

Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Influence of biotic factors on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

MSc. Carlos Orlando Corbillón Porraspita,^I MSc. Aileen González Rizo,^{II} MSc. Zulema Menéndez Díaz,^{II} MSc. Ariamys Companioni Ibañez,^{II} Téc. Rosa Yirian Bruzón Águila,^{II} MSc. Manuel Díaz Pérez,^{II} MSc. René Gato Armas^{II}

^I Laboratorio de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas (LABIOFAM). La Habana, Cuba.

^{II} Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: *Bacillus thuringiensis* H-14 ha mostrado alta eficacia sobre las larvas de *Aedes aegypti*, pero su efectividad puede ser influida por numerosos factores. El conocimiento de estos es de gran importancia porque permite optimizar los parámetros de aplicación en condiciones reales, para garantizar la eficiencia de los tratamientos y reducir el impacto ambiental.

Objetivo: evaluar la influencia de los factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 contra las larvas de *Aedes aegypti*.

Métodos: se realizó un estudio experimental mediante bioensayos de laboratorio, siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud. Se evaluó la influencia de la disponibilidad de alimento, densidad y estadio larvario sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 para *Aedes aegypti*. Se utilizó un biolarvicida comercial (Bactivec, Labiofam) y una cepa de referencia de *Aedes aegypti* (Rockefeller).

Resultados: la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 fue menor en la medida en que avanzó la densidad y el estadio de desarrollo larvario, lo que puede estar en relación con la conducta de alimentación y la disponibilidad del principio activo. La presencia abundante de alimento también limita la eficacia por un efecto de competencia.

Conclusiones: la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 se afectó por la disponibilidad de alimento, el estadio de desarrollo y la densidad larvaria, por lo que debe tenerse en cuenta esto para las aplicaciones del biolarvícida en el terreno.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, biolarvícida, factores bióticos, bioensayos.

ABSTRACT

Introduction: *Bacillus thuringiensis* H-14 has shown high efficacy on *Aedes aegypti* larvae. But a number of factors could affect its effectiveness. Knowing these factors is of vital importance for improving the application parameters in real conditions in order to guarantee the treatment's efficiency and to reduce environmental impact.

Objective: to evaluate the influence of some biotic factors on *Bacillus thuringiensis* H-14 efficacy against *Aedes aegypti* (Rockefeller).

Methods: an experimental study was conducted following the WHO guidelines. The influence of the food availability, the larval density and the larval staging was evaluated on laboratory bioassays. A commercial *Bacillus thuringiensis* H-14 formulation against a reference *Aedes aegypti* strain was used.

Results: the efficacy of *Bacillus thuringiensis* H-14 decreased in a linear manner with increasing larval density and development stage. This could be related to food intake and availability of the active principle. Competition in food intake resulted in lower efficacy of *Bacillus thuringiensis* H-14 applications.

Conclusions: the *Bacillus thuringiensis* H-14 efficacy was affected for the availability of food, the larval development stage and the larval density, so all this should be borne in mind when applying the biolarvicide *in situ*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, biolarvícides, biotic factors, bioassays.

INTRODUCCIÓN

El dengue es un problema de salud pública con graves consecuencias económicas y sociales, en las Américas es transmitido al hombre a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae).¹ El control del vector continúa siendo un problema a pesar del desarrollo de nuevas moléculas y formulaciones de insecticidas químicos, debido al negativo impacto ambiental, el costo económico y la resistencia desarrollada por los insectos a estos productos.² Actualmente, los programas de control integrado son aceptados como la estrategia más viable, dentro de los cuales el control biológico desempeña un papel importante.³ Debido al comportamiento de *Ae. aegypti*, en especial el relacionado con los sitios de cría, las bacterias esporógenas productoras de toxinas se presentan como una alternativa atractiva. El serotipo H-14 de *Bacillus thuringiensis*, también conocido por variedad *israelensis* (*B. thuringiensis* H-14) es el agente más usado desde la década de los setenta.⁴ Sin embargo, la efectividad de *B. thuringiensis* H-14 depende, en gran medida, de la eficiencia del proceso productivo y la formulación, en especial su naturaleza física.⁵

En Cuba se ha utilizado un larvicida sobre la base de *B. thuringiensis* H-14 para el control de diversas especies de mosquitos (Bactivec). En este trabajo se evaluó la influencia de algunos factores bióticos (estadio de desarrollo, disponibilidad de alimentos y densidad larvaria) sobre la eficacia de *B. thuringiensis* H-14 contra larvas de *Ae. aegypti*.

MÉTODOS

Bioensayos: se realizaron siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁶

Mosquitos: *Ae. aegypti*, cepa Rockefeller, mantenida en el insectario perteneciente al Departamento de Control de Vectores del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

Biolarvicida: Bactivec (Labiofam, Cuba), suspensión acuosa sobre la base de *B. thuringiensis* H-14; cepa 266/2. Lote 110516062 (presentado en frascos de 30 mL, potencia 600 UTI/mL, concentración: 0,6 %, título $1,2 \times 10^9$ UFC/mL).

Determinación de la dosis de Bactivec: se realizaron 3 bioensayos en semanas diferentes, utilizando 12 dosis comprendidas desde 0,00022 % hasta 0,00268 % con un factor de diferencia de 0,7. Los resultados (mortalidad larvaria) se procesaron mediante análisis de regresión, utilizando el procedimiento *Análisis Probit* del programa *Number Cruncher Statistical Systems* (NCSS 2004).

Se establecieron las dosis para los bioensayos ulteriores de evaluación de la influencia de los factores bióticos en: 0,00089 %; 0,00044 % y 0,00178 %, que representan la concentración letal 50 (CL-50), con su mitad y su doble, respectivamente.

Grupos para los bioensayos: el grupo problema se conformó con cuatro réplicas para cada variable del factor a evaluar, que fueron expuestas a las diferentes dosis del biolarvicida; el grupo control se constituyó por cuatro recipientes a los que no se le aplicó el biolarvicida.

A continuación se describen las variables del estudio, correspondientes a los factores que afectan la acción de los biolarvicidas, incluidos los parámetros seleccionados para su evaluación.

Factores	Escala de clasificación	Variables
Densidad larvaria	Cuantitativa discreta	2 389, 3 384, 4 9760, 6 967, 10 151 larvas/m ³
Estadio de desarrollo	Cualitativa	I, II, III y IV
Alimento	Cualitativa	Exposición y no exposición

Los resultados se registraron a las 24 h y se anotó la cantidad de larvas vivas.

Análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de mortalidad larvaria (corregido por la fórmula de Abbott cuando la mortalidad en los controles estuvo entre 5 y 10 %); se determinó la media aritmética, mediana, desviación estándar y curtosis.

Se compararon los variables de estadio y densidad larvaria mediante ANOVA de una vía, cuando existieron diferencias significativas se aplicó análisis pos hoc de Tukey. En el caso de la influencia del alimento se compararon las variables mediante t de Student.

RESULTADOS

Eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 en dependencia de la densidad larvaria

La mortalidad larvaria de *Ae. aegypti* por acción de *B. thuringiensis* H-14 disminuyó en la medida en que la densidad larvaria fue mayor. En la figura 1 se aprecia que a densidades larvarias de 2 389 larvas/m² se registró 91,67 % de mortalidad, diferente de 15,69 % observado para 10 151 larvas/m², lo cual fue significativo para $p < 0,05$ ($F = 25,22$; ANOVA). El análisis post hoc mediante una prueba de Tukey agrupó las cinco densidades larvarias evaluadas en dos subconjuntos homogéneos: constituidos por las tres menores y las dos mayores, respectivamente.

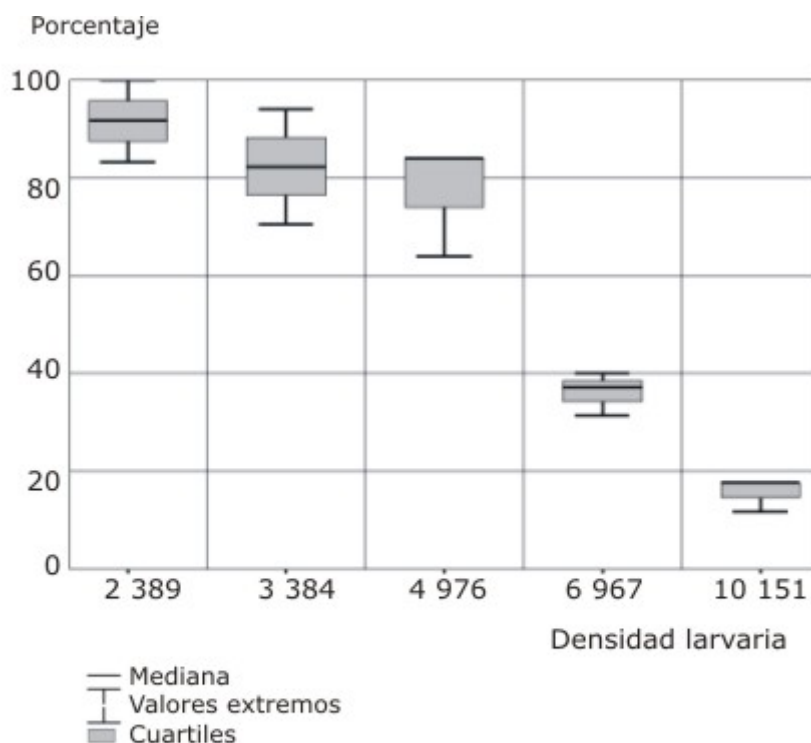


Fig. 1. Efecto de la densidad larvaria en la eficacia de *Bacillus thuringiensis* H-14 sobre *Aedes aegypti*.

Efecto del estadio larvario de Aedes aegypti sobre la acción larvicida de Bacillus thuringiensis H-14

En sentido general la susceptibilidad de *Ae. aegypti* fue menor conforme avanzó el estadio de desarrollo larvario, aunque el estadio uno se comportó de manera particular con valores menores que el segundo (Fig. 2). El análisis estadístico señaló diferencias significativas ($p < 0,05$; $F = 76$; ANOVA de una vía) y la prueba de Tukey evidenció diferencias entre los estadios II, III y IV, pero no entre el estadio I y II.

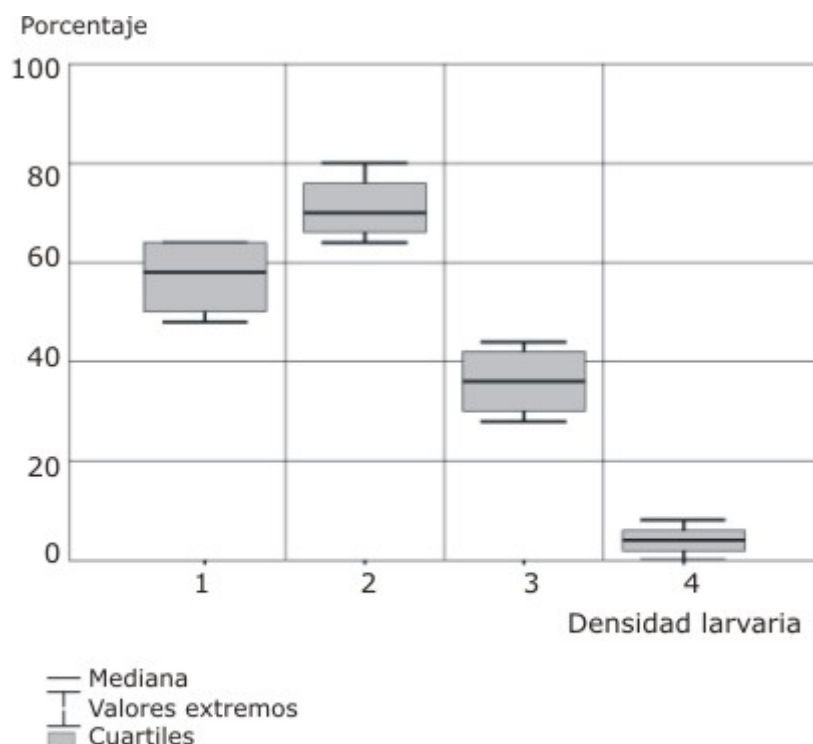


Fig. 2. Efecto del estadio larvario de *Aedes aegypti* sobre la acción larvicida de *Bacillus thuringiensis* H-14.

Influencia de la disponibilidad de alimento sobre la actividad larvicida de Bacillus thuringiensis H-14

El grupo provisto con alimento fue menos susceptible a morir que el que carecía de este. La mediana fue de 62 y 78 %, respectivamente, $p < 0,05$ ($t = 7,91$) (t de Student) (Fig. 3).

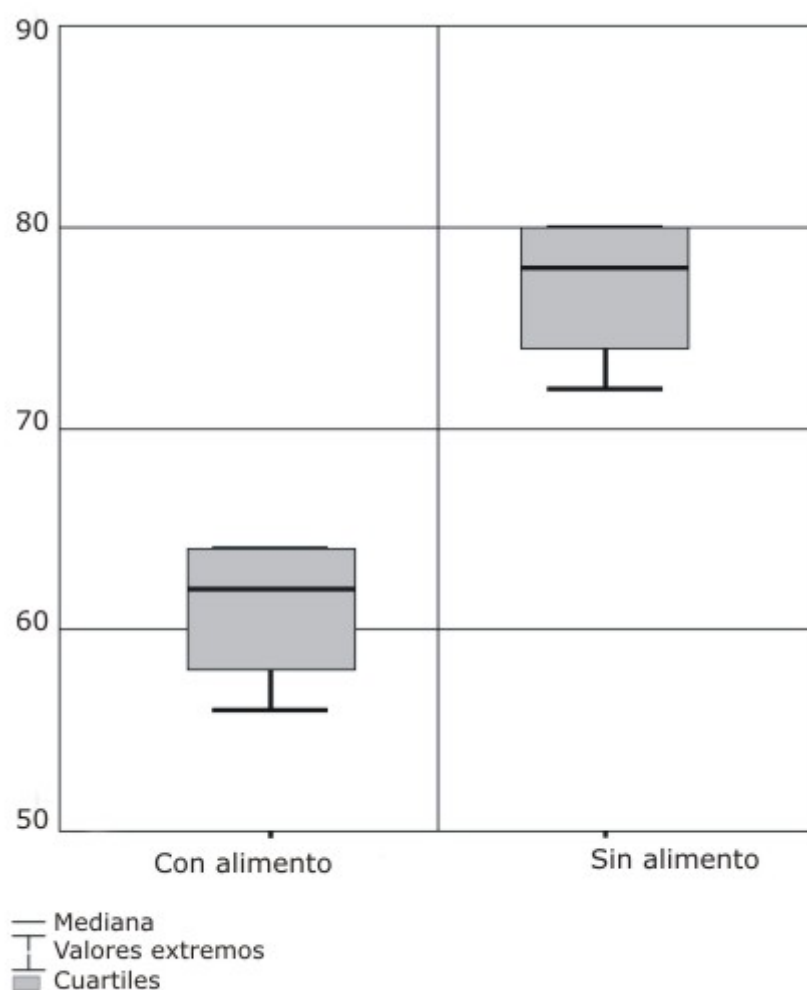


Fig. 3. Mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* por *Bacillus thuringiensis* H-14 en presencia y ausencia de alimento.

DISCUSIÓN

Un elemento importante a tener en cuenta en la interpretación de los resultados de este estudio es la condición de haber aplicado dosis subletales, recurso metodológico utilizado para hacer notables diferencias tan sutiles que, con dosis mayores, hubieran pasado inadvertidas por provocar 100 % de mortalidad en todos los grupos. Obviamente, esto tiene el inconveniente de que los principios activos de la formulación, dados por los factores de patogenicidad de *B. thuringiensis* H-14, quizá no estuvieron disponibles en magnitud equivalente a las diferencias entre los grupos evaluados, por ejemplo, entre desiguales superficies corporales o número de individuos.

Es de esperar que la dosis recomendada por el productor de un biolarvicida sea lo suficientemente elevada para garantizar el control, pero no excesiva porque el impacto ambiental sobre especies no objeto y el costo económico serían demasiado

grandes. Así, es imprescindible conocer los factores que afectan la eficacia de un biolarvícida para la elección de una dosis de aplicación óptima, particularizando en cada caso. Por una parte, porque en condiciones reales, la concurrencia de varios de esos factores podrían reducir o incluso anular la efectividad y, por la otra, porque la utilización rutinaria de dosis elevadas es ineficiente en términos económicos y puede tener un impacto ambiental negativo.

En este estudio se demostró que el incremento de la densidad larvaria ejerce un efecto inverso con respecto a la actividad larvícida del *B. thuringiensis* H-14. En criaderos con elevada densidad sería conveniente incrementar las dosis de aplicación de *B. thuringiensis* H-14. Similares resultados se observaron en las larvas de tercer estadio de *Ochlerotatus taeniorhynchus*, en los cuales aumentó 8 veces la CL-50 cuando la densidad larvaria lo hizo solo 5 veces.⁷ Otros estudios han mostrado dependencia entre la densidad larvaria y los valores de CL-50 de *B. thuringiensis* H-14, contra las especies *Culex nigripalpus* y *Ae. aegypti*.^{8,9}

Este fenómeno podría deberse a que el principio activo de *B. thuringiensis* H-14, debe ser ingerido por las larvas para ejercer su efecto, entonces a mayor densidad larvaria, es mayor la competencia por el producto y puede llegar el momento en que se consume la suficiente cantidad hasta agotarlo, sin que llegue a su concentración letal. Estos resultados indican que las dosis de *B. thuringiensis* H-14 deben ser ajustadas de acuerdo con la densidad larvaria,⁷ esta es última estimada utilizando el método del cucharón, recomendado por la OMS (1999).⁶

Se ha descrito mayor efectividad de *B. thuringiensis* sobre los estadios tempranos de desarrollo de diferentes especies de insectos,¹⁰⁻¹² similar a lo observado en el presente estudio para los estadios del II al IV. Al parecer la mayor talla y fortaleza física de las larvas de estadios tardíos le permiten tolerar las toxinas durante mayor tiempo. En contraste, las larvas recién eclosionadas, a pesar de su mínima envergadura, mostraron menor susceptibilidad que las del estadio subsiguiente; lo que está en relación con su comportamiento de alimentación. Estas larvas permanecen mayor tiempo en la superficie, ingieren menor cantidad de partículas de la formulación, porque esta sedimenta rápidamente.¹⁰

Se ha reportado para el VectoBac 12AS contra *Culex nigripalpus* y *Ochlerotatus taeniorhynchus* que las larvas de II estadio fueron 5,5 y 7,5 veces más susceptibles que sus contrapartes de IV.⁷ De acuerdo con lo descrito por otros autores las larvas de IV estadio tardío disminuyen sensiblemente la actividad de alimentación y se hacen menos propensas a morir. En pupas la alimentación cesa del todo y dejan de ser susceptibles a *B. thuringiensis* H-14.¹⁰ La mortalidad por *B. thuringiensis* H-14 es también menor en la medida en que aumenta el estadio en otras familias de insectos, tal como reportan Lei y otros.¹³

Con respecto a la influencia de la disponibilidad de alimento Aly reportó disminución en la susceptibilidad a *B. thuringiensis* H-14 en larvas provistas de harina de pescado en distintas concentraciones, desde 80 % de mortalidad en la menor concentración hasta 10 % en la mayor.¹⁴ Resultados análogos fueron mostrados por Becker y otros en 1992, para *B. thuringiensis* H-14 frente a *Ae. vexans*, *Ae. aegypti* y *Culex pipiens*.⁸ Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio donde se pudo apreciar disminución de la eficacia del biolarvícida en el grupo alimentado con respecto al que no se le suministró alimento durante el experimento.

Hay dos explicaciones posibles para este efecto. Las larvas bien alimentadas serán obviamente más saludables y por tanto estarán en capacidad de resistir hasta cierto punto el complejo mecanismo de acción del *B. thuringiensis* H-14. Pero si se

tiene en cuenta que *Ae. aegypti* habita con preferencia en agua limpia y encuentra en esta los sustratos necesarios para su desarrollo, entonces quizá un efecto de competencia, en virtud del cual la larva incorpora menos unidades de principio activo, desempeña un papel predominante.

Se llegó a la conclusión de que la eficacia de *B. thuringiensis* H-14 es afectada por diferentes factores bióticos como son la disponibilidad de alimento, el estadio y la densidad larvaria; esto debe tenerse en cuenta para la elección de las dosis de biolarvicidas para garantizar el control del vector con el menor costo económico y ecológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akbar NA, Allende I, Balmaseda A, Coelho IC, da Cunha RV, Datta B, et al. Regarding "Dengue-How Best to Classify It". Clin Infect Dis. 2011;53:563-7.
2. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(3):467-77.
3. World Health Organization. Global strategic framework for integrated vector management. WHO document WHO/CDS/CPE/PVC/2004.10. Geneva: WHO; 2004. Available in: <http://www.paho.org/spanish/gov/ce/ce142-24-s.pdf>
4. Polanczyk PA, de Oliveira M, Batista S. Potential of *Bacillus thuringiensis* H-14 *israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. Rev Saude Pub. 2003;37(6):813-6.
5. Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23(2 Suppl):133-63.
6. WHO. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. Report of the WHO informal consultation. Geneva: WHO/HQ; 1999. Available in: http://www.who.int/whopes/resources/resources_1999/en/index.html
7. Nayar JK, Knight JW, Ali A, Carlson DB, O'Bryan PD. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. J Am Mosq Control Assoc. 1999;15(1):32-42.
8. Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. J Am Mosq Control Assoc. 1992;8(3):285-9.
9. Mulla MS, Darwazehz HA, 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.
10. Boisvert M, Boisvert J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget. Biocontr Sci Technol. 2000;10:517-61.

11. Stevens MM, Akhurst RJ, Clifton MA, Hughesc PA. Factors affecting the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to fourth instar larvae of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae). J Invert Pathol. 2004;86:104-10.
12. Wraight S, Molloy D, Jamnback H, McCoy P. Effects of temperature and instar on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 against *Aedes stimulans* larvae. J Invert Pathol. 1981;38:78-87.
13. Lei P, Zhao WM, Yang SY, Zhang JS, Liu LJ. Impact of environmental factors on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 to *Chironomus kiiensis*. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21(1):59-63.
14. Aly C. Feeding behavior of *Aedes vexans* larvae (Diptera: Culicidae) and its influence on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*. Bull Soc Vector Ecol. 1983;8(2):94-100.

Recibido: 10 de noviembre de 2011.

Aprobado: 24 de mayo de 2012.

Carlos Orlando Corbillón Porraspita. Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas, LABIOFAM. Ave. Independencia, Km 16 ½. Boyeros. La Habana, Cuba Teléf.: +537 683 0326/683 0391. Fax: +537 683 0326. Correo electrónico: sharp@princesa.pri.sld.cu