tetreau G. Alkaline phosphatases are involved in the response of *Aedes aegypti* larvae to intoxication with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins. *Environ Microbiol.* 2016;18(3):1022-36.
93. Wirth MC, Delécluse A, Walton WE. Laboratory Selection for Resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* or a Component Toxin, Cry11B, in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2004;41(3):435-41.
94. Corbillon CO, Gonzalez A, Menendez Z, Companioni A, Bruzon RY, Diaz M, *et al.* Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana MedTrop.* 2012;64(3):235-43.
95. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2005. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf (Consultado 6 febrero 2010).
96. Tetreau G, Stalinski R, Kersusan D, Veyrenc S, David J, Reynaud S, *et al.* Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15):5189-95.

97. Christiansen J, Mcabee R, Stanich M, Dechant P, Boronda D, Cornel JD. Influence of temperature and concentration of Vectobac(R) on control of the salt-marsh mosquito, *Ochlerotatus squamiger*, in Monterey county, California. *J Am Mosq Control Assoc.* 2004;20(2):165-70.
98. Cao C, Sun L, Wen R, Li X, Wu H, Wang Z. Toxicity and affecting factors of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Chironomus kiiensis* larvae. *J Insect Sci.* 2012;12(126):1-8.
99. Maldonado M, Galan L, Rodriguez C, Quiroz H. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis* H-14 var *israelensis* against larvaria *Aedes aegypti* in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc.* 2002;18(4):352-8.
100. Tamez-Guerra P, Mcguire M, Behle R, Shasha B, Galán L. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol.* 2000;93(2):219-25.
101. Osborn F, Herrera M, Gomez C, Salazar A. Comparison of two commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) at three salt concentrations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(1):69-72.
102. Marzban PU. Investigation on the suitable isolate and medium for production of *Bacillus thuringiensis*. *J Biopestic.* 2012;5(2):144-7.
103. Mignone CF, Avignone-Rossa C. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996;46(1):78-84.
104. İçgen Y, İçgen B, Özcengiz G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Res Microbiol.* 2002;153(9):599-604.

105. Sarrafzadeh MH. Nutritional Requirements of *Bacillus thuringiensis* During Different Phases of Growth, Sporulation and Germination Evaluated by Plackett-Burman Method. Iran J Chem Chem Eng. 2012;31(4):131-6.
106. Escobar JM, Pardo EM, Buitrago G, López LA. Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. Rev Colomb Biotecnol. 2004;6(2):43-53.
107. Ozkan M, Dilek F, Yetis U, Ozcengiz G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. Res Microbiol. 2003;154:49-53.
108. Ben Khedher S, Jaoua S, Zouari N. Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. Braz J Microbiol. 2013;44:927-33.
109. Devidas PC, Pandit BH, Vitthalrao PS. Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of *Aedes aegypti*. SCI World J. 2014;2014: 273030-6.
110. Awad H, M., R. A, Zalina N, Elmarzugi N, Mei O, Ramli S, *et al.* Bioprocess development for enhanced spore production in shake flask and pilot scale bioreactors of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in submerged culture. IOSR J Pharm Biol Sci. 2015;10(1):103-8.
111. Bernhard K, Jarret P, Meadows M, Butt J, Ellis D, Roberts G, *et al.* Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization and activity against insect pest. J Invertebr Pathol. 1997;70:59-68.
112. Mazmira M, Ramlah S, Rosfarizan M, Ling T, A. A. Effect of saccharides on growth, sporulation rate and delta-endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. Afr J Biotechnol. 2012;11(40):9654-63.

113. Mourin M, Shishir A, Nargis S, Mozammel M. Regulation of major cultural components for designing a cost effective medium to increase delta endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Afr J Biotechnol.* 2015;14(16):1379-86.
114. Day M, Ibrahim M, Dyer D, Bulla L, Jr. Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Strain HD-1. *Genome Announc.* 2014;2(4):e00613-14.
115. Moar WJ, Trumble JT, Hice RH, Backman PA. Insecticidal activity of the CryIIA protein from the NRD-12 isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and in a leaf-colonizing strain of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(3):896-902.
116. García MD, Uruburu: F. La conservación de cepas microbianas. Temas de la actualidad. 2001. Disponible en: https://www.uv.es/cect2/87_Conseervacion_cepas_.pdf (consultado el 20 de julio 2013).
117. Perez O, Rodríguez J, Bisset J, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, *et al.* Manual de Indicaciones Tecnicas para insectarios. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas ECIMED; 2004. p. 59.
118. Pyllis AW, Rusell ST. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(10):2437-42.
119. Carreras B. Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* Berliner autóctonos de Cuba. *Fitosanidad.* 2009;13(2):109-16.
120. Chaves JQ, Cavados CF, Rabinovitch. L. Phenotypic and genotypic features of new autoagglutinating *Bacillus thuringiensis* strains. *J Invertebr Pathol.* 2008;98:85-92.
121. Finney JD. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, editor.1971.
122. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Measurement of protein using bicinchononic acid. *Anal Biochem.* 1986;150:76-85.

123. Carreras B, Sánchez J, Bravo A. Caracterización molecular de cuatro cepas de *Bacillus thuringiensis*. Relación con la actividad biológica. Rev Protección Veg. 2004;19(2):80-5.
124. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
125. Ben Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins (Basel). 2014;64(4):1222-43.
126. Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, *et al.* Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl Environ Microbiol. 1998;64(12):4965-72.
127. Reyes-Ramírez A, Ibarra JE. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. Appl Environ Microbiol. 2008;74(1):125-9.
128. Sladowski D, Steer S, J., Clothier R, H., Balls M. An improve MTT assay. J Immunol Methods. 1993;157:203-7.
129. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. Parasitol Int. 2005;54(2):119-22.
130. Lacey L, Singer S. Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against anopheline and culicine mosquitoes. Mosq News. 1982;42:537-43.
131. Vachon V, Laprade R, Schwartz JL. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. J Invertebr Pathol. 2012;111(1):1-12.

132. Mac Innes TC, Bouwer G. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* b-exotoxin. *J Invertebr Pathol.* 2009;101:137-9.
133. Galán W KA. Uso de un método sencillo para la detección de beta-exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*. *Southwest Entomol.* 1994;19(4):385-90.
134. Wang J, Mei H, Zheng C, Qian H, Cui C, Fu Y, *et al.* The Metabolic Regulation of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis* Revealed by Transcriptomics and Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP.* 2013;12(5):1363-76.
135. Ochoa G, Arrivillaga J. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.* 2009;49(2):181-91.
136. Rosas-García NM. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Rev Colomb Biotecnol.* 2008;10(1):49-63.
137. Mancebo A, González Navarro B, Riera L, Lugo S, González Torres Y, Arteaga M, *et al.* Evaluación de la toxicidad/patogenicidad de una formulación de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bactivec). *Rev Toxicol.* 2003;20(3):204-9.
138. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, *et al.* AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. E.U. American Veterinary Medical Association. 2013 ed.
139. Askar M, Ashraf W, Scammell B, Bayston R. Comparison of different human tissue processing methods for maximization of bacterial recovery. *Eur J Clin Microbiol.* 2019;38(1):149-55.
140. Fillinger U, Knols B, Becker N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Trop Med Int Health.* 2003;8(1):37-47.

141. de Melo-Santos MA, Sanches EG, de Jesus FJ, Regis L. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(6):859-60.
142. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA;310(20):2191-4.
143. DOUE-L-2010-81868. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32010L0063> (Consultado 17 Junio 2017).
144. Zorzetti J, Ricietto APS, Fazion FAP, Meneghin AM, Neves PMOJ, Vilas-Boas LA, *et al.* Isolation, morphological and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Rev Bras Entomol. 2018;62(3):198-204.
145. Carreras B, Rodríguez D, Piedra F. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* Berliner para el control de *Heliothis virescens* Fabricius en el cultivo del tabaco en Cuba. Fitosanidad. 2009;13(4):277-80.
146. Febles-González JM, Vega-Carreño MB, Tolón-Becerra A, Lastra-Bravo X. Assessment of soil erosion in karst regions of Havana, Cuba. Land Degrad Dev. 2012;23(5):465-74.
147. Turnbull PCB, Jackson PJ, Hill KK, Keim P, Kolstø AB, D.J. B. Longstanding taxonomic enigmas within the ‘*Bacillus cereus* group’ are on the verge of being resolved by far-reaching molecular developments: Forecasts on the possible outcome by an ad hoc team. In: Berkeley H, Logan and De Vos ed. Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. Oxford: Blackwell Science; 2002. p. 23-36.
148. Fritze D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. Phytopathology™. 2004;94(11):1245-8.

149. Ohba M, Wasano N, Mizuki E. *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan. *Microbiol Res.* 2000;155(1):17-22.
150. Yasutake K, Uemori A, Kagoshima K, Ohba M. Serological identification and insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from the island Okinoerabu-jima, Japan. *Appl Entomol Zool.* 2007;42(2):285-90.
151. Pérez C, Fernandez LE, Sun J, Folch JL, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(51):18303-8
152. Otieno-Ayayo ZN, Zaritsky A, Wirth MC, Manasherob R, Khasdan V, Cahan R, *et al.* Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environ Microbiol.* 2008;10(9):2191-9.
153. González-Villarreal SE, García-Montelongo M, Ibarra JE. Insecticidal Activity of a Cry1Ca toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner (Firmicutes: Bacillaceae) and Its Synergism with the Cyt1Aa Toxin Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2020;57(6):1852-1856.
154. Tran S-L, Guillemet E, Ngo-Camus M, Clybouw C, Puhar A, Moris A, *et al.* Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell Microbiol.* 2011;13(1):92-108.
155. He X, Sun, He K, Guo S. Biopolymer microencapsulations of *Bacillus thuringiensis* crystal preparations for increased stability and resistance to environmental stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(7):2779-2789.
156. Ortíz P, Pérez A, Rivero A, León N, Díaz M, Pérez A. Assessment of Human Health Vulnerability to Climate Variability and Change in Cuba. *Environ Health Perspect.* 2006;114(12):1942-9.

157. Ortíz P, Pérez A, Valencia A, Pérez A, Cangas J, Lecha L. La variabilidad y el cambio climático en Cuba: potenciales impactos en la salud humana. *Rev Cub Salud Publica*. 2008;34(1).
158. Alonso G, Clark I. Cuba Confronts Climate Change. *MEDICC Review*. 2015;17(2):10-3.
159. Messina JP, Brady OJ, Pigott DM, Golding N, Kraemer MU, Scott TW, *et al*. The many projected futures of dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(4):230-9.
160. Liu-Helmersson J, Rocklöv J, Sewe M, Brännström Å. Climate change may enable *Aedes aegypti* infestation in major European cities by 2100. *Environmental Research*. 2019;172:693-9.
161. Barrera R, Amador M, MacKay A. Population dynamics of *Aedes aegypti* and dengue as influenced by weather and human behavior in San Juan, Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(12):e1378.
162. Johansson M, Dominici F, Glass G. Local and global effects of climate on dengue transmission in Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;32(2):e382.
163. Mulla M, Darwazeh H, Zgomba M. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. *Bull Soc Vector Ecol*. 1990;15(2):166-75.
164. Stevens M, Akhurst R, Clifton M, Hughes P. Factors affecting the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to fourth instar larvae of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae). *J Invertebr Pathol*. 2004;83(3):104-10.
165. Zhang M, Feng M, Xiao L, Song X, Yang W, Ding G. Impact of water content and temperature on the degradation of Cry1Ac protein in leaves and buds of Bt cotton in the soil. *PLoS One*. 2015;10(1):e115240.

166. Bernard A. Chlorination products: emerging links with allergic diseases. *Curr Med Chem.* 2007;14(16):1771-82.
167. Sinegre G, Gaven B, Vigo G. Contribution to the 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 the biological activity of a primary powder. *Cahiers ORSTOM, Entomol Med Parasitol.* 1981;19(3):149-55.
168. Shang C, Blatchley E, . Chlorination of pure bacterial cultures in aqueous solution. *Water Res.* 2001;35(1):244-54.
169. Martinez-Hernandez S, Vazquez-Rodriguez G, Beltran-Hernandez R, Prieto-Garcia F, Miranda-Lopez J, Franco-Abuin C, *et al.* Resistance and inactivation kinetics of bacterial strains isolated from the non-chlorinated and chlorinated effluents of a WWTP. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(8):3363-83.
170. Venkobachar C, Iyengar L, Prabhakara Rao AVS. Mechanism of disinfection: Effect of chlorine on cell membrane functions. *Water Res.* 1977;11(8):727-9.
171. Rice E, Adcock N, Sivaganesan M, Rose L. Inactivation of spores of *Bacillus anthracis* Sterne, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by chlorination. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):5587-9.
172. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol.* 2006;101(3):514-25.
173. Stockel S, Schumacher W, Meisel S, Elschner M, Rosch P, Popp J. Raman spectroscopy-compatible inactivation method for pathogenic endospores. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2895-907.

174. Dawson D, Salice CJ, Subbiah S. The efficacy of the *Bacillus thuringiensis israelensis* larvicide against *Culex tarsalis* in municipal wastewater and water from natural wetlands. *J Am Mosq Control Assoc.* 2019;35(2):97-106.
175. Jude PJ, Tharmasegaram T, Sivasubramaniyam G, Senthilnathanan M, Kannathasan S, Raveendran S, *et al.* Salinity-tolerant larvae of mosquito vectors in the tropical coast of Jaffna, Sri Lanka and the effect of salinity on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* to *Aedes aegypti* larvae. *Parasites Vectors.* 2012;5:269-77.
176. Bashir O, Claverie JP, Lemoyne P, Vincent C. Controlled-release of *Bacillus thuringiensis* formulations encapsulated in light-resistant colloidosomal microcapsules for the management of lepidopteran pests of Brassica crops. *PeerJ.* 2016;4:e2524.
177. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 2011;9(3):283-300.
178. Sánchez-Soto AI, Saavedra-González GI, Ibarra JE, SalcedoHernández R, Barboza-Corona JE, Del Rincón-Castro MC. Detection of β -exotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis* using an easy bioassay with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lett Appl Microbiol.* 2015;61(6):562-7.
179. Gohar M, Perchat S. Sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2001;298(1):112-7.
180. Costa R, Luz R, Pinheiro DH, Corrêa FM, Valicente FH, Vilela VW, *et al.* Requirement of Simultaneous Assessment of Crystal- and Supernatant-Related Entomotoxic Activities of *Bacillus thuringiensis* Strains for Biocontrol-Product Development. *Toxins.* 2014;6:1598-614.
181. Bhowmik A. Development of a cost effective medium for enhanced production of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Bangladesh: BRAC University 2014.

182. Deng C, Peng Q, Song F, Lereclus D. Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*. 2014;6(7):2194-209.
183. Ennouri K, Ayed B, Hassen B, Mazzarello M, Ottaviani E. Experimental design and Bayesian networks for enhancement of delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2015;62(4):379-92.
184. Valicente FH, Tuelher E, Leite MI, Freire F, Vieira CM. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by products as nutrient sources. *Rev Brasileira de Milho e Sorgo*. 2010;91(1):1-11.
185. Zouari N, Ghribi D, Trabelsi H, Jaoua S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40(4):614-22.
186. Brar S, Verma M, Tyagi R, Surampalli R, Barnabé S, Valéro J. *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochem*. 2007;42(5):773-90.
187. Bishop A, Johnson C, Perani M. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. *World J Microbiol Biotechnol*. 1999;15:375-80.
188. Berlitz DL, Giovenardi M, Charles J-F, Fiúza LM. Toxicity intraperitoneal and intragastric route of *Bacillus thuringiensis* and melia azedarach in mice. *Arq Inst Biol, São Paulo*. 2012;79(4):511-7.
189. Mancebo A, Molier T, González B, Lugo S, Riera L, Arteaga ME, *et al*. Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of a new formulation of *Bacillus thuringiensis var israelensis* SH-14 in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;59(1):184-90.
190. García-Gómez BI, Cano SN, Zagal EE, Dantán-Gonzalez E, Bravo A, Soberón M. Insect Hsp90 Chaperone Assists *Bacillus thuringiensis* Cry Toxicity by Enhancing Protoxin

Binding to the Receptor and by Protecting Protoxin from Gut Protease Degradation. *mBio*. 2019;10(6):e02775-19.

191. Ritchie SA, Rapley LP, Benjamin S. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) Provides Residual Control of *Aedes aegypti* in Small Containers. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(6):1053-9.

192. Sukesu TW, Hendrawati E, Mulasari S. Effectivity of bacterial suspension *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in Killing *Aedes aegypti* L. mosquito larvae. *Bangladesh J Med Sci*. 2019;18(4):706-10.

193. Thomas W, Trintchina E, Forero M, Vogel V, Sokurenko E. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell*. 2002;109(7):921-23.

194. Gomez de Leon P, Ibarra JE, Bravo A, Garcia-Gutierrez K. Adhesion Capacity of *Bacillus thuringiensis* Spores and its Relation with Biofilm Formation. *SOJ Microbiol Infect Dis*. 2015;3(2):1-6.

195. Tetreau G, Alessi M, Veyrenc S, Perigon S, David J, Reynaud S, *et al*. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(23):8362-7.

196. Duchet C, Tetreau G, Marie A, Rey D, Besnard G, Perrin Y, *et al*. Persistence and Recycling of Bioinsecticidal *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Spores in Contrasting Environments: Evidence from Field Monitoring and Laboratory Experiments. *Microb Ecol*. 2014;67(3):576-86.

197. Farajollahi A, Williams GM, Condon GC, Kesavaraju B, Unlu I, Gaugler R. Assessment of a Direct Application of Two *Bacillus thuringiensis israelensis* Formulations for Immediate and Residual Control of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc*. 2013;29(4):385-8.

198. Lee YW, Zairi J. Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. Trop Biomed. 2005;22(1):5-10.
199. Setha T, Chantha N, Socheat D. 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 Public Health. 2007; 38(2):261-8.
200. England PH. UK Standards for Microbiology Investigations. Catalase test. London. 2019. p. 14.

Anexos

ANEXOS

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA QUE AVALA LOS RESULTADOS DE LA TESIS

Publicaciones

1. **González A**, Castañet CE, Companioni A, Menéndez A, *et al.* Effect of Chlorine and Temperature on Larvicidal Activity of Cuban *Bacillus thuringiensis* Isolates. J Arthropod-Borne Di. 2019; 13(1): 39–49.
2. **González A**, Menéndez Z, García García I, Anaya J, González R *et al.* Detección de beta exotoxinas en aislamientos de *Bacillus thuringiensis* nativos de Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2016; 68(1): 105-110.
3. **González A**, Rodríguez G, Bruzón RY, Díaz M, Companioni A, Menéndez Z *et al.* Isolation and characterization of entomopathogenic bacteria from soil samples from the western region of Cuba. J Vector Ecol. 2013; 38(1): 46-52.
4. **González A**, Díaz R, Díaz M, Borrero Y, Bruzón RY, Carreras B *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. Rev Biol Trop. 2011; 59(3): 1007-1016.
5. Rodríguez G, **González A**, Gato R, Díaz M, Bruzón RY, Rodríguez W. Obtención de aislados bacterianos de muestras de suelos de la región occidental de Cuba. Revista Institucional del Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas, LABIOFAM. 2011; 1.

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA QUE AVALA LOS RESULTADOS DE LA TESIS

RESUMENES PUBLICADOS:

- **González A**, Hernández H M; Companioni A; Monzote L; Rodríguez M M; Castañet C E; Ramírez C; Torres A E; Menéndez Z; Anaya J; García I; Iglesias A; Lorenzo C1 , Gato R. A high residual and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of the pre-formulation based on *Bacillus thuringiensis* native isolates. The Biologist (Lima). 2020, 18, Supl 1.
- **González A**, Torres A, Anaya J, Companioni A, Menéndez Z. Evaluations of different culture conditions to increase the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* A21 native isolate. The Biologist (Lima). 2019, 17, Supl 2.
- **González A**, Castañet CE, Anaya J, Companioni A, Menéndez Z, Gato R. Influence of factors related with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding's sites on larvicidal activity of native *Bacillus thuringiensis* isolates. The Biologist (Lima). 2018; 16, Supl 2.

ANEXO I.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA QUE AVALA LOS RESULTADOS DE LA TESIS

PRESENTACIÓN EN EVENTOS CIENTÍFICOS

- **Congreso 70 aniversario del IPK. La Habana, Cuba. 2009.** Simposio control integrado de vectores y hospederos intermediarios

González A. Caracterización de cepas útiles para el control biológico de mosquitos.

- **Congreso LABIOFAM, La Habana, Cuba. 2012**

González A, Gato R, Rodríguez G, Bruzón RY, Díaz M, Companioni A, Menéndez Z. *Bacillus thuringiensis* aislados de la región occidental del archipiélago cubano, útiles para el control de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*.

- **Congreso LABIOFAM, La Habana, Cuba. 2014.**

González A, Gato R, Salazar D, Companioni A, Menéndez Z, Garcia I, González R, Fuentes O, Anaya J, Calderón IR. Cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis* disponibles para el desarrollo de nuevos biolarvicidas contra *Aedes aegypti*.

- **VIII Congreso Cubano de Microbiología y parasitología, La Habana, Cuba. 2014**

González A, Gato R, Salazar D, Companioni A, Rodriguez G, Menéndez Z. Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* disponibles para el desarrollo de biolarvicidas más eficaces para el control de *Aedes aegypti*.

González A, Garcia Garcia I, González R, Fuentes O, Anaya J, Calderón IR, Menéndez Z, Gato R. Detección del efecto toxico de sobrenadantes de cultivos esterilizados de *Bacillus thuringiensis* sobre *Aedes aegypti*.

- **IX Taller Nacional de Vigilancia y Lucha Anti Vectorial. Ciego de Avila, Cuba. 2014.**

González A, Gato R , Diaz M, Bruzón RY, Comapnioni A, Menendez Z, Rodriguez G, Salazar R. Aislamientos bacterianos de fuentes ambientales útiles para el control larval de *Aedes aegypti*.

- **Cubazoo. La Habana, Cuba. 2015.**

González A, Castañet CE, Companioni A, Menéndez Z, Calderón IR, Garcia Garcia I. Efecto de la temperatura sobre la acción larvicida contra *Aedes aegypti* de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*.

- **Simposio Internacional sobre vigilancia, Monitoreo y Control de Vectores Implicados en la Transmisión de Enfermedades Zoonóticas, Ciego de Avila, Cuba. 2016.**

González A, Castañet CE, Anaya J, Companioni A, Menéndez Z, Gato R, Rodriguez MM, Hernández HM. Influencia de la temperatura sobre los principales factores de virulencia de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*.

- **Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" La Habana, Cuba. 2017.**

González A, Castañet CE, Anaya J, Companioni A, Menéndez Z, Gato R, Rodriguez MM, Hernández HM. Influencia del cloro y la temperatura sobre la actividad larvicida contra *Aedes aegypti* de aislados cubanos de *Bacillus thuringiensis*.

Gonzalez A, Ramírez C, Torres A E; Companioni A, Menéndez Z, Lorenzo C, Gato R. Detección de genes *cry* y *cyt* en aislamientos cubanos de *Bacillus thuringiensis*.

- **22 Jornada de Médicos Residentes en Microbiología y II jornada de Maestranteros y Doctorantes, IPK, La Habana, Cuba. 2018.**

González A, Castañet CE, Anaya J, Companioni A, Menéndez Z, Gato R, Rodríguez MM, Hernández HM. Influencia de factores asociados a los criaderos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) sobre la actividad larvicida de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*.

- **V Simposio Internacional sobre vigilancia, monitoreo y control de vectores implicados en la transmisión de enfermedades zoonóticas. Trinidad, Cuba. 2018.**

González A, Castañet CE, Anaya J, Companioni A, Menéndez Z, Gato R, Rodríguez MM, Hernández HM. Influencia de factores asociados a los criaderos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) sobre la actividad larvicida de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*

- **I encuentro Internacional de organismos vectores implicados en la transmisión de entidades zoonóticas, Topes de Collantes, Cuba. 2019**

González A, Torres A, Anaya J, Companioni A, Menéndez Z. Evaluation of different culture conditions to increase the larvicidal activity of A21 *Bacillus thuringiensis* native isolate.

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA QUE AVALA LOS RESULTADOS DE LA TESIS

TESIS DEFENDIDAS Y TUTOREADAS

1. Tesis en opción al título de Master en Bacteriología-Micología: Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias entomopatógenas de muestras de suelo de la región occidental de Cuba. Autora: Lic. Graciela Rodríguez Leyva. IPK, La Habana, Cuba. 2011.
2. Tesis en opción al título de Lic en Microbiología: Efecto de la temperatura y el cloro sobre la actividad larvicida contra *Aedes aegypti* de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Autor: Camilo Ernesto Castañet Martínez. Fac. Biología UH, La Habana, Cuba. 2016.
3. Tesis en opción al título de Lic en Microbiología: Caracterización molecular de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* con actividad larvicida contra mosquitos. Autor: Celeste Ramírez Cardentey. Fac. Biología UH, La Habana, Cuba. 2018.
4. Tesis en opción al título de Lic en Microbiología: Evaluación de diferentes condiciones de cultivo para incrementar la actividad larvicida del aislamiento nativo de *Bacillus thuringiensis* A21 en el control de *Aedes aegypti*. Autor: Ana Elizabeth Torres Cueto. Fac. Biología UH, La Habana, Cuba. 2018.

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA QUE AVALA LOS RESULTADOS DE LA TESIS

PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS

1. Premio en la jornada científica de las BTJ IPK, La Habana, Cuba. 2010.

González A, Borrero Y, Diaz R, Diaz M, Bruzón RY, Menendez Z, Gato R. Caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquesfasciatus*

2. Resultado relevante Institucional IPK, La Habana, Cuba. 2013.

González A, Gato R, Díaz M, Bruzón RY, Rodriguez G, Salazar D, Companioni A, Menéndez Z. Aislamientos cubanos con elevada actividad entomopatógica contra *Aedes aegypti*

3. Premio en Fórum de Base (IPK) y Municipal de Ciencia y Técnica, La Lisa La Habana, Cuba. 2018.

González A, Ramirez C, Torres A E, Salcedo J, Companioni A, Menéndez Z. Comparación de dos métodos de extracción de ADN para la detección de genes cry y cyt en aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* con actividad larvicida contra dípteros

4. Resultado relevante Institucional IPK, La Habana, Cuba. 2019.

González A, Companioni A, Hernandez HM, Monzote L, Rodriguez MM, Castañet CE, Ramírez C, Torres AE, Menéndez Z, Anaya J, Garcia Garcia I, Iglesias A, Cantillo JD, Lorenzo C, Gato R. Selección de un aislamiento de *B. thuringiensis* para la elaboración de un pre-formulado para el control de *Ae. aegypti* en Cuba

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA QUE AVALA LOS RESULTADOS DE LA TESIS

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA: CONTROL BIOLÓGICO DE VECTORES

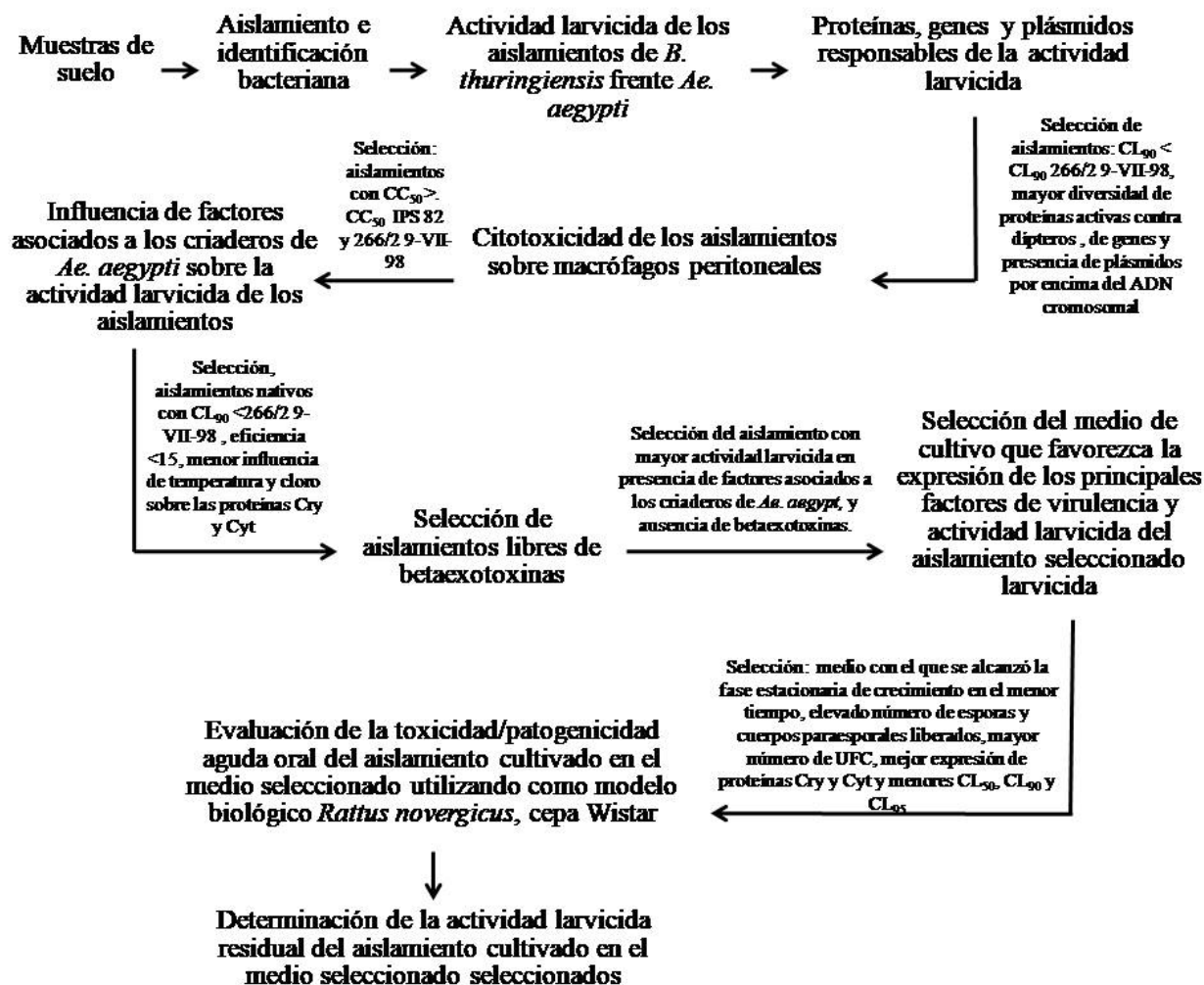
1. **González A**, Companioni A, Menéndez Z, Anaya J, García I, Lorenzo C, Castañet CE, Gato R. Evaluación de la eficacia larvicida de Rapidall NP3 (*Bacillus thuringiensis*) contra *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). Rev Cubana Med Trop. 2019; 71(1).
2. Companioni A, Peraza J, Menéndez Z, **González A**, López L X, Rodríguez A E, Cantillo J D, Núñez F A. Infection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Rattus rattus* (Rodentia: Muridae) in a locality of Havana, Cuba. Rev haban cienc méd. 2019; 18(2): 298-307.
3. Gato R, Lees R, Bruzón RY, Companioni A, Menéndez Z, **González A**, Rodríguez M. Large indoor cage study of the suppression of stable *Aedes aegypti* populations by the release of thiotepa-sterilised males. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014. 109(3): 365-370.
4. García I, Menéndez Z, Hernández N, García I, Anaya J, Companioni A, **González A**, Gato R. Susceptibilidad de larvas de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) a *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) en condiciones de laboratorio. Rev. Cubana. Med. Trop.2014; 66 (3): 453-457.
5. Gato R, Bruzón RY, Companioni A, Menéndez Z, **González A**, Rodríguez M. Release of thiotepa sterilized males into caged populations of *Aedes aegypti*: Life table analysis. Acta Trop. 2014; 132S S164–S169.
6. Corbillón CO, **González A**, Menéndez Z, Companioni A, Bruzón RY, Díaz M, Gato R. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis*

var.*israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Cubana Med Trop. 2012; 64(3): 235-243.

7. Gato R, Díaz M, Bruzón RY, Menéndez Z, **González A**, Hernández Y, & García Ávila, I. Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Rev Cubana Med Trop, 2008; 60(1).

ANEXO II

Flujograma de Trabajo



ANEXO III

Tinción de Gram, Catalasa, Lecitinasa

Tinción de Gram

Reactivos: violeta cristal, lugol de Gram, safranina (Merck, Alemania)

Procedimiento según el fabricante

- A partir de una colonia del cultivo bacteriano puro se preparó un frotis y calentó suavemente para fijar al portaobjetos.
- Se inundó el portaobjetos con 0,5% de violeta cristal y dejó actuar durante 1 min
- Posteriormente, el portaobjetos se inclinó y se enjuagó suavemente con agua
- Una vez retirado el exceso de violeta cristal, se inundó el portaobjetos con suficiente suficiente lugol de yodo (1%) (Conocido como yodo de Gram) y se dejó reposar durante 1 min.
- Se inclinó el portaobjetos para eliminar el exceso de lugol y se lavó con agua
- La decoloración se llevó a cabo con una mezcla de etanol-acetona al 95 - 100% hasta que el colorante violeta cristal desapareció del frotis
- Se enjuagó con agua
- Se inundó el portaobjetos con una contratinción de safranina al 0,1% y se dejó actuar de 30 s a 1 min.
- Se lavó cuidadosamente con agua.
- Se dejó secar a 50°C en la estufa.

Interpretación

Se observó el frotis al microscopio con un objetivo 100X

Los organismos Gram positivos se tiñeron de azul oscuro / violeta, los Gram variables violeta/rosa y los organismos Gram negativos se tiñeron de rosa / rojo. Adicionalmente, se determinó la morfología de la célula vegetativa (cocos, bacilos, cocobacilos), agrupación, presencia de esporas y cuerpos paraesporales.

Tinción de Gram, Catalasa, Lecitinasa

Catalasa

Reactivos: peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Merck, Alemania)

Procedimiento

La prueba de catalasa se realizó en portaobjetos, adicionando una gota de H₂O₂ al portaobjeto, posteriormente se adicionó una asada del cultivo y se observó la reacción (200).

Resultado

Se consideró como resultado positivo a la rápida formación de burbujas (200).

Tinción de Gram, Catalasa, Lecitinasa

Lecitinasa

Medio de cultivo

Agar yema de huevo

Base agar sangre (oxid, Inglaterra)- 20 g

H₂O destilada -500 mL

Se autoclaveó 121° C 15 minutos y se enfrió a 60°C. Posteriormente se añadieron 50 mL de emulsión de yema de huevo (oxid) estéril y se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea.

Procedimiento

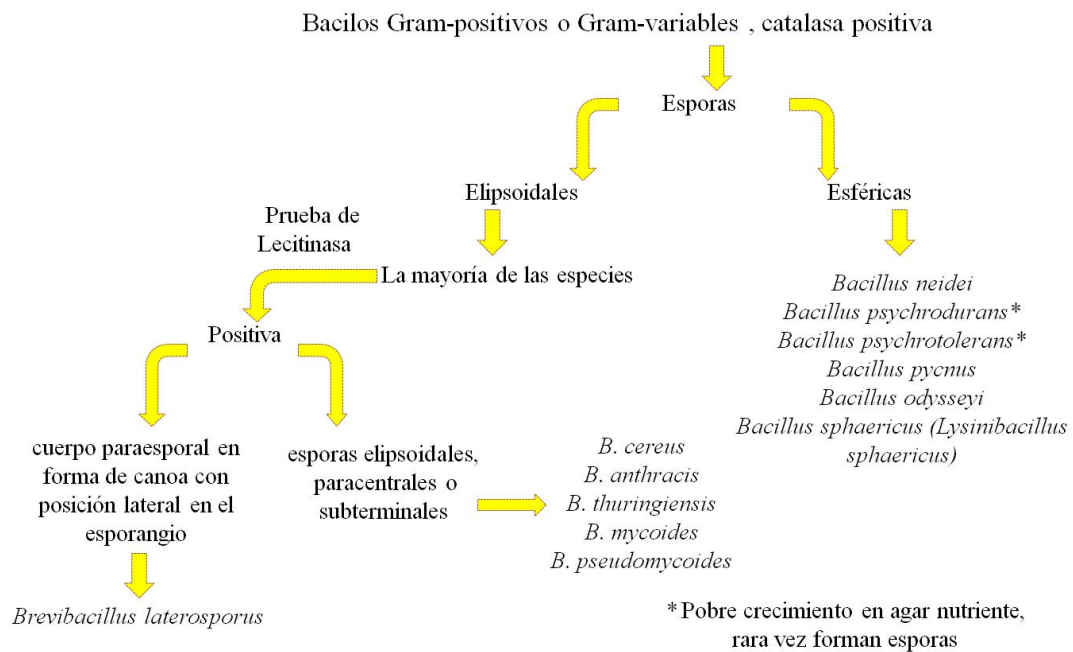
Se realizó una estría en una placa Petri que contenía agar yema de huevo con el microorganismo a identificar se incubó 37°C por 18 – 24 h.

Resultados

Se consideró lecitinasa positiva cuando apareció una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano como resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo.

ANEXO IV

Esquema de identificación primario de Bacilos Gram positivos o Gram variables esporulados



Grupo *B. cereus*: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus thuringiensis*

ANEXO V

Crecimiento en Agar sangre y actividad hemolítica

Medio de cultivo

Agar Sangre

Base agar sangre (oxoid)- 20 g

H₂O destilada -500 mL

Se autoclaveó a 121°C por 15 min y se refrescó hasta 50°C. Posteriormente, se añadieron 35 mL de sangre de carnero estéril.

Procedimiento

Con una asada del cultivo microbiano se realizó una siembra en una placa Petri conteniendo agar sangre, se incubó a 37°C por 18–24 h.

Resultados

Se observaron las características del crecimiento bacteriano (morfología y aspecto de las colonias) y la hemólisis alrededor de la zona de crecimiento.

Beta-hemólisis. Halo transparente en la zona del crecimiento bacteriano.

Alfa-hemólisis. Halo verdoso en torno a la zona del crecimiento bacteriano

Gamma-hemólisis. Ausencia de hemólisis.

ANEXO VI

Tabla. Características de las especies pertenecientes al grupo *B. cereus* en cuanto a: morfología de las colonias, actividad hemolítica y formación de cuerpos paraesporales (67, 69)

Especie	Morfología de las colonias en agar sangre	Actividad Hemolítica	Cuerpos paraesporales (cristales)
<i>Bacillus anthracis</i>	Colonias planas e irregulares, de 2 - 5 mm, color gris / blanco con apariencia de vidrio esmerilado.	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	Colonias de apariencia similar a las de <i>B. anthracis</i> , color crema - blanco o gris	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Colonias de apariencia similar a las de <i>B. anthracis</i> , color crema - blanco o gris con ligero tinte verde	+	+
<i>Bacillus mycoides</i>	Colonias adherentes de aspecto rizoide o peludo, se extienden por todo el agar y cubren toda la superficie del medio en 48 horas.	(+)	-
<i>Bacillus pseudomycoides</i>	Colonias adherentes de aspecto rizoide o peludo, se extienden por todo el agar y cubren toda la superficie del medio en 48 horas.	(+)	

(+). Usualmente débil positiva

ANEXO VII

Certificado del Comité de ética Institucional



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURÍ"**
Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios
Para el estudio de las Enfermedades Viricas
En Tuberculosis y Micobacterias

**INSTITUTO
Pedro Kourí**

COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 21-16

"Caracterización de aislamientos autóctonos de *Bacillus thuringiensis*: Potencialidades para el control biológico de *Aedes aegypti*"

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Lic Aileen González Rizo

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.
3. Se aprueba el protocolo presentado

Dado, en el IPK, La Habana, a los 11 días del mes de abril de 2016

DrCs. Eric Martínez Torres
Presidente

DrCs. Pedro Mas Bermejo
Vicepresidente

DrC. Iliana Valdés Hernández
Secretaría

DrC. Ana Margarita Montalvo Alvarez
Miembro

DrC. María Caridad Montalvo Villalva
Miembro

ANEXO VIII

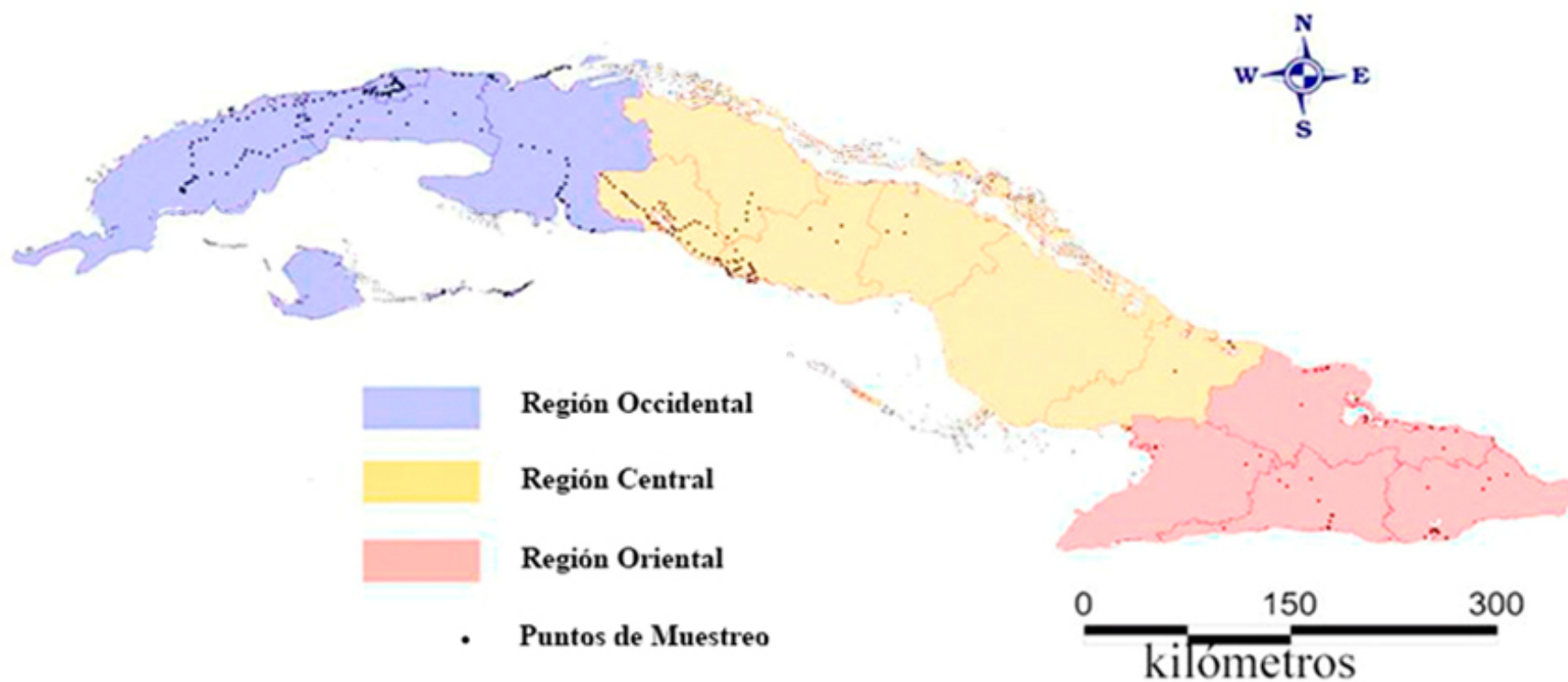


Figura. Distribución de las muestras de suelo colectadas del archipiélago cubano.

ANEXO IX -Tabla. Resultados de las pruebas de los aislamientos de *B. thuringiensis* con actividad larvicida, presencia de cuerpos paraesporales, lecitinasa, hemólisis en Agar sangre y perfil bioquímico mediante sistema API

Aislamientos/ cepas	Presencia de cuerpos para esporales ^a	Lecitinasa ^b	Aspecto/ Coloración de las colonias/ Hemólisis en Agar Sangre ^c	Glicerol*	Eritrol*	D- arabinosa*	L- arabinosa*
A21	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
A51	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	+	-	-
C17	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
L95	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
L910	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
M29	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
M910	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
O89	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
R84	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
R85	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
R87	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
R89	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
T22	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
T31	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
T36	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
T39	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
T52	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
U81	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
X48	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	-	-	-	-
IPS	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-
266/2	+	+	Planas/Gris /Beta-hemólisis	+	-	-	-

*Pruebas bioquímicas de la galería API, ^{a, b, c.} * Pruebas utilizadas en la identificación de la especie *B. thuringiensis*

Tabla. Resultados de las pruebas de los aislamientos de *B. thuringiensis* con actividad larvicida, presencia de cuerpos paraesporales, lecitinasa, hemólisis en Agar sangre y perfil bioquímico mediante sistema API

Aislamientos/ cepas	Ribosa*	D- Xilosa*	L- Xilosa*	Adonitol*	Metil Xilosa*	Galactosa*	Glucosa*	Fructuosa*	Manosa*	Sorbosa*	Ramnosa*
A21	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
A51	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
C17	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
L95	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
L910	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
M29	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
M910	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
O89	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R84	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R85	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R87	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R89	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
T22	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
T31	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
T36	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
T39	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
T52	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
U81	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
X48	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
IPS	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
266/2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-

*Pruebas bioquímicas de la galería API, ^{a, b, c, *} Pruebas utilizadas en la identificación de la especie *B. thuringiensis*

Tabla. Resultados de las pruebas de los aislamientos de *B. thuringiensis* con actividad larvicida, presencia de cuerpos paraesporales, lecitinasa, hemólisis en Agar sangre y perfil bioquímico mediante sistema API

Aislamientos/ cepas	Dulcitol*	Inositol*	Manitol*	Sorbitol*	Metil- manosa*	Metil – glucosa*	N-acetil- glucosamina*	Amigdalina*	Arbutina*	Esculina*
A21	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A51	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
C17	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
L95	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
L910	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
M29	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
M910	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
O89	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
R84	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
R85	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
R87	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
R89	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
T22	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
T31	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
T36	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
T39	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
T52	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
U81	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
X48	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
IPS	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
266/2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

*Pruebas bioquímicas de la galería API, ^{a, b, c, *} Pruebas utilizadas en la identificación de la especie *B. thuringiensis*

Tabla. Resultados de las pruebas de los aislamientos de *B. thuringiensis* con actividad larvicida, presencia de cuerpos paraesporales, lecitinasa, hemólisis en Agar sangre y perfil bioquímico mediante sistema API

Aislamientos/ cepas	Salicina*	Celobiosa*	Maltosa*	Lactosa*	Melobiosa*	Sacarosa*	Trealosa*	Inulina*	Melizitosa*	Rafinosa*
A21	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
A51	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C17	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
L95	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
L910	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
M29	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
M910	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
O89	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
R84	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
R85	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
R87	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
R89	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
T22	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
T31	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
T36	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
T39	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
T52	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
U81	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
X48	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
IPS	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
266/2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-

*Pruebas bioquímicas de la galería API, ^{a, b, c, *} Pruebas utilizadas en la identificación de la especie *B. thuringiensis*

Tabla. Resultados de las pruebas de los aislamientos de *B. thuringiensis* con actividad larvicida, presencia de cuerpos paraesporales, lecitinasa, hemólisis en Agar sangre y perfil bioquímico mediante sistema API

Aislamientos/ cepas	Almidón*	Glucógeno *	Xilitol*	Gentobiosa*	Turanosa*	Lyxosa*	D- Tagosa*	D- Fucosa*	L- Fucosa*	D- Arabitol*
A21	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A51	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L95	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L910	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M29	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M910	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
O89	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R84	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R85	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R87	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R89	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T36	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U81	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
X48	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IPS	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
266/2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

*Pruebas bioquímicas de la galería API, ^{a, b, c, *} Pruebas utilizadas en la identificación de la especie *B. thuringiensis*

Tabla. Resultados de las pruebas de los aislamientos de *B. thuringiensis* con actividad larvívica, presencia de cuerpos paraesporales, lecitinasa, hemólisis en Agar sangre y perfil bioquímico mediante sistema API

Aislamientos/ cepas	L- Arabitol*	Gluconato*	2- Ketogluconato*	5- Ketogluconato*	Resultado sistema API web Confiabilidad %	Identificación final
A21	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 93%	<i>B. thuringiensis</i>
A51	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 83,5%	<i>B. thuringiensis</i>
C17	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 93,2%	<i>B. thuringiensis</i>
L95	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 84,4%	<i>B. thuringiensis</i>
L910	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 94,1%	<i>B. thuringiensis</i>
M29	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 96,5%	<i>B. thuringiensis</i>
M910	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 96,5%	<i>B. thuringiensis</i>
O89	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 74,4%	<i>B. thuringiensis</i>
R84	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 96,5%	<i>B. thuringiensis</i>
R85	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 94,9%	<i>B. thuringiensis</i>
R87	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 94,9%	<i>B. thuringiensis</i>
R89	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 96,5%	<i>B. thuringiensis</i>
T22	-	+	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 96,7%	<i>B. thuringiensis</i>
T31	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 37,2%	<i>B. thuringiensis</i>
T36	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 60,6%	<i>B. thuringiensis</i>
T39	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 79,2%	<i>B. thuringiensis</i>
T52	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 84%	<i>B. thuringiensis</i>
U81	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 96,5%	<i>B. thuringiensis</i>
X48	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. anthracis</i> 84,9%	<i>B. thuringiensis</i>
IPS	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 94,9%	<i>B. thuringiensis</i>
266/2	-	-	-	-	Posible <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> 96,5%	<i>B. thuringiensis</i>

*Pruebas bioquímicas de la galería API, ^{a, b, c, *} Pruebas utilizadas en la identificación de la especie *B. thuringiensis*