

**Evaluación de la eficacia larvicida de Rapidall NP3 (*Bacillus thuringiensis*)
contra *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) en condiciones
de laboratorio**

Evaluation of the larvicidal efficacy of Rapidall NP3 (*Bacillus thuringiensis*)
against *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions

Aileen González Rizo^{1*}

Ariamys Companioni Ibañez¹

Zulema Menéndez Díaz¹

Jorge Anaya Martínez¹

Israel García García¹

Claudia M Lorenzo Borjas¹

Camilo Ernesto Castañet¹

Rene Gato Armas¹

¹ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

*Autor de la correspondencia. Correo electrónico: aileen@ipk.sld.cu

RESUMEN

Los mosquitos son vectores transmisores de enfermedades como: dengue, zika y chikunguya. El control biológico es una alternativa viable a tener en cuenta por los programas de control. *Bacillus thuringiensis* es el microorganismo más usado en salud pública. Su efectividad como larvicida contra culicidos depende, en gran medida, de la eficiencia del proceso productivo. El objetivo es evaluar y comparar la eficacia larvicida contra *Aedes aegypti* de la formulación en polvo Rapidall NP3 con la del producto Bactivec[®], formulación líquida utilizada en Cuba. Se realizaron bioensayos de laboratorio según los procedimientos descritos y sugeridos por la OMS para determinar la eficacia, exponiendo las larvas a las

concentraciones recomendadas por los fabricantes de los productos Rapidall NP3 y Bactivec®. A los recipientes utilizados se les realizó recambio de agua medio, total y sin recambio, con una frecuencia semanal. A las 24 h se calculó la mortalidad obtenida y se analizó estadísticamente mediante un ANOVA de una vía; cuando existieron diferencias significativas se aplicó un análisis *Post-hoc* mediante la prueba de Tukey. El producto evaluado Rapidall NP3, provocó 100 % de mortalidad larvaria durante 11 semanas, independientemente de la proporción de recambio de agua, mientras que el Bactivec® solo provocó 100 % de mortalidad hasta las 6 semanas de iniciado el experimento. El biolarvicida Rapidall NP3 mostró buena eficacia y actividad residual prolongada al compararlo con Bactivec®, por lo que recomendamos su evaluación en el terreno en el control larvario de depósitos que constituyen sitios de cría habituales y que no pueden ser eliminados físicamente.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*; *Aedes aegypti*; control biológico; eficacia.

ABSTRACT

Mosquitoes are vectors of human diseases such as dengue, zika and chikungunya. Biological control is a viable alternative to be taken into account in control programs. *Bacillus thuringiensis* is the microorganism most commonly used in public health. Its effectiveness as a larvicide against culicids depends to a great extent to the production process. The objectives of the study were to evaluate and compare the larvicidal efficacy against *Aedes aegypti* of the Rapidall NP3 powder formulation with Bactivec®, a liquid formulation used in Cuba. Laboratory bioassays were conducted to determine efficacy following WHO protocols. Larvae were exposed to the concentrations recommended by Rapidall NP3 and Bactivec® manufacturers. The water in the containers used in the study was replaced once a week: half, whole and no replacement. At 24 hours mortality was estimated and statistically analysis were done by one-way ANOVA. When significant differences were found, post-hoc analysis was performed with Tukey's test. Rapidall NP3 caused 100% larval mortality for 11 weeks, regardless of the water replacement proportion, whereas Bactivec® caused 100 % mortality for only 6 weeks after the start of the experiment. When compared with Bactivec®, biolarvicide Rapidall NP3 displayed better efficacy and more prolonged residual activity. We therefore recommend its field evaluation for larval control of containers constituting habitual breeding sites which cannot be physically eliminated.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; *Aedes aegypti*; biological control; efficacy.

Recibido: 29/06/2018.

Aceptado: 05/10/2018.

Las enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti* (Linnaeus) como dengue, zika, chikunguya y fiebre amarilla constituyen uno de los principales problemas de salud en los países en desarrollo.⁽¹⁾ El control del vector mediante insecticidas químicos puede causar daños al ecosistema, siendo el control biológico una alternativa viable a tener en cuenta por los programas de vigilancia.⁽²⁾

Bacillus thuringiensis es el microorganismo más usado para el control biológico en salud pública.⁽³⁾ Sin embargo, su efectividad larvicida contra culícidos depende, en gran medida, de la formulación utilizada. Se han descrito numerosos factores (estadio larvario, temperatura, luz ultra violeta, calidad del agua, recambios de agua) que afectan la eficacia, efectividad y actividad residual, y se comportan de manera diferente en dependencia de la formulación del biolarvicida.^(4,5,6)

En Cuba, la Unidad Nacional de Vigilancia y Lucha Antivectorial del Ministerio de Salud Pública utiliza biolarvicidas líquidos para el control de larvas de culícidos. Bactivec® (LABIOFAM, Cuba) es el único en base a *B. thuringiensis* registrado para el control de mosquitos. Los principales sitios de cría de *Ae. aegypti* en Cuba son los depósitos de almacenamiento de agua para el consumo humano,^(7,8) donde el recambio de agua es frecuente y el principio activo del biolarvicida se elimina, quedando expuesto a la reinfestación. Esto conlleva a que el programa cubano de control del vector incremente la frecuencia de los tratamientos. Por lo que evaluar y comparar la eficacia larvicida contra *Ae. aegypti* de la formulación en polvo Rapidall NP3 (Earth Alive Clean Technologies, principio activo *B. thuringiensis* var *israelensis*) con la del producto Bactivec® (LABIOFAM, *B. thuringiensis* var *israelensis* H14 ingrediente activo) es de gran utilidad para su introducción como alternativa de control.

Los bioensayos de laboratorio se realizaron con la cepa de mosquito Rockefeller de *Ae. aegypti* (referencia internacional de susceptibilidad a insecticidas), estadio larvario III-IV, 50 larvas por recipiente.

Selección de la dosis: Se ajustó de manera proporcional a la recomendación de los fabricantes. Se aplicó directamente en el agua, una sola vez al inicio del experimento. Biolarvicida a evaluar: Rapidall NP3 (Earth Alive Clean Technologies, principio activo *B. thuringiensis* var *israelensis*), formulación en polvo, dosis 98 mg en 8 L de agua.

Biolarvicida de referencia: Bactivec® (LABIOFAM, Cuba), formulación líquida en base a *B. thuringiensis* serotipo H-14, utilizada en el control de *Ae. aegypti*, dosis 160 µL en 8 L de agua.

Se realizaron cuatro réplicas de los bioensayos de laboratorio, en recipientes plásticos con 8 L de agua, previamente declorinada por reposo durante 72 h.

Los bioensayos se llevaron a cabo con temperatura y humedad controlada a 26 °C (± 2 °C) y 55 % de humedad relativa. A los recipientes utilizados se les se realizó recambio de agua medio, total y sin recambio, con una frecuencia semanal. Las larvas se adicionaron 24 h después del recambio de agua y se contó la supervivencia a las 24 h siguiendo los procedimientos descritos por la OMS.⁽⁹⁾ Para obtener el valor de mortalidad larval, al total de larvas adicionadas en cada recipiente se les restó el número de larvas supervivientes y se expresó en tanto por ciento. Se utilizaron recipientes controles en similares condiciones, para verificar la supervivencia de las larvas sin la adición de biolarvicidas. El porcentaje de mortalidad larvaria fue corregido mediante la fórmula de Abbott cuando se observó mortalidad en los controles entre 5 % y 10 %. La mortalidad obtenida se analizó estadísticamente mediante un ANOVA de una vía y, cuando existieron diferencias significativas se aplicó análisis *Post-hoc* mediante la prueba de Tukey.

Rapidall NP3 provocó 100 % de mortalidad larvaria durante 11 semanas, independientemente de la proporción de recambio de agua. Posterior a este tiempo la actividad larvicida comenzó a disminuir sin diferencias significativas entre los grupos analizados ($p > 0,05$). Con el biolarvicida de referencia solo se alcanzó 100 % de mortalidad durante las primeras 6 semanas en el grupo sin recambio de agua, con diferencias significativas en cuanto a la mortalidad larvaria en relación con la proporción de recambio de agua ($p < 0.05$) (tabla). Se detectaron diferencias significativas en la mortalidad ($p < 0.05$) entre los grupos de recambio total y recambio medio de agua al comparar la acción larvicida de los dos productos empleados a partir de la sexta semana y sin recambio de agua a partir de la séptima semana de iniciado el experimento (tabla). El experimento se detuvo cuando el porcentaje de mortalidad larvaria

disminuyó al 50 %, porque por debajo de ese nivel no es relevante para un programa de control.

Uno de los mayores problemas para la utilización de los productos biológicos en base a *B. thuringiensis*, es la corta actividad residual en los sitios tratados, especialmente cuando se realizan recambios de agua frecuentes.⁽¹⁰⁾

Tabla - Porcentaje de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a las dos formulaciones evaluadas de *B. thuringiensis*

| Semana | Recambio de agua | | | | | |
|--------|------------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | Recambio total | | Recambio medio | | Sin recambio | |
| | % de mortalidad | | % de mortalidad | | % de mortalidad | |
| | Rapidall | Bactivec® | Rapidall | Bactivec® | Rapidall | Bactivec® |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6 | 100 | 54 | 100 | 63 | 100 | 100 |
| 7 | 100 | 29 | 100 | 53 | 100 | 88 |
| 8 | 100 | 23 | 100 | 31 | 100 | 74 |
| 9 | 100 | - | 100 | - | 100 | - |
| 10 | 100 | - | 100 | - | 100 | - |
| 11 | 100 | - | 100 | - | 100 | - |
| 12 | 97 | - | 96 | - | 81 | - |
| 13 | 93 | - | 92 | - | 84 | - |
| 14 | 82 | - | 82 | - | 74 | - |
| 15 | 76 | - | 84 | - | 78 | - |
| 16 | 40 | - | 54 | - | 63 | - |

Cetin y otros en 2015, informaron mortalidad de más del 96 % con VectoMax® WSP (producto que contiene una mezcla de *B. thuringiensis* cepa AM65-52 y *B. sphaericus* cepa ABTS 1743) a los 24 días de iniciado el experimento, sin recambio del contenido inicial de agua.⁽¹¹⁾ Otros autores alcanzaron con VectoBac WDG (formulación seca de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* cepa AM65-52, en gránulos dispersables en agua) 16 mg/L, y VBC-60066 (Bactimos PT Larvicida biológico pellet extrudido ingrediente activo *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, cepa AM65-52) 80 mg/L, bajo condiciones de laboratorio por 180 días, el 100 % y 99,7 % de mortalidad, respectivamente.⁽¹²⁾ En estudios de campo esta efectividad disminuye debido a diversos factores que intervienen de manera negativa sobre la actividad larvicida,

como la lluvia, fluctuaciones de temperatura, presencia de materia orgánica, densidad larvaria.⁽¹³⁾

En Cambodia en un estudio de campo con VectoBac WG y VectoBac (suspensión acuosa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* cepa AM65-52) se registró una eficacia de 3 semanas para ambos productos pero sin recambios de agua.⁽¹⁴⁾ Ritchie y otros en 2010, detectaron en estudios de campo una mortalidad del 100 % tanto para VectoBac WG como para la solución acuosa en base a *B. thuringiensis* a 3 semanas de iniciado el experimento; después de este tiempo la eficacia y la residualidad de la solución acuosa se redujo.⁽¹³⁾ En este estudio en condiciones de laboratorio, pero simulando las condiciones de campo en cuanto a los recambios de agua, se obtuvo mayor eficacia y residualidad con el producto en polvo (Rapidall NP3) que con la solución acuosa utilizada como control.

El uso de *B. thuringiensis* continúa siendo factible para el control de las poblaciones naturales de *Ae. aegypti*,^(2,15,16,17) por el complejo modo de acción de las toxinas responsables de esta actividad larvicida.⁽¹⁸⁾ Las formulaciones con bajo contenido de agua son más estables para su conservación, fáciles de transportar y aplicar, y han mostrado elevada actividad larvicida ante recambios de agua en los sitios de cría de *Ae. aegypti*.⁽¹⁹⁾

El biolarvicida Rapidall NP3 (formulación en polvo) mostró buena eficacia y actividad residual prolongada al compararlo con Bactivec®; por lo que recomendamos su evaluación en el terreno para control larvario en depósitos que constituyen sitios de cría habituales y que no pueden ser eliminados físicamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Mittal PK. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. J Vector Borne Dis. 2003;40(1-2):20-32.
3. Ben Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins (Basel). 2014;64(6):1222-43.

4. 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.
5. 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.
6. 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 Med Trop. 2012;64(3):235-43.
7. Aguilera L, González M, Marquetti M, Capín J, Fustes C. Incidencia de *Aedes* (S) *aegypti* y otros culícidos en el municipio Playa, Ciudad de La Habana. Rev Cubana Med Trop. 2000;52(3):174-9.
8. Marquetti M, Fuster C, Martín I. Distribución espacial y temporal de los sitios de cría de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* (Diptera:culicidae) en Pinar del Río, Cuba. Rev Biomed. 2014;25:54-67.
9. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2005. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.3.
10. Tamilselvan S, Jambulingam P, Manoharan V, Shanmugasundaram R, Vivekanandan G, Manonmani AM. Fly ash based *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation for use against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in natural ecosystems. J Vector Borne Dis. 2015;52:193-200.
11. 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.
12. 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*. Journal of the American Mosquito Control Association. 2013;29(4):385-8.

13. 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.
14. Seta 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.
15. 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.
16. 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 Cuba Med Trop.* 2012;64(3):324-9.
17. Li Y, Xu J, Zhong D, Zhang H, Yang W, Zhou G, et al. Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. *Parasites & Vectors.* 2018;11(1):4.
18. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins.* 2014;6(4):1222-43.
19. Harwood JF, Farooq M, Turnwall BT, Richardson AG. Evaluating Liquid and Granular *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Broadcast Applications for Controlling Vectors of Dengue and Chikungunya Viruses in Artificial Containers and Tree Holes. *Journal of Medical Entomology.* 2015;52(4):663-71.

Conflicto de intereses

Los autores no presentan conflicto de intereses en relación con el artículo.