

***B. thuringiensis* var. *israeliensis* (VECTOBAC G12) COMO  
CONTROL BIOLÓGICO EN LA ELIMINACIÓN DE LARVAS  
DE *A. aegypti* LINNAEUS 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)  
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO EN NEIVA -  
HUILA**



**YEIMIS YOANA MONTEALEGRE FIGUEROA  
JOSÉ WAGNER HERMOSA QUINTERO**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE EDUCACIÓN  
LICENCIATURA EN CIENCIAS NATURALES: BIOLOGÍA,  
QUÍMICA Y FÍSICA**

10/02/2014

***B. thuringiensis* var. *israeliensis* (VECTOBAC G12) COMO CONTROL  
BIOLÓGICO EN LA ELIMINACIÓN DE LARVAS DE *A. aegypti* LINNAEUS 1762  
(DIPTERA: CULICIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO  
EN NEIVA - HUILA**

**YEIMIS YOANA MONTEALEGRE FIGUEROA  
JOSÉ WAGNER HERMOSA QUINTERO**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE EDUCACIÓN  
LICENCIATURA EN CIENCIAS NATURALES: BIOLOGÍA, QUÍMICA Y FÍSICA  
NEIVA, HUILA  
2013**

***B. thuringiensis var. israeliensis* (VECTOBAC G12) COMO CONTROL  
BIOLÓGICO EN LA ELIMINACIÓN DE LARVAS DE *A. aegypti* LINNAEUS 1762  
(DIPTERA: CULICIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO  
EN NEIVA - HUILA**

**YEIMIS YOANA MONTEALEGRE FIGUEROA  
JOSÉ WAGNER HERMOSA QUINTERO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Licenciado en Educación Básica con Énfasis en Ciencias Naturales y  
Educación Ambiental**

**Directora  
Sonia Echeverry Hernández  
M.Sc. Microbiología**

**Codirector  
Alexander Carvajal Pinilla  
M.Sc. Biología**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE EDUCACIÓN  
LICENCIATURA EN CIENCIAS NATURALES: BIOLOGÍA, QUÍMICA Y FÍSICA  
NEIVA, HUILA  
2013**

---

---

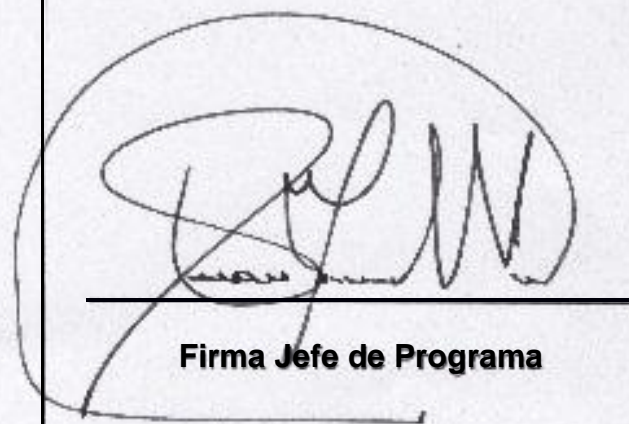
---

---

---

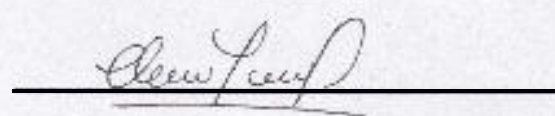
---

---



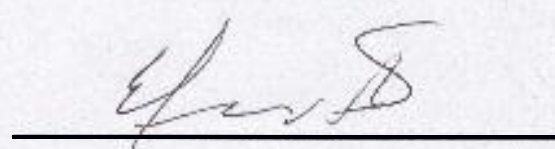
---

**Firma Jefe de Programa**



---

**Firma del Jurado**



---

**Firma del Jurado**

**Neiva, 10 de Febrero de 2014**

Nota de aceptación:

## DEDICATORIA

La vida me ha enseñado que para lograr lo que uno quiere, debe ser perseverante y nadar contra la corriente, contra lo que muchos quieren, pero no contra lo que yo quiero. Por eso hoy doy gracias a Dios porque por Él soy lo que soy hoy en día, cumpliendo mis sueños y llegando lejos. A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

Este peldaño que hoy escalo se lo dedico principalmente a mi madre, Amparo de Jesús Figueroa, por darme la vida, por enseñarme todo lo que se, por su templanza y verraquera, como dicen en su tierra, formándome y haciendo de mí una mujer llena de principios e ideales, pero ante todo una mujer soñadora. A mi padre Ramiro Montealegre, por su lucha constante, a mis hermanas Sandra y Yulieth, a quienes quiero mucho y siempre están ahí para darme sus consejos y escuchar los míos, y a mis hermanos Diego, Fabián y Jhon Freddy, a este último quien ha sido ejemplo de superación y modelo a seguir.

También a mi gran amigo, José Wagner quien siempre ha estado allí, jalándome las orejas, empujándome y motivándome, pues sin él esto no sería posible. También a todos mis amigos Fabián, Nany, Pinto, Laura Motta, Jonathan, Yolima, porque siempre han estado allí, apoyándome incondicionalmente.

Y a toda mi familia que son tantos y sé que sus consejos me han ayudado a tener en claro lo que quiero de la vida.

Yeimis Yoana Montealegre Figueroa

## DEDICATORIA

A quienes me encontré en la curva de este camino...

Al universo por ser prototipo de toda Creación

A mi madre Lisle por brindarme su amor y enseñarme los principios para la vida.

A mis hermanos por su apoyo y afecto recibidos en los buenos y no tan buenos momentos.

A mis sobrinos María Del Mar y Daniel Felipe por enseñarme que la vida no se mide por las veces que respiramos sino por los momentos gratos y agradables que vivimos a diario.

A Yeimis y su Familia por brindarme apoyo y acogerme como un miembro más de su familia.

A mis amigos Vivian, John, Sonia, y Saris Yuyeimis por compartir momentos de risas, llantos, alegrías y tristezas, por sus valiosos consejos en situaciones difíciles que he afrontado en este camino.

A PHUKA quien sustenta mi estado emocional y me brinda su amor y afecto en todo momento de mí existir y ser arquitecta de sonrisas.

A los caminantes, que sus huellas son grabadas y vistas por otros que se pierden.

José Wagner Hermosa Quintero

## **AGRADECIMIENTO**

Ingresar a la Universidad fue toda una experiencia grata para nuestra formación profesional, redescubrir lo que en realidad queríamos y soñábamos, es hacer posible estos sueños haciendo de nosotros personas integra con ideales claros.

Agradecemos; a nuestra alma mater, la Universidad Surcolombiana, USCO, por darnos la oportunidad de cumplir nuestras metas y hacer realidad nuestros sueños.

A nuestra asesora Sonia Echeverry Hernández, por hacer parte de este proyecto e impulsarnos para seguir adelante,

A el Magister, Alexander Carvajal Pinilla, por sus valiosas asesorías y darle luz al proyecto, pues gracias a su trayectoria y amplio conocimiento le dio bases sólidas al desarrollo y culminación.

A Fabiola María, coordinadora del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, pues sin su colaboración y apoyo incondicional, este proyecto no hubiera sido posible.

A mi gran amigo y parcerero del alma José Wagner pues su paciencia fue vital para mí.

A don Ezequiel Macías, coordinador del laboratorio de Biología de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana, por el aporte económico realizado al proyecto.

A Nuestros amigos y compañeros de lucha, quienes nos sacaron risas y también muchas canas, pero siempre estuvieron allí para darnos su apoyo; Fabián Rojas, Vivian Pérez, Juan Manuel Quizá, Juan camilo Pinto, Jonathan Mayorca, Laura Motta, Julián, Yuly, John Arce y a nuestras familia por su apoyo incondicional en la culminación de esta etapa de nuestras vidas.



## RESUMEN

El virus del dengue, es una enfermedad que aqueja desde hace varias décadas a regiones tropicales y especialmente a zonas de Colombia como el Huila; para combatirla se han diseñado diferentes estrategias con el fin de eliminar al mosquito vector *A. aegypti*, transmisor de este virus. Controles de tipo químico son usados en la actualidad, pero muchas veces sin éxito alguno, haciendo que el vector cree resistencia a estos productos, que causan efectos secundarios en la salud humana y daños irreversibles en ecosistemas.

El control biológico es una alternativa para el control de *A. aegypti* convirtiéndose en una herramienta amigable para el hombre y el ambiente. *B. thuringiensis var israeliensis*, (*Bti*) bacteria anaeróbica facultativa, se utilizó como control biológico para la eliminación de larvas de *A. aegypti*. VECTOBAC G12, producto comercial en el cual se encuentra el *Bti* liofilizado, se usó en condiciones de laboratorio manejando diferentes dosis, desde 0,1 miligramos hasta 0,000001 miligramos encontrando de esta manera la dosis media letal ( $DL_{50}$ ) para eliminar las larvas in vitro, correspondiendo a la concentración de 0,0001 gramos. Adicionalmente se evaluó la residualidad del producto frente al recambio de agua, teniendo resultados de aproximadamente dos meses de mortalidad de larvas y persistencia del producto.

## ABSTRACT

Dengue virus is a disease that afflicts Huilense society for several decades and is designed to combat various strategies to eliminate the leggy *A. aegypti*, the transmitter of the virus. Chemical type controls are used at present, but often without success, making the vector become resistant to these products, which cause side effects on human health and irreversible damage to ecosystems.

Biological control is an alternative to combat the mosquito, making it a friendly tool for man and the environment. *B. thuringiensis var israelensis* (Bti) facultative anaerobic bacteria, whose origin is in the ground, was used as a biological control for the elimination of *A. aegypti* larvae. VECTOBAC G12 , commercial product which is lyophilized *Bti* was used in laboratory conditions managing different concentrations ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  , thereby finding the median lethal dose ( $LD_{50}$  ) to remove the larvae this being  $10^{-4}$  . Additionally, the residual product was evaluated against water turnover, taking approximately two months results larval mortality and persistence of the product.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	4
ANTECEDENTES DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	7
JUSTIFICACIÓN .....	16
1. OBJETIVOS.....	21
Objetivo General .....	21
Objetivos Específicos.....	21
2. MARCO TEÓRICO .....	22
2.1 Generalidades del Virus .....	22
2.2 Cadena de Transmisión del Dengue .....	23
2.3 <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	25
2.3.1 Ciclo biológico del <i>A. aegypti</i> L. ....	27
2.3.2 Estado de Huevo .....	28
2.3.3 Estado de Larva.....	30
2.3.4 Estado de Pupa .....	32
2.3.5 Estado de Adulto .....	33
2.3.6 Rango de Vuelo del <i>A. Aegypti</i> L.....	36
2.4 Control Biológico .....	36
2.4.1 <i>B. thuringiensis</i> (Bt): .....	38
2.4.2 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i> (Bti) .....	43
3. METODOLOGÍA .....	45
3.1. Recolección Muestras de <i>A. aegypti</i> (Linnaeus, 1762) .....	45
3.2. Población de Estudio.....	46
3.3. Identificación de Larvas.....	47
3.4. Mantenimiento de las Colonias <i>A. Aegypti</i> Linnaeus, 1762.....	47
3.5. Técnicas de Tinción empleadas .....	48
3.5.1. Tinción de GRAM .....	48
3.5.2. Tinción de Esporas con Verde de Malaquita .....	49
3.6. Determinación del Número de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C) Presentes en el Producto a Evaluar.....	51

3.7.	Pruebas Biológicas.....	52
3.7.1.	Bioensayos de Laboratorio .....	52
3.7.2.	Residualidad.....	52
3.7.3.	Determinación de la Muerte De Larvas De <i>A. aegypti</i> L.....	53
3.8.	Divulgación y Socialización del Proyecto .....	53
4.	RESULTADOS .....	55
4.1.	Determinación de las Concentraciones del <i>B. thuringiensis. var israeliensis</i> liofilizado Utilizado en Medidas de U.F.C.....	55
4.1.1	Dosis Media Letal DL <sub>50</sub> : .....	56
4.1.2.	Modelo Probit.....	60
4.2.	Residualidad.....	62
4.3.	Divulgación y Socialización del Proyecto en Centros Educativos .....	65
4.3.1.	Presentación a los Estudiantes.....	65
4.3.2.	Ideas Previas “El Dengue en mi Mundo” .....	66
4.3.3.	Presentación “Combatiendo el Mosquito del Dengue” .....	66
5.	DISCUSIÓN.....	68
6.	CONCLUSIONES .....	73
7.	RECOMENDACIONES.....	75
8.	REFERENCIAS .....	76
9.	ANEXOS.....	84

## LISTA DE TABLA

<b>Tabla 1:</b> Control Biológico Sobre <i>A. Aegypti</i> L. ( <i>Díptero: Culicidae</i> ) En América Latina _____	8
<b>Tabla 2:</b> Control Biológico Sobre <i>A. aegypti</i> L. ( <i>Díptero: Culicidae</i> ) en Neiva.____	15
<b>Tabla 3:</b> Subespecies de <i>B. thurigiensis</i> con actividad insecticidas contra diferentes insectos. (Tomado de Berlitz et al.) _____	41
<b>Tabla 4:</b> Concentraciones del Bti en Unidades Formadoras de Colonia U.F.C ____	55
<b>Tabla 5:</b> Mortalidad de <i>A. aegypti</i> L. por efecto del Bti ( <i>VECTOBAC G</i> ) en condiciones de laboratorio _____	57
<b>Tabla 6:</b> Mortalidad de <i>A. aegypti</i> L. por efecto de Bti ( <i>VECTOBAC G</i> ) en condiciones de laboratorio _____	58
<b>Tabla 7:</b> Mortalidad de <i>A. aegypti</i> L. por efecto de Bti ( <i>VECTOBAC G</i> ) en condiciones de laboratorio _____	59
<b>Tabla 8:</b> Mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i> L. obtenida con seis concentraciones de Bti, bajo condiciones de laboratorio. _____	61
<b>Tabla 9:</b> DL <sub>50</sub> y DL <sub>90</sub> obtenida para el BTI sobre larvas de <i>A. aegypti</i> L. _____	61
<b>Tabla 10:</b> Porcentaje de mortalidad de <i>A. aegypti</i> L. por efecto residual de Bti ( <i>VECTOBAC G</i> ) en condiciones de laboratorio (Bioensayo1) _____	63
<b>Tabla 11:</b> Porcentaje de mortalidad de <i>A. aegypti</i> L. por efecto residual de BTI ( <i>VECTOBAC G</i> ) en condiciones de laboratorio (Bioensayo 2) _____	63
<b>Tabla 12:</b> Porcentaje de mortalidad de <i>A. aegypti</i> L. por efecto residual de BTI ( <i>VECTOBAC G</i> ) en condiciones de laboratorio (Bioensayo 3) _____	64

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** Reporte de Casos de dengue, dengue grave y muertes por dengue en Colombia, 2005- 2012 Fuente: (OPS/OMS) \_\_\_\_\_ 17

**Gráfico 2:** Tasa de Morbilidad de Dengue grave en Neiva 2004 – 2013 Fuente: (Boletín epidemiológico Secretaria de Salud Municipal Neiva, semana 26) \_\_\_\_\_ 18

**Gráfico 3:** Tasa de Mortalidad de Dengue en Neiva 2004 – 2013 (Boletín epidemiológico Fuente: Secretaria de Salud Municipal Neiva, semana 26) \_\_\_\_\_ 19

**Gráfico 4:** Respuestas transformada por Probit \_\_\_\_\_ 62

**Gráfico 5:** Residualidad del Producto. %Mortalidad por días \_\_\_\_\_ 64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema de la estructura del virus del dengue. Fuente Revista Peruana de Medicina Experimental _____	22
<b>Figura 2:</b> Cadena de transmisión del dengue Fuente: OMS _____	24
<b>Figura 3:</b> Mosquito Hembra de <i>A.Aegypti L.</i> Fuente: Montealegre y Hermosa, 2013 _____	25
<b>Figura 4:</b> Ciclo biológico del <i>A. aegypti L.</i> Fuente: OMS _____	28
<b>Figura 5:</b> Huevos de <i>A.Aegypti L.</i> Fuente: Montealegre y Hermosa, 2013 _____	29
<b>Figura 6:</b> Larvas de <i>A. aegypti L.</i> en tercer y cuarto estadio Fuente: Figuera 2 Montealegre y Hermosa, 2013 _____	30
<b>Figura 7:</b> Pupas de <i>Aedes aegypti</i> _____	32
<b>Figura 8:</b> Adulto hembra de <i>A. aegypti L.</i> Fuente: Montealegre y Hermosa, 201333	
<b>Figura 9:</b> Principales diferencias entre una hembra y un macho de <i>A. Aegypti L.</i>	34
<b>Figura 10:</b> <i>B. Thuringiensis var. israeliensis</i> a) <i>Bti</i> con tinción de Gram b) endoesporas <i>Bti</i> _____	38
<b>Figura 11:</b> Ovitrapas ubicadas cerca de posibles sitios de ovoposición _____	46
<b>Figura 12:</b> 1. Larvas de <i>A. aegypti L.</i> en tercer y cuarto estadio. 2. Jaula mantenimiento de adultos Fuente: Montealegre y Hermosa, 2013 _____	47
<b>Figura 13:</b> Proceso de tinción con Verde de malaquita a la muestra del <i>Bti</i> en laboratorio. _____	50
<b>Figura 14:</b> Medios de cultivo de Agar tripticasa Soya _____	55
<b>Figura 15:</b> Medios de cultivo agar tripticasa Soya con colonias del <i>B. thuringiensis var. israeliensis</i> _____	56
<b>Figura 16:</b> Bioensayos del BTI sobre larvas de <i>A. aegypti L.</i> _____	57
<b>Figura 17:</b> Presentación del proyecto ante estudiantes de secundaria _____	65
<b>Figura 18:</b> Diapositivas de la presentación realizada a los estudiantes de las Instituciones Educativas de Neiva. _____	67

## INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad endemo-epidémica transmitida por mosquitos vectores del género *Aedes L. (aegypti y albopictus)*; la enfermedad se presenta en casos leves, graves y en ocasiones fatales. Esta se considera en la actualidad una enfermedad viral transmitida por artrópodos que afectan al hombre (**Guzmán et al, 1999**). En el último año, la enfermedad transmitida por el virus del dengue en la ciudad de Neiva se ha incrementado notoriamente, pasando de 512 casos reportados por la Secretaría de salud en mayo del 2011 a más de 2700 casos para la misma fecha en el 2012 (**Secretaria de Salud Municipal, 2012**). El aumento alarmante de personas reportadas con el virus del dengue, ha llevado a entidades de salud pública a controlarla mediante la eliminación del vector o la reducción de la densidad poblacional de mosquitos a niveles bajos (**Bisset, J 2002**), a través de estrategias como participación comunitaria, familiar e institucional para el cambio de conductas de riesgos, educación sanitaria individual, movilización, comunicación social y aplicación de productos químicos que afecten el desarrollo del vector, siendo éste último el mecanismo más particular para disminuir la población del mosquito con el fin de interrumpir la transmisión de la enfermedad (**Rey, 2011**).

El aumento de los casos del virus reportados en la ciudad se debe principalmente a la acumulación y depósito de botellas, canecas y llantas que son dejados a la intemperie en sectores residenciales que al cabo del tiempo se llenan de agua lluvia propiciando la proliferación del mosquito *A. aegypti L.*, el cual es principalmente urbano y deposita sus huevos en agua limpia (**Rossi & Almirón,**



**2004**). La lucha para combatir el vector no ha escatimado esfuerzo por parte del gobierno municipal, puesto que se han presentado 1463 casos de dengue en la ciudad de Neiva (**Secretaría de salud municipal de Neiva, 2013**); a causa de estos casos reportados, se han implementado programas en salud pública y métodos como el uso de productos químicos como el temephos (abate). En algunos sitios puntuales del departamento del Huila no se ha realizado el control del vector en su estado larvario, debido a que se ha presentado resistencia a larvicidas de origen químico como el Temephos (**Salazar et al, 2007**); sin embargo, en el país se han presentado casos de resistencia en un 70% de la población evaluada, incluso usando la dosis diagnóstica (0,012 ppm) propuesta y recomendada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) y en países latinoamericanos como en Perú se limitó el uso del DDT por producir alto grado de contaminación y desequilibrio ecológico, al no ser biodegradable y acumularse en la naturaleza (**Vargas V. et al 2001**).

El uso de larvicidas de origen biológico como bacterias, parásitos y extracto de plantas ha sido una nueva alternativa propuesta por la OMS para erradicar vectores, siendo éstos los más útiles por ser de origen natural y no representar ningún efecto adverso al ecosistema ni al hombre; estudios realizados en diferentes países en donde la problemática de la enfermedad del dengue ha sido predominante, han demostrado que mediante un control biológico como el uso de bacterias esporuladas de la especie *B. thuringiensis*, suelen ser mortíferas en larvas de insectos por su alta capacidad de formación de cristales proteicos que son altamente tóxicos para las larvas como las de *A. aegypti*, convirtiéndolo en un bioinsecticida altamente letal (**Carrera M. 2009**).

La iniciativa que se planteó en el presente trabajo de investigación, fue la de eliminar larvas de *A. aegypti* L. con el *B. thuringiensis* var. *israeliensis* (Bti) que se encuentra liofilizado en el producto comercial VECTOBAC G12, en donde se evaluó la eficacia del producto en condiciones de laboratorio, usando distintas concentraciones mediante diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Adicionalmente, se realizó el recambio de agua y se evaluó la residualidad del producto lo cual consiste en determinar la persistencia de éste cuando es aplicado en un medio acuoso en un lapso de tiempo determinado, para así obtener datos más precisos que permiten hacer una descripción más acertada acerca del producto sobre el *A. aegypti* L.

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la actualidad, el dengue es una de las enfermedades que ha aumentado su incidencia en la salud pública, puesto que cada año el número de personas reportadas con el virus es mayor; casos registrados por el Instituto Nacional de Salud Pública concluyen que en el 2010 el país experimentó el brote epidémico más grande de la historia, en donde el número de casos de dengue ascendió a 146.354, presentando un aumento del 18,3% respecto a los casos reportados en el 2009.

El departamento del Huila tuvo los índices más altos en el país incrementándose por causas adversas como el cambio ambiental generado por el fenómeno del Niño, la adaptación del vector a temperatura más elevada (**INS 2012**) y por falta de sostenibilidad de programas encaminados al control del vector en la salud pública. Para los últimos 5 años en el departamento se incrementaron considerablemente los casos de la enfermedad y los municipios de Neiva, Pitalito, La plata y Garzón se encuentran en prioridad 1, por registrar el número más alto de la enfermedad dentro del departamento.

### **Control de vector *A. aegypti* L.**

Los programas de control del dengue emplean estrategias mediante el control integral del vector que incluye el control químico en situaciones de emergencia, control biológico para saneamiento, y comunicación social mediante la realización de campañas en prevención y control del vector, basándose en la eliminación o intervención de posibles criaderos como llantas, recipientes, y botellas. Pero en situaciones de epidemia, el programa de control debe aplicar insecticidas químicos

para reducir la densidad poblacional de los mosquitos adultos en especial hembras de forma inmediata; sin embargo, el uso intensivo de insecticidas de tipo químico ha llevado a que alguna población del mosquito adquiriera resistencia (**Ocampo et al 2001**), afectando los programas de control de enfermedades transmitidas por vectores (ETV) orientadas por entes territoriales de salud.

En Colombia el uso intensificado de insecticidas de tipo organofosforados como el Malathion por más de 30 años sobre el vector de *A. aegypti* en estadio adulto, o para el estadio larvario como el temephos (abate), ha generado que el vector esté bajo presión y haya desarrollado estrategias biológicas para resistir a los efectos que traen los insecticidas usados (**Ocampo et al 2001**). Una nueva alternativa para eliminar el vector en su estadio larvario, es mediante un control biológico con la bacteria *B. thuringiensis* de la variedad *israeliensis* como medida óptima para eliminar larvas, ya que ésta produce tres toxinas Cry (Cry4A, Cry4B y Cry11A) y dos toxinas Cyt (Cyt1A y Cyt2A) con alta actividad insecticida contra larvas de diferentes especies de mosquitos y otros dípteros causando parálisis del epitelio intestinal en donde provoca un desbalance osmótico para finalmente dar muerte a la larva (**Soberón et al 2007**).

A raíz de la situación actual de los casos de personas que presentan el virus del dengue, es conveniente buscar una alternativa viable que ayude a detener el incremento de esta enfermedad, con el desarrollo de programas para el control del mosquito, usando el *Bti* como biolarvicida. Por esta razón, en la presente investigación se evaluaron en los laboratorios de Biología y Microbiología de la Universidad Surcolombiana las dosis letales del *Bti* (VECTOBAC G12), así como su residualidad y eficacia, sobre larvas de *A. aegypti* L. (1762) de tercer estadio tardío

y cuarto estadio temprano. La investigación permitirá dar recomendaciones orientadas a la implementación del *Bti* (VECTOBAC G12) en la ciudad de Neiva.

### **Pregunta de Investigación**

¿A qué DOSIS el *Bti* es altamente mortal para las larvas de *Aedes aegypti*, constituyéndose como un control biológico del dengue en la ciudad de Neiva?

## ANTECEDENTES DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### Aspectos Generales del *A. aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera: Culicidae)

El *A. aegypti* L. es un mosquito distribuido por todo el mundo, originario del continente africano y está estrechamente relacionado con los hábitos del hombre, ya que frecuenta especialmente en zonas urbanas, climas cálidos y húmedos, *A. aegypti* L. ha sido altamente considerado como vector de enfermedades como la fiebre amarilla y el dengue, su propagación o proliferación se debe a que prefiere los espejos de agua artificial como son los contenedores para ovopositar sus huevos y consigo mismo desarrollar su ciclo vital (**Cheong, 1967**). El vector llegó al continente americano desde África por la importación de esclavos durante los siglos XVIII y XIX y se trasladó al continente por el transporte marítimo que llegaba a las ciudades portuarias de América, moviéndose tierra adentro por las rutas de transporte (**Gubler 1997**).

El *A. aegypti* L. ha sido uno de los vectores más estudiados del mundo, infestando a 50 millones de personas que contraen la enfermedad anualmente, lo que causa 550.000 hospitalizaciones y 20.000 muertes (**WHO, 2012**). La **OMS** ha implementado programas de prevención y control en pro de buscar alternativas viables que ayuden a eliminar o reducir el tamaño poblacional al principal transmisor del virus del dengue experimentado técnicas como control mecánico, químico y biológico para reducir la proliferación del mosquito *A. aegypti* L., dentro de los cuales el más aceptado es el de tipo biológico debido a que no produce efectos secundarios no deseados y no causa afectación alguna al ecosistema (**Bay et al 1973; WHO, 1987**). Las investigaciones sobre el control biológico de vectores persiguen tres

objetivos principales: la identificación de nuevos posibles agentes, la evaluación de agentes ya identificados como potenciales controles biológicos y el desarrollo de agentes que han demostrado ser efectivos y seguros (WHO, 1987). Por eso, es que se han llevado a cabo múltiples trabajos que evalúan distintos agentes biológicos como alternativa de eliminar o reducir la masa poblacional del mosquito *A. aegypti* L., tal como lo muestra la Tabla No.1

**Tabla 1: Control Biológico Sobre *A. Aegypti* L. (Díptero: Culicidae) En América Latina**

PAÍS	CONTROL BIOLÓGICO	RESULTADO	AUTORES
Cuba	Con peces larvívoros <i>Gambusia punctata</i> Poey, 1854, <i>Gambusia puncticulata</i> Poey, 1854 y <i>Poecilia reticulata</i> Peter, 1895.	Indica que la presencia de peces en los depósitos constituye un factor de protección ante la incidencia de focos de culícidos	Duarte et al, 2008
Cuba	Con peces larvivoros <i>Poecilia reticulata</i> Peter, 1895	Se demostró que <i>Poecilia reticulata</i> mantiene el control de las larvas de los mosquitos en los tanques, sin necesidad de acudir a otro tipo de control	Hernández EH, Márquez MP. 2006
Cuba	Nematodos parásitos: <i>Romanomeris culicivorax</i> Ross y Smith, 1976, <i>Romanomeris iyengari</i> Welch, 1964 y <i>Strelkovimermis spiculatus</i> Poinar y Camino, 1986	Se demostró que todos los nematodos parásitos evaluados en el laboratorio provocaron 100 % de mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i> L.	Rodríguez J. et al 2005
Nicaragua	Con 3 especies de odonata : <i>Pantala flavescens</i> (Fabricius), <i>Anax amazilii</i> (Burmeister) e <i>Ischnura rambunii</i> (Selys) como	La especie de <i>Anax amazilii</i> (Burmeister) resulto ser una de las mejores depredadoras con respecto a la <i>Pantala flavescens</i> (Fabricius) e <i>Ischnura rambunii</i>	López D. 1998

	bioreguladores de larvas de mosquito	(Selys) ejerciendo un control al ecosistema acuático.	
México	Con extractos de plantas medicinales de México: <i>Argemone mexicana(L)</i> , <i>Cissus hypoglauca(a.Gray)</i> , <i>Pseudosmodium perniciosum Engl.</i> , <i>Ficus benjamina(L)</i> , <i>Hippocratea excelsa e H.celastroides</i> , <i>Tagetes lucida</i> .	Los datos obtenidos de más de 60 extractos estudiados, en cuanto a Actividad larvicida, indican que sólo algunos de ellos presentan una actividad por debajo de 200 mg/L. Dentro de ellos se observó que tres géneros presentan una actividad larvicida media (DL50 entre 200-100 mg/L) y dos una buena actividad (DL50 menor a 100 mg/L).	Rodríguez I, 2010
Cuba	Con aceites esenciales de <i>Piper auritum</i> , <i>Pimenta racemosa</i> , <i>Chenopodium ambrosioides</i> y <i>Piper aduncum</i>	Los aceites probados presentaron alta actividad insecticida contra <i>A. aegypti L.</i> , siendo <i>Piper auritum</i> el que presentó mayor actividad con la menor CL50 (CL50=0.0017), seguido por <i>Pimenta racemosa</i> (CL50=0.0027), <i>Chenopodium ambrosioides</i> (CL50=0.0035) y <i>Piper aduncum</i> (CL50=0.0057)	Leiva, M. et al, 2009
Brasil	Con extractos de <i>Annona foetida Mart.</i> (Annonaceae) sobre estados inmaduros de <i>A. aegypti L.</i>	Los resultados indican el potencial en bioensayos y larvicidas posible efecto inhibidor de la emergencia de adultos, causada por extractos <i>Annona foetida</i> utilizando principalmente extracto de diclorometano. Estos resultados muestran que los efectos de estos extractos son causados por la presencia de acetogeninas, no se descarta la posibilidad de que actúan sinérgicamente con otros compuestos químicos presentes en <i>Annona foetida</i>	Mara Guarido M. 2009
Colombia	con extractos etanólicos de <i>Tabernaemontana cymosa</i> y <i>Trichilia hirta</i> sobre larvas de	Las especies objeto de estudio <i>Trichilia hirta</i> (CL50 = 219,22 ppm) y <i>Tabernaemontana cymosa</i> , por medio de bioensayos estandarizados demostraron	Díaz, F et al. 2012



	estadio III y IV de <i>A. aegypti</i> L.	tener un efecto en las larvas de III y IV estadios de <i>A. aegypti</i> L.	
Colombia	Con extractos de <i>Eupatorium microphyllum</i> L.F. (Asteraceae) sobre larvas de <i>A. aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio.	La utilización de los extractos de <i>E. microphyllum</i> contra las larvas de IV estadio de <i>A. aegypti</i> L, principalmente los acetónicos a las mayores concentraciones usadas en el presente trabajo (40 mg L <sup>-1</sup> y 50 mg L <sup>-1</sup> ), permiten validarlos como potenciales larvicidas naturales contra esta especie de mosquito.	Rozo, A. et al, 2008
Colombia	Con extractos etanólicos de <i>Annona muricata</i> , <i>Melia azedarach</i> , y <i>Ricinus communis</i> sobre larvas de cuarto estadio de <i>A. aegypti</i> L.	Se halló que los extractos que presentan mayor actividad sobre las larvas de <i>A. aegypti</i> L. son en su orden el de <i>R. communis</i> (LC50 860 ppm); <i>A. muricata</i> (LC50 900 ppm) y <i>M. azedarach</i> (LC50 1800 ppm). Estos resultados indican que los extractos de las especies vegetales evaluadas se pueden considerar promisorios para el control biológico de larvas de <i>Aedes aegypti</i> L.	Parra G. et al, 2007
Colombia	De extractos polares y no polares de acetogeninas de <i>Annona muricata</i> sobre larvas de <i>A. aegypti</i> L. y <i>Anopheles albimanus</i> larvae.	Las dos especies de <i>Culicidae</i> estudiadas fueron altamente susceptibles a ambos tipos de extractos bajo condiciones de laboratorio.	Morales C. et al, 2004
Colombia	extractos vegetales de 24 especies de la familia Asteraceae (Compositae) frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae)	La alta actividad en <i>H. oppositifolia</i> , <i>J. hirta</i> y <i>A. inulaefolium</i> en larvas de <i>Aedes aegypti</i> L. demuestra el importante potencial larvicida que presentan estas plantas.	Duarte I. et al. 2013
Cuba	<i>Romanomermis iyengari welch</i> (Rhabditida:	Se obtuvieron promedios de infestación de 3:9 y 6:7 para	Rojas J. et al 2002

	Mermitidae) sobre larvas de la especie <i>Anopheles numestovari</i> Gabaldon y <i>A. aegypti</i> L.	<i>Anopheles nuneztovari</i> y de 1:9 y 4:7 para <i>Aedes aegypti</i> respectivamente. Los niveles de mortalidad oscilaron entre 95 y 100% para ambas especies, observándose mayor susceptibilidad al parasitismo en las larvas de <i>Anopheles nuneztovari</i> .	
Colombia	<i>Notonecta indica</i> (Notonectidae) para diferentes estados larvales de <i>A. aegypti</i> L. (Culicidae)	<i>Notonecta Indica</i> podría ser empleada como biocontrolador de larvas de mosquito en la isla de San Andrés y Providencia, ya que se alimenta de larvas del mosquito <i>A. aegypti</i> L. en avanzado desarrollo, disminuyendo el número de potenciales adultos que pueden ser transmisores de enfermedades como el dengue.	Guerra L, 2008
México	Parasitismo de <i>Romanomermis iyengary</i> en larvas de tres especies de mosquitos entre estos ( <i>A. aegypti</i> L.) en laboratorio.	Las larvas del tercer estadio de las tres especies son más susceptibles al parasitismo que las del cuarto. Las larvas de <i>An. pseudopunctipennis</i> fueron más susceptibles de ser parasitadas por <i>Romanomermis iyengari</i> (85.8-96.7%) en comparación con las de <i>A. aegypti</i> L. (80-88,3%) y <i>Culex. quinquefasciatus</i> (80,8-91,7%)	Pérez R. et al 2004
Colombia	Control por el crustáceo <i>Mesocyclops spp.</i>	El primer sistema controla y estabiliza la población de mosquitos, el segundo muestra que los copépodos son inefectivos como controladores.	Duque J. et al 2003

Panamá	Aceite del Fruto del Noni ( <i>Morinda citrifolia</i> : <i>Rubiaceae</i> ) como larvicida del mosquito <i>A. aegypti</i> L.	La propiedad larvicida del aceite esencial del noni sobre el mosquito <i>A. aegypti</i> L. resultó ser un poco más baja en comparación con aceites esenciales de otras especies de plantas	Morales J. 2010
México	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i> (VECTOBAC 12 ASA) sobre la población larval de <i>A. aegypti</i> L.	El <i>Bti</i> demostró ser efectivo como larvicida contra el <i>A. aegypti</i> ( <i>Linnaeus, 1762</i> ) aun en presencia de cloro, puesto que su investigación se constituyó principalmente en los tanques de almacenamiento de agua, cabe destacar que la investigación pudo ser más ambiciosa y con mejores resultados si se hubiera registrado un control con mayor frecuencia.	Ponce G. et al, 2003
Brasil	Nueva formulación a base de <i>B. thuringiensis</i> sorovar <i>israeliensis</i> como control de larvas de <i>A. aegypti</i> L.	La eficacia y la persistencia de una formulación de tableta experimental basada en <i>Bti</i> (C4P1) inicialmente origino mortalidad desde 93 hasta 100% y la actividad residual 70% de mortalidad.	Melo Santos M. et al, 2001
Colombia	Residualidad y efecto de <i>B. thuringiensis</i> (VectoBac G) en el control de <i>A. aegypti</i> L.	Luego de aplicar el VECTOBAC G se incrementó gradualmente la mortalidad de <i>A. aegypti</i> L. alcanzando su valor máximo de 24 horas encontrándose solo pupas.	Morales C, sin fecha
Cuba	Resistencia de <i>A. aegypti</i> L. a <i>B. thuringiensis</i> var <i>israeliensis</i> .	<i>B. Thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i> como una alternativa para el control de estadios inmaduros de <i>A. aegypti</i> L. sin que exista evidencia hasta el presente de aparición de	Armas R. et al 2007

		resistencia en poblaciones de campo.	
Brasil	Aplicación de formulaciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i> SH-14 contra <i>Aedes aegypti</i> L.	Resaltan que el uso del <i>Bti</i> unidos a una activa participación ciudadana demostró ser una estrategia adecuada que se debe continuar en programas de control del <i>A. aegypti</i> L. de Nova Iguazú.	Gomes et al. 2004,
Colombia	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>Israeliensis</i> cultivado en agua de coco para el control de <i>A.aegypti</i> L.	<i>Bti</i> tiene una actividad altamente toxica para el mosquito vector del virus del dengue, con una dosis letal de (DL50), puesto que en un tiempo de 12 horas las larvas del mosquito de <i>A. aegypti</i> L, en presencia de <i>Bti</i> en agua de coco se obtuvo una reducción muy significativa de las larvas tomadas por muestra.	Bertel H, et al. 2008
Brasil	Dos formulaciones de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Israeliensis</i> sobre <i>A. aegypti</i> L. en laboratorio y al aire libre.	Efecto residual del <i>Bti</i> en tiempo de una a cinco semanas en los ensayos al aire libre, fue eficaz cuando se aplica a la misma concentración en condiciones de laboratorio, los dos productos exhibieron mayor efecto residual, VectoBac siendo G al menos dos veces como "persistentes" como Aquabac G (95% de mortalidad de hasta 101 y 45 días, respectivamente).	Pereira J. et al. 2005
Brasil	Residualidad de un formulado solido del insecticida microbiano <i>Bti</i> ( H-14) en el control de larvas de <i>A. aegypti</i> L.	El uso (14,4 mg/cm <sup>2</sup> ) se observó el 100% de mortalidad inmediatamente luego de la aplicación del formulado y para 24 horas de exposición de larvas. La actividad residual para los "Mosquitos Dunks" en la concentración utilizada en laboratorio de 14,4mg/100cm <sup>2</sup> de superficie, equivalente a la recomendada de uso por el fabricante, mostró que hasta los 180 días de aplicado, el	Masuh H. et al. 2002

		<p>formulado produce 95 - 100 % de mortalidad con 48 horas de exposición. A los 210 días de aplicado, última observación realizada, la mortalidad producida en larvas expuestas 48 horas fue menor al 50%</p>	
Brasil	<p>Dinámica en el Control de <i>A. Aegypti</i> L. por <i>Bti</i> relación con temperatura, densidad y concentración de insecticida.</p>	<p>Las altas temperaturas conlleva a aumentar la actividad metabólica de los mosquitos, y por lo tanto las tasas de ingestión <i>Bacillus</i>, hay una influencia directa en la mortalidad a altas temperaturas debido a la alta concentraciones del patógeno en el sistema digestivo.</p>	<p>Duque J. et al, 2006</p>
Brasil	<p>Persistencia del VECTOBAC WDG y Metoprag S-2G sobre <i>A. aegypti</i> L.</p>	<p>Los resultados apuntan a una baja persistencia de ambas formulaciones en las condiciones climáticas de Rio de Janeiro.</p>	<p>Lima J. et al 2005</p>
Brasil	<p>Control de <i>A. aegypti</i> L. y <i>C. quinquefasciatus</i> contenido en <i>Bti</i> a temperatura controlada.</p>	<p>Entre el formulado probado VECTOBAC T, VECTOBAC WDG y Biouel son los más indicados para el control de <i>A. aegypti</i> L. y VECTOBAC AS y WDG para controlar la temperatura en <i>Culex quinquefasciatus</i>, VECTOBAC mostró una mayor eficiencia de <i>A. aegypti</i> L. y <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p>	<p>Zequi J. et al. 2011</p>
Brasil	<p>Evaluación de dos medios de cultivos diferente para el desarrollo de biopesticidas basado en <i>Bti</i> sobre larvas de <i>A. aegypti</i> L.</p>	<p>Los resultados indican una eficiencia significativa con macerado de maíz glucosa (CL50=2,8 mg L-1), triptosa – glucosa (8,4 g L-1) y triptosa (12,2 g L-1).</p>	<p>Ernandes samara et al. 2012</p>
Brasil	<p>Selección de cepas de Bt (Berliner) para controlar <i>A. aegypti</i>.</p>	<p>Once de las cepas evaluadas eran inocuas, no se produjo mortalidad de las larvas. Cuatro eran parcialmente eficaces con toxicidades reducidas, que van</p>	<p>Melo, A. L. A. et al 2013</p>

		16,7 a 48,3%. La mejor actuación fue producida por la cepa BR-01, causando un 96,7% de mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i> . Este resultado fue significativamente mayor que otras cepas.	
--	--	---	--

**Tabla 2 Control Biológico Sobre *A. aegypti* L. (Díptero: Culicidae) en Neiva.**

<b>CONTROL BIOLÓGICO</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>AUTORES</b>
Efectividad de <i>Bti</i> producido en medio de cultivo de coco sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> en laboratorio.	El Bti cultivado en agua de coco en el laboratorio fue 100% efectivo sobre larvas de <i>A. aegypti</i> L.	Parra, L. et al. 2003

Aunque a nivel mundial existen varios estudios realizados para el control biológico del vector transmisor del dengue, en el departamento del Huila estos estudios han sido escasos, lo que hace que el presente trabajo de investigación contribuya a mejorar la salud pública de la región.

## JUSTIFICACIÓN

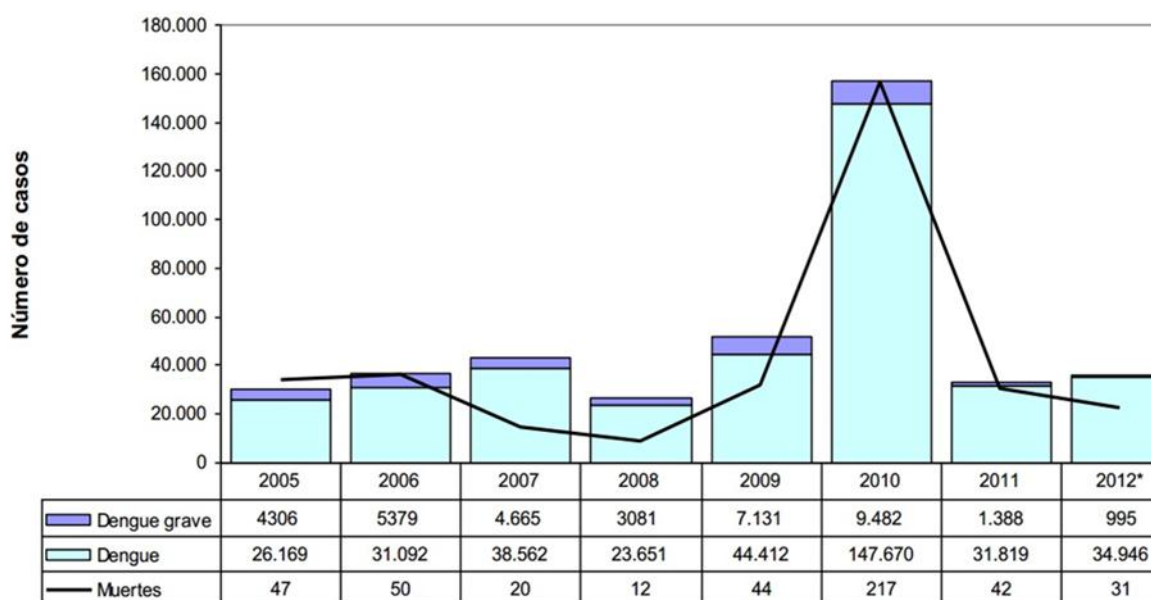
La densidad poblacional de *A. aegypti* L. va en aumento y la expansión de zonas geográficas no pobladas, ha llevado a que dos quintas partes de la urbe mundial se encuentren en riesgo de padecer el virus del dengue por habitar en áreas tropicales y subtropicales, reportándose que alrededor de 100 países han presentado casos de dengue en cualquiera de sus sintomatologías clínicas (dengue clásico o dengue hemorrágico) y más de 60 países lo presentan frecuentemente todos los años (**Martínez, 2008; WHO, 1997**). Por la situación actual en la que se encuentra la enfermedad en el mundo, la OMS la considera una de las principales Problemáticas de salud para la humanidad; de igual manera, también la tiene en cuenta como una enfermedad que produce afectación en lo económico y en lo social (**Martínez, 2008**).

Los reportes de casos del virus del dengue han sido muy preocupantes en el continente Americano, ya que actualmente representan el 14% del total de enfermos en todo el mundo, produciendo un incremento progresivo durante las tres últimas décadas (**Kouri, 2006**) y siendo Colombia uno de los países de América Latina que presenta un alto índice de incidencia de la enfermedad en los últimos años.

En Colombia la enfermedad ha estado presente progresivamente, ya que circulan los cuatros serotipos Den 1, Den 2, Den 3 y Den 4 simultáneamente (**INS, 2011**) y muestra un aumento del serotipo Den 1 y disminución del Serotipo Den 3 (**INS, 2011**), encontrándose que el *A. aegypti* L. es el principal transmisor del dengue (**INS, Sivigila, 2012**). En Colombia el mosquito se encuentra distribuido en casi el 90% del territorio nacional, situado en lugares por debajo de 2.200 msnm; además,

la temperatura es considerada un factor esencial para su distribución (INS. 2011, Secretaria de Salud departamental del Huila, Sin Fecha de publicación)

**Dengue, Dengue grave y Muertes por dengue en Colombia, 2005-2012\***



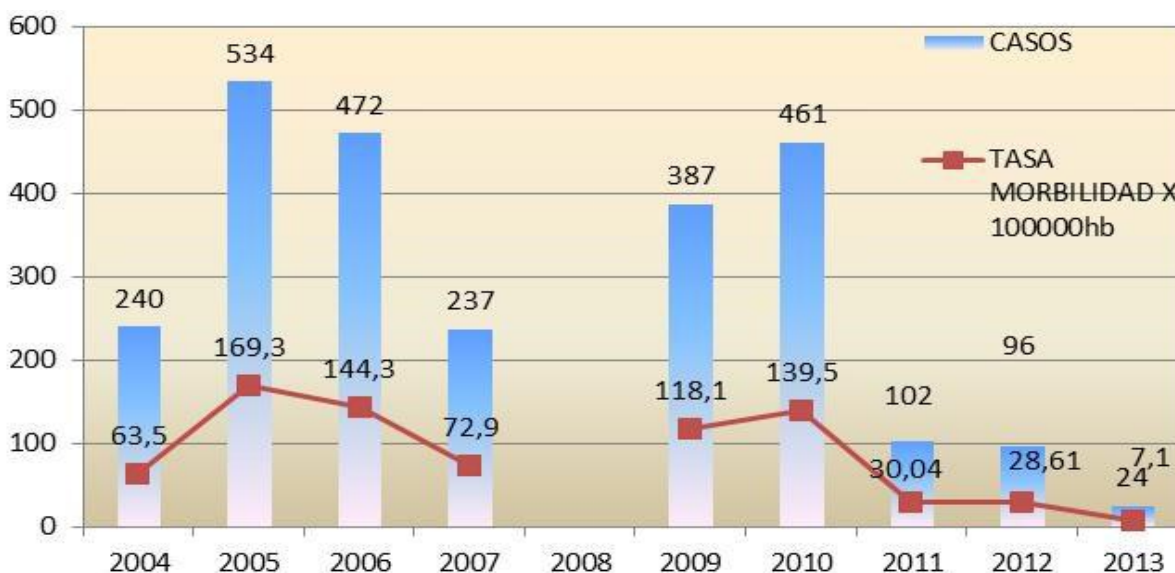
**Gráfico 1: Reporte de Casos de dengue, dengue grave y muertes por dengue en Colombia, 2005- 2012 Fuente: (OPS/OMS)**

En el 2010 el país presentó los casos más altos de la enfermedad, catalogándolo como epidemia por haber infestado aproximadamente 157.202 personas, (ver gráfico N° 1) correspondiendo a dengue y el 6% (9.482 casos) a dengue grave y presentándose 217 muertes confirmadas por el virus del dengue. La cantidad de casos presentados en el periodo del 2010 se debió a causas climáticas y ambientales como el fenómeno del Niño que se presentaba en todo el territorio nacional (INS-Sivigila, 2012). El Instituto Nacional de Salud argumenta que este pico corresponde a una epidemia periódica de dengue que ocurre cada tres o cuatro años, por causas como el aumento de la población por sus continuas



migraciones, el ascenso del mosquito a altitudes más altas geográficamente (**INS, 2010**), posiblemente por el aumento de las temperaturas debido al calentamiento global, entre otras.

El Huila después de Santander y Valle del Cauca, regiones donde se reportan siete municipios con ‘prioridad’ por dengue (**Secretaría Municipal y departamental de Salud; 2012**), es uno de los departamentos con mayor incidencia del virus, en donde se reporta un incremento del 5,8% cuando estándares internacionales indican que se debe estar, como máximo en el 2.0% (**OPS**); en la ciudad de Neiva los casos de dengue presentados son determinantes para la salud pública ya que el incremento de casos para los años 2005, 2006 y 2010 ha contribuido a mejorar políticas en salud del gobierno municipal, dando como resultado en estos dos últimos años una disminución del 60 %.



**Gráfico 2 Tasa de Morbilidad de Dengue grave en Neiva 2004 – 2013 Fuente: (Boletín epidemiológico Secretaría de Salud Municipal Neiva, semana 26)**

El gráfico N°2 muestra la relación de muertes reportadas por dengue en Neiva entre los años 2004 a la semana 26 del 2013. Las variaciones tienden a coincidir con la presencia del fenómeno del Niño en los años 2009 y 2010 (**INS-Sivigila,**

**2012)** siendo notable que para estos años, se evidencie el mayor registro de eventos relacionados con la mortalidad de individuos llegando a los 3 casos por cada 100.000 habitantes. En cambio, en los años 2005 y 2006 en donde se presentaron tasa de morbilidad mayor a los que se presentaron en los años 2009 y 2010, la mortalidad no supero en relación a estos años (ver gráfico N° 3); cabe notar que la reducción de los casos de esta enfermedad parecía relacionarse más con la ausencia o disminución de las condiciones climáticas, coincidiendo con los cambios climáticos del fenómeno del Niño que establece condiciones necesarias para la propagación del vector (**INS-Sivigila, 2012**).



**Gráfico 3**Tasa de Mortalidad de Dengue en Neiva 2004 – 2013 (Boletín epidemiológico Fuente: Secretaria de Salud Municipal Neiva, semana 26)

Aunque el virus del dengue es imposible de eliminar, hay ciertas acciones que se podrían tomar para evitar la propagación del vector, como incidir en la población a que practique buenas condiciones sanitarias, es decir, velar porque el agua no se

acumule en ciertos sitios después de la lluvia, puesto que esto es lo que conlleva al desarrollo de los mosquitos transmisores del dengue.

Los resultados de la investigación incidirán en la comunidad Surcolombiana, aportando elementos conceptuales acerca de la enfermedad del dengue, entre los que se destacan generalidades del vector, modo de transmisión, control y eliminación de la población del mosquito. Del mismo modo, este trabajo permitirá enriquecer las investigaciones en Ciencias Naturales realizadas por los estudiantes de esta Licenciatura adscrita a la Facultad de Educación de la institución y del semillero VIRHOBAC dedicado a abordar situaciones problema como apoyo a la línea de estudios en Microbiología médica.

## 1. OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar la eficacia del *B. thuringiensis var. israeliensis* (VECTOBAC G) como control biológico en la eliminación de larvas de *A. aegypti* L, vector transmisor del virus del dengue bajo condiciones de laboratorio

### Objetivos Específicos

- Determinar las concentraciones y evaluar el efecto letal del *B. thuringiensis var. israeliensis* (Bti) a utilizar en la eliminación de larvas de *A. aegypti* L.
- Evaluar la residualidad del producto VECTOBAC G en la eliminación de larvas de *A. aegypti* L.
- Realizar divulgación social del conocimiento del proyecto de investigación teniendo en cuenta el referente teórico, los aspectos metodológicos, los resultados y las recomendaciones de la temática desarrollada.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades del Virus

El virus del dengue (DEN) es un virus de ARN, pequeño monocatenario que abarca cuatro distintos serotipos DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4 los cuales son transmitidos a los humanos a través de la picadura del mosquito del género *Aedes* (Rico, Hesse R (1990) & Monath et al (1997) citado por Cabezas, C. (2005). Es una patología conocida en todo el mundo a pesar de que se desarrolla especialmente en regiones tropicales y subtropicales, es producido por un virus del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Rice. 1996, citado por Cabezas, C, 2005). La partícula madura del virus del dengue es esférica, con un diámetro de 50 nm y contiene múltiples copias de las tres proteínas estructurales (Figura N° 1), una membrana de doble capa derivada del huésped y una copia única de un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva (Chambers, T. (1990) citado por Cabezas, C. (2005))

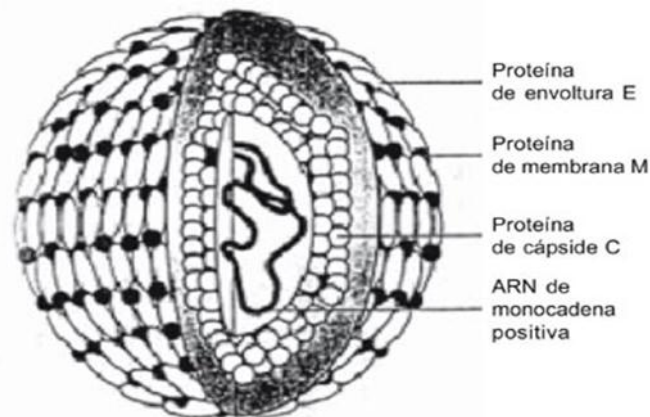


Figura 1: Esquema de la estructura del virus del dengue. Fuente *Revista Peruana de Medicina Experimental*

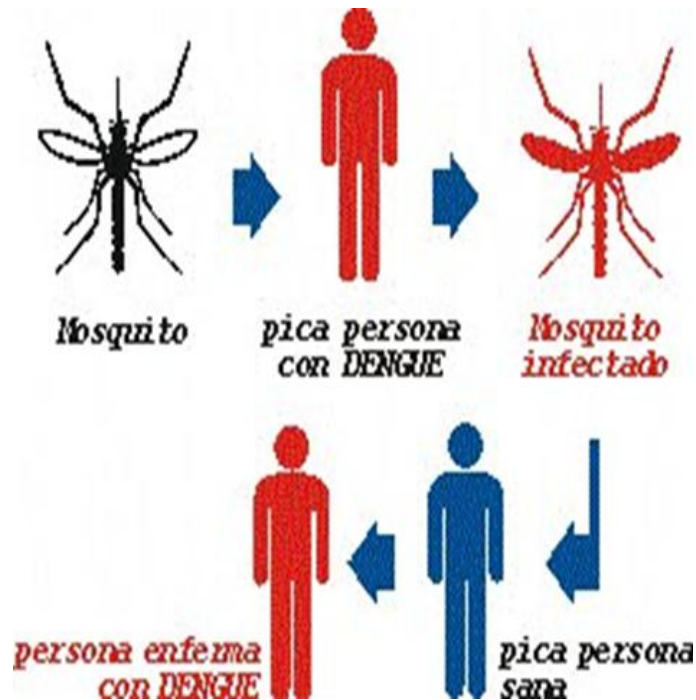
Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se caracteriza por una fiebre repentina de duración aproximadamente de tres a cinco días (fiebre del dengue, FD) y si evoluciona severamente en el transcurso de los días con síntomas como cefalea, dolores retro orbitales, articulaciones y musculares entre otros, conlleva a una patologías graves llamadas Dengue hemorrágico (DH) y síndrome del shock de dengue (SSD) y debe ser tratado cuidadosamente por que la gravedad de esta, puede causar la mortalidad de la persona que ha adquirido el virus (**Halstead, 1970; Thein et al., 1997**).

Actualmente la OMS la considera una enfermedad epidémica por la alta demanda de casos que se presenta en todo el mundo, se estima que actualmente 2,5 millones de personas están en riesgo de padecer anualmente la enfermedad en todo el mundo, comprometiendo a más de 100 países de sobrellevar la enfermedad que es una problemática para salud pública y 100 millones de personas se contagia cada año (**WHO, 2009**) La transmisión puede ocurrir después de una semana de haber picado el mosquito infectado a una persona sana, transmitiendo el virus. Este proceso se puede repetir cada vez que el mosquito pica a una persona sana, durante sus tres o cuatros semanas de vida.

## **2.2 Cadena de Transmisión del Dengue**

Esta se inicia con la presencia del mosquito hembra infectado, la cual al picar a la persona sana, transmite uno de los serotipos (DEN 1 al 4) encontrando allí, la puerta de entrada para transmitir el agente viral, convirtiendo a esta persona en reservorio del virus del dengue, el enfermo al ser picado por otro mosquito encuentra

la puerta de salida a la cadena de esta enfermedad (figura N° 2) (**Escobar, citado por Benavides y Realpe, 1993**).



**Figura 2:** Cadena de transmisión del dengue Fuente: OMS

El agente, el vector y los reservorios existen solo bajo determinadas condiciones ambientales y socioeconómicas que favorecen la existencia y reproducción de la enfermedad. Factores como la mala calidad de vida, viviendas en mal estado, y procesos de higiene inadecuados, son condiciones a favor de la reproducción del vector causante de transmitir el virus del dengue. Este mosquito encargado de transmitir el virus, es una especie tropical y subtropical ampliamente distribuida alrededor del mundo, especialmente entre las latitudes 35°N y 35°S. Estos límites geográficos corresponden, aproximadamente, a un invierno isotérmico de 10 °C (**OMS 2009**). El *A. Aegypti L.* se ha encontrado en Colombia a una altura

de 2.200 msnm, lugares donde la temperatura promedio es de 17 °C (**Rodriguez Cruz. 2007, citado por Posada Fernandez, 2010**)

### 2.3 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)



**Figura 3 Mosquito Hembra de *A. Aegypti* L. Fuente: Montealegre y Hermosa, 2013**

De todas las especies de mosquitos conocidos con importancia en salud pública, el *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, es considerada la más peligrosa por tener la capacidad de transmitir el mayor número de enfermedades arbovirales al hombre, (**Thiri3n Icaza, 2003**). El *A. aegypti* L, artr3podo, perteneciente al orden D3ptera y familia Cul3cidae, son los mosquitos m3s importantes que se alimentan de la sangre del hombre y de otros mam3feros. Los mosquitos son los 3nicos vectores de pat3genos que causan paludismo, fiebre amarilla, dengue, as3 como importantes filiarisis y encefalitis virales (**Harwood y James, 1987, citado por Thiri3n Icaza, 2003**). Su clasificaci3n taxon3mica es:

- Reino: Animalia
- Phylum: Artr3poda
- Clase: Insecta
- Familia: Culicidae



- Subfamilia: Culicinae
- Género: *Aedes*
- Subgénero: *Stegomyia*
- Especie: *aegypti* (Linnaeus 1972).

El *A. Aegypti* L, aparentemente es originario de África, donde existen cepas tanto selváticas (*A. Aegypti formosus*) como domésticas (*A. Aegypti queenslandensis*), ingresando a las Américas en el siglo XVI con el tráfico de esclavos al llegar sus huevos y larvas en barriles de agua transportados en los barcos (**Ríos Cadavid, 2004**). Son insectos dípteros, es decir que su primer par de alas es funcional y el segundo los halterios, les sirven de equilibrio durante el vuelo. Su alimentación se basa, tanto en hembras como en machos, en el néctar de las flores, aunque las hembras suelen alimentarse de sangre humana o de animales domésticos, ósea son hematófagas (**Cruz Duran et al, 2004**). La ingestión de sangre proporciona una fuente de proteínas para el desarrollo de huevos y ocurre principalmente durante las horas diurnas, (**Nelson, 1990, citado por Aviña 1999**).

Al momento de la picadura son silenciosas, atacando principalmente la parte baja de las piernas y los brazos. Sus huevos los depositan en aguas estancadas principalmente limpias (floreros, botellas de gaseosa, llantas, latas y estanques de almacenamiento de agua). Usualmente estos recipientes artificiales les proporciona condiciones para que la hembra de *A. aegypti* L. pueda ovopositar y criar, siendo algunos más atractivos especialmente los de colores oscuros, de boca ancha y los que se encuentra en la sombra, evitando realizar las ovoposiciones en aguas contaminadas, con olores y agrupando sus huevos individualmente (**CDC, 1980 Citado por Conde A, 2003**).

Los mosquitos hembras son los únicos que succionan sangre, la ingesta de sangre ocurre principalmente en horas del día ya que le proporciona a la hembra nutrientes para la maduración de sus huevos (**Detinova, 1962 citado por Conde A. 2003**) la hembra de *A. aegypti* L. puede succionar sangre de animales como aves, murciélagos, monos, vacas, perros, ratones (**Mirsa, 1956, citado por Conde A., 2003**) pero tiene una preferencia especial con la sangre de los humanos. La frecuencia en la toma de sangre es muy variada ya que puede alimentarse más de una vez para cada ovoposición (**Scott et al, 1993**) siempre y cuando se vea perturbado antes de estar completamente lleno de sangre, múltiples tomas de sangre en un solo ciclo gonotrófico incrementa la oportunidad de transmitir el virus (**OPS 1995**). El tiempo para la digestión de la sangre y la producción de huevos varia aproximadamente de 3 a 5 días dependiendo de las condiciones ambientales como es la temperatura, teniendo gran influencia, debido a que las bajas temperaturas retardan el desarrollo del vector y la baja humedad tiende a incrementar la duración en estos procesos de desarrollo del vector *A. aegypti* L.

### **2.3.1 Ciclo biológico del *A. aegypti* L.**

Este vector es de metamorfosis completa (son holometábolos). Durante su desarrollo biológico se encuentran cuatro estados (Figura N° 4): huevo, larva, pupa y adulto, sus tres primeras etapas como huevo, larva y pupa se desarrollan en ambientes acuáticos y la última etapa de adulto se realiza en ambiente terrestre. Tiene una relación cercana con el hombre por lo que lo considera una especie de hábitat urbana aprovechando los recipientes artificiales ubicados cerca de las viviendas o dentro de las misma para ovopositar sus huevos y para mantener su

criadero, preferiblemente le gusta depositar los huevos en agua limpia y especialmente el de consumo humano como son los tanques de almacenamiento, pero en ocasiones utiliza medios naturales como plantas de bromeliáceas, bambúes y huecos de rocas (Reyes, 1990; Rossi & Almirón, 2004)

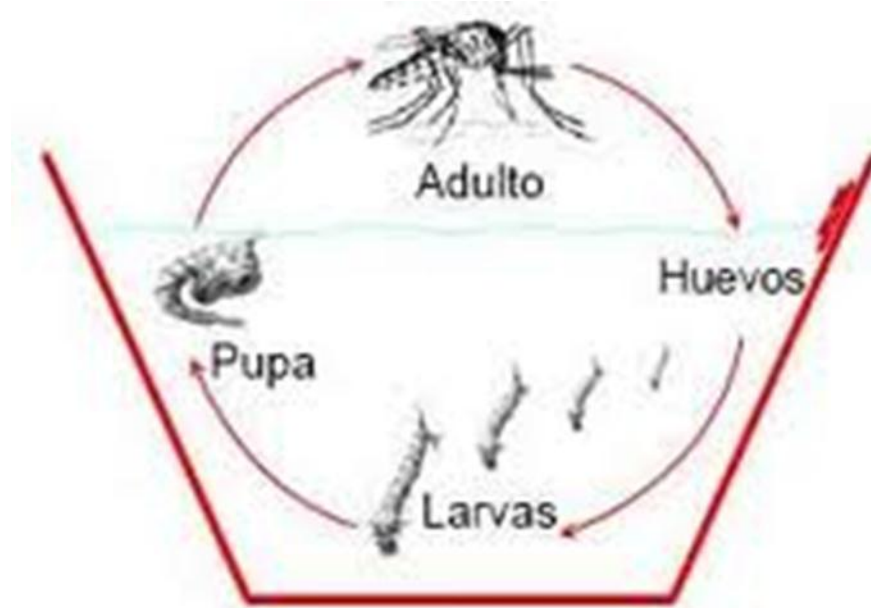


Figura 4 Ciclo biológico del *A. aegypti* L. Fuente: OMS

### 2.3.2 Estado de Huevo

Mide aproximadamente 1 milímetro de longitud, en forma de cigarro son más o menos ovoides y más limpios que los huevos de la mayoría de las especies que se crían en recipientes (Figura N° 5). En el momento de la postura son blancos, pero muy rápidamente adquieren un color negro brillante después de las dos horas de haber sido ovopositados (Mirsa, 1956; CDC, 1980 citado por Conde A., 2003) y generalmente colocan sus huevos a lo largo de la línea del agua y el recipiente (Horsfall, 1972 citado por Conde A. 2003)



**Figura 5: Huevos de *A.Aegypti* L. Fuente: Montealegre y Hermosa, 2013**

Los huevos son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario se completa en 48 horas si el ambiente es húmedo y cálido o donde el nivel de agua sea suficiente para que eclosionen, pero puede prolongarse hasta cinco días con temperaturas más bajas. Eclosionan en un lapso de 2 a 3 días. Con posterioridad a ese periodo, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas sobreviviendo de siete meses a un año, convirtiéndose este factor en uno de los obstáculos para erradicar el vector del dengue.

Los huevos de una misma postura, sumergido simultáneamente en agua, no eclosionan al mismo tiempo, y tampoco no todos los huevos incuban cuando están depositados en agua, ya que hay algunos que no han sido fecundados, los que han sido fecundados y en las que las larvas están ya completamente formadas, su salida se realiza por medio de una rotura transversal en el extremo ancho del huevo y en cuanto a las que no, estos se abren en cualquiera de los dos extremos, toman aspecto de hoja y en este estado permanece en el agua, también es posible encontrar huevos sin haberse abierto **(Mirsa, 1956 citado por Conde A, 2003)**

La hembra ovoposita cada 4 – 5 días, en número de 10 a 100 huevos por ovoposición, buscan los recipientes rústicos en sus paredes para sostenerse sobre las paredes y ovopositar sus huevos, cuando los recipientes tienen paredes lisas los huevos se dispersan por la superficie interna del recipiente, por encima del nivel del agua **(Rey G, 2011)**.

### 2.3.3 Estado de Larva



**Figura 6: Larvas de *A. aegypti* L. en tercer y cuarto estadio Fuente: Figuera 2 Montealegre y Hermosa, 2013**

Las larvas que emergen inician un ciclo de cuatro estadios larvales (L-1, L-2, L-3 y L-4), son exclusivamente acuáticas y como la mayoría de los insectos holometábolos, la fase larval es el período de mayor alimentación y crecimiento. Pasan la mayor parte del tiempo alimentándose de materia orgánica sumergida o acumulada en las paredes y el fondo del recipiente, tolerando ambientes con abundante materia orgánica en descomposición para lo cual utilizan las cerdas bucales en forma de abanico.

Se asemejan a otras larvas de mosquitos por la cabeza y el tórax ovoide y el abdomen de nueve segmentos. El segmento posterior (anal) del abdomen tiene 4

branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón, para la respiración en la superficie del agua (Figura N° 6). La posición de reposo en el agua es casi vertical. En cuanto al desplazamiento acuático, lo hacen con un movimiento serpenteante característico. Cuando la larva sale del huevo se inicia su primer estadio larvario de las cuatro que desarrolla, siendo la segunda, tercera, cuarta simultáneamente mayor a la anterior. El paso de una fase a otra, se logra cuando las larvas sueltan su exosqueleto viejo segregando una sustancia líquida para separarlo del nuevo ya formado. La capsula de la cabeza y el tórax del exoesqueleto se quiebra y la larva emerge con una nueva cubierta que le cubre y le permite aumentar de tamaño **(C.D.A. 1980 citado por Conde A., 2003)**

Son fotosensibles (sensibles a la luz), desplazándose hacia el fondo del recipiente, aun cuando son perturbados. La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimentos y la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas, con temperaturas de 25 a 29°C, el período desde la eclosión hasta la pupación puede ser de 5 a 7 días. Y termina su desarrollo larval cuando la larva de estadio cuarto se desarrolla alcanzando el estado de pupa. El tiempo de permanencia en cada estadio depende de las condiciones de temperatura, disponibilidad de alimento y densidad larvaria en el criadero. **(Rey, G 2011)**

### 2.3.4 Estado de Pupa



**Figura 7 Pupas de *Aedes aegypti***

Las pupas no se alimentan, presentan un estado de reposo donde se producen importantes modificaciones anatómico-fisiológicas hasta la aparición de los adultos. Reaccionan inmediatamente a estímulos externos tales como vibración y se desplazan activamente por todo el recipiente. Se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad y ésta propiedad facilita la emergencia del insecto adulto.

La pupa tiene en la base del tórax un par de tubos respiratorios o trompetas que atraviesan la superficie del agua y permiten la respiración. En la base del abdomen poseen un par de remos, paletas o aletas natatorias que sirven para nadar. La pupa recién formada es de color blanco y comienza a oscurecerse a partir del extremo cefálico; después de un cuarto de hora la extremidad de la cabeza comienza a hacerse grisácea y durante la siguiente media hora el cefalotórax toma un color gris oscuro (Figura N° 7) **(Mirsa 1956 citado por Conde A., 2003)**

El período pupal dura de 1 a 3 días en condiciones favorables, con temperaturas entre 28 a 32°C. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período. En general las pupas de los machos se desarrollan más rápidamente que la pupa de las hembras, siendo esta más grande que la del macho.

### 2.3.5 Estado de Adulto



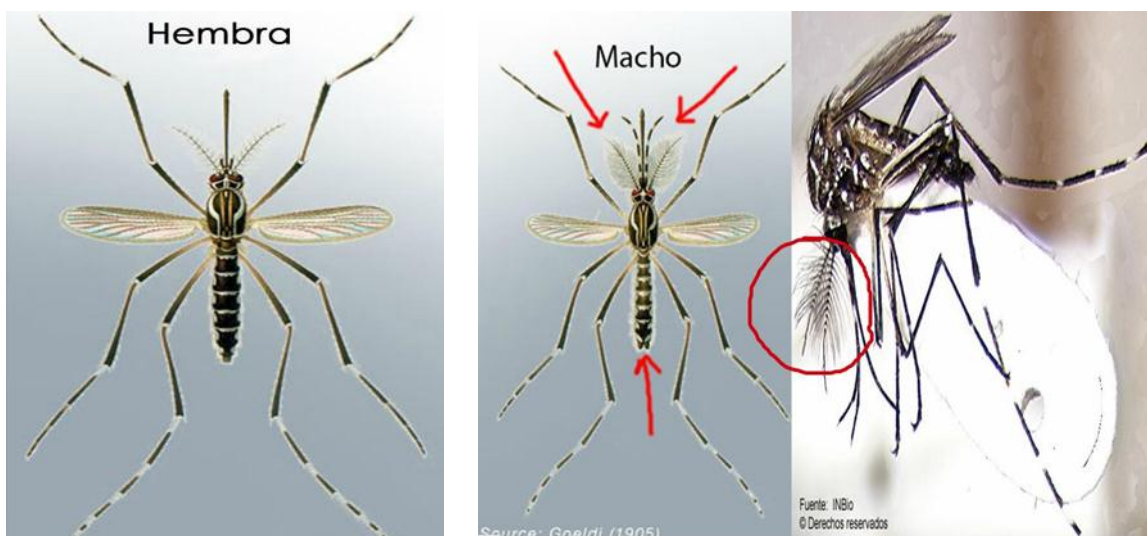
Figura 8: *Adulto hembra de A. aegypti L.* Fuente: *Montealegre y Hermosa, 2013*

El adulto *A. aegypti L* es un mosquito oscuro cuyos tarsos posteriores tienen franjas claras y la franja basal pálida, presenta en el mesonoto un patrón de escama formado por una lira. El abdomen también posee patrones de escamas blancas con pequeños puntos blancos (**CDC, 1980**) y la diferencia entre macho y hembra se encuentra primordialmente en sus antenas, ya que en machos se presentan antenas plumosas y en hembras es filiforme (Figura N° 9); además también se encuentra diferencia en su tamaño, ya que la hembra es más robusta que el macho (**Mirsa, 1956, citado por Conde, 2003**).



Al emerger de la pupa, el insecto adulto permanece en reposo permitiendo el endurecimiento del exoesqueleto y las alas. Dentro de las 24 horas siguientes a la emergencia pueden aparearse iniciándose la etapa reproductora del insecto. El sonido emitido por el batido de las alas de las hembras durante el vuelo atrae al macho hacia ella, pero una vez que la hembra ha tenido su alimentación sanguínea ocurren pocos apareamientos, porque ella debe batir sus alas con mayor rapidez para compensar el aumento de peso y este aumento en la frecuencia del movimiento de las alas no es atractivo para los mosquitos machos.

El apareamiento en general se realiza durante el vuelo pero en algunas ocasiones se lleva a cabo en una superficie horizontal o vertical. Al aparearse, el macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia e inserta su edeago dentro del receptáculo genital de la hembra, la bolsa copulatriz de la hembra se llena de espermatozoides, el que pasa a la espermática en uno o dos minutos. Esa inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produce durante toda su vida.



**Figura 9: Principales diferencias entre una hembra y un macho de *A. Aegypti L.***

Las hembras vuelan en sentido contrario al viento, siguiendo los olores y gases emitidos por el huésped. Cuando están cerca utilizan estímulos visuales para localizar al huésped mientras sus receptores táctiles y térmicos los guían hacia el sitio de alimentación.

Esta alimentación sanguínea es necesaria como fuente de proteína para el desarrollo de los huevos. La alimentación sanguínea y la postura se llevan a cabo principalmente durante el día, especialmente durante las primeras horas o a la media mañana y a media tarde o al anochecer. Pero el número de huevos que ovoposita una hembra durante su vida oscila entre los 300 y 750, dependiendo de factores como la longevidad de la hembra, el número total de ovoposición, la disposición de comida, la ingesta de la sangre y la edad de la hembra en relación con el número previo de ovoposición (**Goma 1966, citado por Montenegro 2008**). El macho al copular con la hembra es capaz con solo una fertilización fecundar todos los huevos, en condiciones ideales la especie de *A. aegypti* L. es capaz de vivir aproximadamente entre 131- 225 días, pero en estado naturales no llegan a un mes (**Rey, G. 2011**).

La dieta alimenticia del macho como la de la hembra es de líquidos azucarados como néctar de flores y frutos, pero solo la hembra es hematófaga, a pesar de que la hembra solo puede sobrevivir con líquidos azucarados como única fuente de alimentación, las hembras necesitan de la sangre para el desarrollo de sus huevos. (**CDC, 1980; citado por Conde A, 2003**)

### **2.3.6 Rango de Vuelo del *A. Aegypti* L**

La dispersión de vuelo de *A. aegypti* L. es muy limitada. Por lo general una hembra adulta no sobrepasa los 50 m de distancia de vuelo durante su vida, y a menudo permanece en la misma casa o lugar donde emergió siempre que disponga de huéspedes y sitios de reposo y de postura adecuados (**Nelson, 1986, citado por Ing. Agr. Guillermo Montero, 2009**).

Los basurales donde se almacenan pequeñas colecciones de agua en diversos recipientes (cubiertas de autos, latas, botellas, bolsas plásticas) brindan sitios adecuados para el establecimiento de esta especie por lo cual se esperaría que no se muevan demasiado de su lugar de emergencia. Es rara una dispersión de vuelo más de 100 m pero se ha demostrado que una hembra grávida puede volar hasta 3 km en busca de un lugar para poner sus huevos si no encuentra cerca un sitio apropiado. Los machos en cambio se dispersan menos que las hembras, (**Nelson, M.J.1986**).

## **2.4 Control Biológico**

El control biológico es la representación de plagas mediante sus enemigos naturales; es decir mediante la acción de parásitos, depredadores y patógenos; en donde cualquiera de estos le puede causar la muerte a insectos que son considerados plagas para los humanos y otros animales, los más comunes que son utilizados son los microorganismos que van desde virus, bacterias, protozoarios y nemátodos; por su eficacia en actuar de una forma rápida en la muerte de las plagas. El control biológico se considera natural, cuando se refiere a la acción de

organismos vivos sin la intervención del hombre, sin agentes químicos y son artificiales cuando es manipulado por el hombre, **(Carrera M, 2009)**.

La acción de las bacterias como control biológico ha sido de gran utilidad porque algunas de estas son patógenas para ciertos organismos, como en el caso de larvas de insectos, que al ingerirlas, enferman, se vuelven lentas, dejan de crecer y finalmente mueren producto de una lisis intestinal **(Carrera M, 2009)**

En la actualidad ha sido extraordinario la utilización de las bacterias para el control biológico, porque actúa con un porcentaje alto sobre la plaga a la que se quiere atacar, dando muerte a estas considerablemente. Frente a los problemas de resistencia de insecticidas de algunas plagas, es utilizada en todo el mundo el uso de entomopatológico específico como es el *Bacillus thuringiensis var. israeliensis*.

Desde el aislamiento del *Bti* por Tajori y Margalit (1976) en el desierto de Negev – Israel, ha sido probado en todo el mundo, encontrándose tóxico para larvas de mosquito del suborden Nematóceras, incluyendo 72 especies, siendo 22 especies de simúlidos y chironómidos (Chironomidae) **(Federici 1982, de Barjac 1984, Margalit y Dean 1985; citado por Ventosilla P., 2000)**. Este entomopatógeno es inocuo para la naturaleza ya que no ataca a otros invertebrados y vertebrados **(De Barjac 1978, De Barjac y Col 1984, citado por Parra, 1999)**, por ser tan interesante como control biológico, el *Bti* fue preparado comercialmente y utilizado en Francia por primera vez con el nombre de SPORINE **(Pantuwatana, 1987)** por los buenos resultados arrojados de la acción del *Bti* sobre larvas, ha sido aplicado para el control de vectores en varios países, teniendo un éxito en la disminución de plagas y muchos de estos países lo están produciendo comercialmente. **(Ventosilla P., 2000)**

#### 2.4.1 *B. thuringiensis* (Bt):

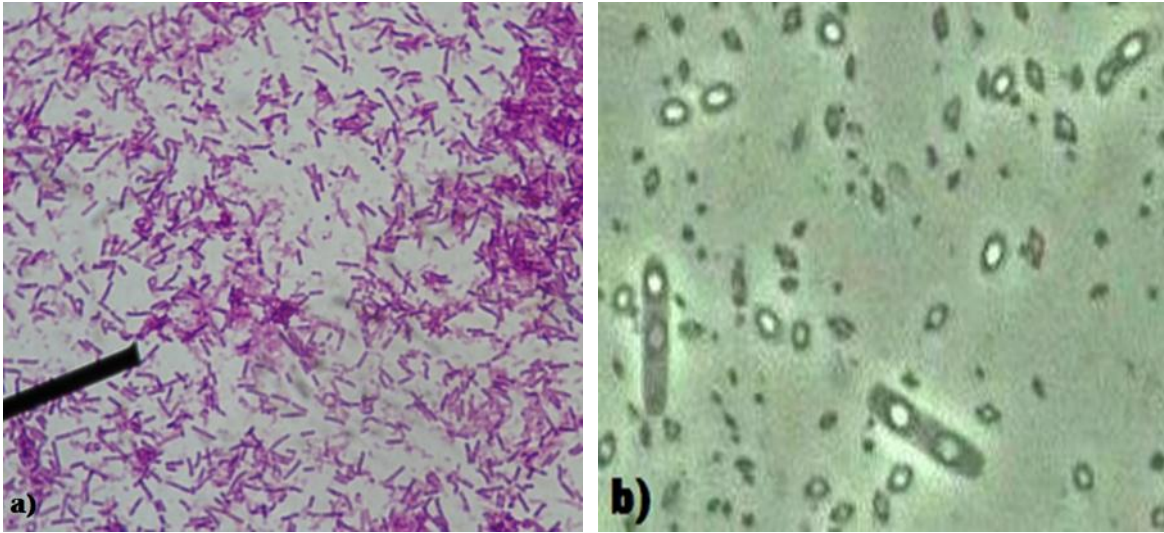


Figura 10: *B. Thuringiensis* var. *israeliensis* var *israeliensis* a) *Bti* con tinción de Gram b) endoesporas *Bti*

*B. thuringiensis* es una bacteria que se encuentra en el suelo, son anaeróbicas facultativas y pertenece al grupo de bacterias gram-positiva mediante la tinción de Gram (**Lecadet, 1970**), (figura N° 10) durante su ciclo de vida presenta dos fases de crecimiento: crecimiento vegetativo, en donde se duplican por bipartición cada 30-90 min.; y esporulación la cual es un programa de diferenciación de bacteria a esporas (**Soberon et al 2007, Bechtel D. et al, 1996**), mide aproximadamente entre 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y se caracteriza porque durante su desarrollo las células producen una espora subápical, uno o varios cuerpos parasporales (cristales proteicos) los cuales son los constituyentes y actúan como bioinsecticidas o sea tóxicos para los distintos invertebrados en especial larvas de los insectos (**Lecadet, 1970; Schnepf et al., 1998**).

La espora es latente en el ambiente por periodos muy largos en ausencia de humedad y nutrientes pero cuando encuentra condiciones adecuadas ricas en nutrientes puedes germinar y realizar su proceso vegetativo (**Bertel, P et al., 2008**)

El *Bt* ha sido el microorganismo más estudiado por considerarlo un agente como control biológico sobre insectos que transmite enfermedades y ha sido aislado en todo el mundo convirtiéndolo en un insecticida comercial, la primera bacteria de *Bt* fue aislada en 1902 en el gusano de seda (*Bombi mori*) en Japón por Ishiwata, no se describe oficialmente hasta que se volvió aislar por Berliner en 1915 a partir de las larvas enfermas de la polilla de la harina del mediterráneo (*Anagasta kuehniella*) en Turingia, Alemania, de ahí se deriva el nombre de la especie *thuringiensis* (Federici, 1999), y solo se aislaron cepa para insectos de lepidóptero considerándolo patógeno para atacar sus larvas; a raíz de este aislamiento, muchos científicos interesados en el *Bt* se dedica a investigar a fondo las esporas que produce este microorganismo para atacar a los diferente vectores.

Hoy en día se ha encontrado diversidad de *Bt* las cuales se han caracterizado en 45 serotipos y 58 serovariedades diferentes por sus proteínas presentes (**Bertel, P. et al., 2008**). Los cristales proteicos que desarrollan el *Bt* pueden presentar distintas morfologías en donde se pueden clasificar según las formas y van desde cúbicos, cuadrados, esféricos, bipirámides (**Khetan S, citado por Parra, 2001**); en algunos casos han asociado al tipo de morfología que presentan los cristales con el tipo de toxicidad que pueden causar, se ha distinguido que la morfología en los cristales bipirámides se asocia con cepas que tiene actividad contra los lepidópteros, mientras que los esféricos e irregulares tiene actividad contra lepidópteros y dípteros (**López-Meza et al, 1996**) y (**Benintende G, et al, 1999.**). La

tabla 1 muestra las principales especies de insectos susceptibles a diferentes subespecies de *B. thurigiensis* según **Shelton et al (2002)**.

Los cristales que se forman en la esporulación del *Bti* están compuestos por proteínas, siendo algunas de éstas muy tóxicas para larvas de insectos de los órdenes lepidóptero, díptera y coleóptera, siendo el *Bti* muy eficiente como control biológico en la agricultura ya que ataca principalmente a las plagas de los órdenes lepidóptera y coleóptera que dañan los cultivos de plantas de carácter alimentario, deteriorando y afectando la producción de estos, también ha sido muy frecuentemente utilizado como control biológico para el orden díptera, porque la mayoría de las enfermedades humanas causadas por vectores son transmitidas por estos, también se resalta que la proteína es biodegradable por que no afecta el ecosistema y no contamina aguas ni suelos, y no afecta por ningún motivo la salud humana. (**Carrera M. 2009**).

El *Bti* en el laboratorio crece en gran variedad de medios no selectivos, siendo el caldo nutritivo y Luria Bertani (LB) los más utilizados, la temperatura más apropiada para su crecimiento está entre 26°C y 30 °C aunque a veces el rango de la temperatura para su crecimiento puede oscilar desde los 15°C hasta los 45°C, pero cuando se encuentra a una temperatura mayor de 32 °C baja su acción de producir plásmidos, no es exigente en cuando a su pH, por que crece a un rango de 6,5 y 7,5 ( **Carrera M, 2009**)

La morfología de las colonias de *Bti* crecidas en cajas de Petri varía según el medio de cultivo que se ha utilizado, cuando se siembra en agar nutritivo forma colonias circulares con bordes irregulares, perfiles plano y color marfil claro, su textura es seca y cerosa, observando en colonias maduras que su círculo central

posee una superficie de apariencia más brillantes y lisa que el halo externo, debido a la esporulación de las células. (Medrano, O et al, 2000, citado por Carrera M. 2009)

Tabla 3. Subespecies de *B. thuringiensis* con actividad insecticidas contra diferentes insectos. (Tomado de Berlitz et al.)

ORDEN	GÉNERO Y ESPECIE	VARIEDAD DE BT	AUTOR
Lepidóptera	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797)	<i>Bt aizawai</i>  <i>Bt dendrolimus, Bt Kurstaki, Bt aizawai, Bt thuringiensis, Bt darmstadiensis. Bt morrisoni, Bt galleriae, Bt entomocidus, Bt tolworthi, Bt ostriniae, Bt nigeriensis, Bt monterrey. Bt ssp</i>	Berlitz e Fiuza (2004) Polanczyk et al. (2000)  Polanczyk et al (2003)  Silva et al (2004)
	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hubner, 1918)	<i>Bt thuringiensis, Bt alesti, Bt fukuokaensis, Bt Kurstaki. Bt kurstaki, Bt aizawai. Bt ssp</i>	Bobrowski et al. (2001)  Bobrowski et al (2002) Silva et al. (2004)
	<i>S.exigua</i> (Hubner, 1808) <i>S. frugiperda</i>	<i>Bt ssp</i>	Bravo et al (1998)
	<i>S. exigua, S. frugiperda, S. littoralis</i> (Boisduval, 1828), <i>Helicoverpa armenigera</i> (Hubner, 1808)	<i>Bt ssp</i>	Martínez et al.(2004)
	<i>Trichoplusia ni</i> (Hueb., 1802)	<i>Bt ssp</i>	Bravo et al. (1998)
	<i>S. littoralis</i>	<i>Bt Kenya</i>	Ben-Dov et al (2003)



	<i>Heliothis virescens</i> (Fabr.,1781) <i>S. littoralis, Agrotis ypsilon</i> (Hufnagel,1767)	<i>Bt ssp</i>	Bernhard et al (1997)
	<i>Plutella xilostella</i> (L. 1758)	<i>Bt kurstaki</i>	Schuler e Emden (2000)
	<i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller,1873)	<i>Bt kurstaki</i>	Kroschel e Koch (1996)
	<i>Pieris brassicae</i> (Linneé, 1758)	<i>Bt ssp</i>	Bernhard et al. (1997)
	<i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus,1758)	<i>Bt galleriae</i>	Dubovskii et al. (2005)
<b>Coleóptera</b>	<i>Oryzophagus orizae</i> (Lima,1936)	<i>Bt ssp</i>	Pinto e Fiuza (2003)
	<i>Gonipterus scutellatus</i> (Gyllenhal,1833)	<i>Bt Kurstaki</i>	Santolamazza-Carbone e Ana-Magán (2004)
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say,1824)	<i>Bt tenebrionis</i>	Loseva et al. (2002)
	<i>Phaedon cochleariae</i> (Fabricius,1792)	<i>Bt ssp</i>	Bernhard et al. (1997)
	<i>Tenebrio molitor</i> (L.,1758)	<i>Bt ssp</i>	Silva et al.(2004)
<b>Isóptera</b>	<i>Nasutitermes ehrhardti</i> (Holmgren)	<i>Bt sooncheon, Bt roskildiensis, Bt yunnanensis, Bt huarzhongiensis, Bt brasiliensis, Bt colmeri, Bt kurstaki</i>	Castilhos-Fortes et al. (2002)
<b>Himenóptera</b>	<i>Acromirmex crassispinus</i> (Forel, 1909) <i>A. lundi</i> (Guérin, 1838)	<i>Bt ssp</i>	Pinto et al (2003)
<b>Díptera</b>	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Say, 1823)	<i>Bt ssp</i>	Silva et al. (2004)
	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus,1762)	<i>Bt ssp</i>	Cavados et al (2001) Sun et al (1996)

		<i>Bt ssp</i>	
	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Bt kyushuensis</i>	Bernhard et al (1997)
	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i> (Liston, 1901)	<i>Bt sotto</i>	Ohgushi et al. (2003)
	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1895), <i>An. darlingi</i> (Root, 1926), <i>An. Deaneorum</i> (Rosa-Freitas, 1989), <i>An aquasalis</i> (Curry, 1932), <i>Culex. Quinquefasciatus</i>	<i>Bt israeliensis</i>	Rabinovitch et al. (1999)
	<i>Simulium pertinax</i> (Kollar, 1832)	<i>Bt israeliensis</i>	Cavados et al. (2004)
	<i>An. stephensi</i> (Liston, 1901) <i>An. fluviatilis</i> (James, 1902), <i>An. Culicifacies</i> (Giles, 1901)	<i>Bt israeliensis</i>	Amalraj et al. (2000)

ssp = sin la identificación de aislados de Bt subespecie

#### 2.4.2 *B. thuringiensis* var. *israeliensis* (*Bti*)

El *B. thuringiensis* subespecie *israeliensis* (*Bti*), produce tres toxinas Cry (Cry4A, Cry4By Cry11A) y dos toxinas Cyt (Cyt1A y Cyt2A) con alta actividad insecticida contra larvas de diferentes especies de mosquitos y otros dípteros (Soberón y Bravo, 2007). El *Bti* se ha ocupado por más de 30 años en el control de mosquitos y moscas transmisores de enfermedades como el dengue, la malaria y la oncocercosis sin que a la fecha se haya reportado la aparición de resistencia. *Bti* se ha ocupado por más de 30 años en el control de mosquitos y moscas transmisores de enfermedades como el dengue, la malaria y la oncocercosis sin que a la fecha se haya reportado la aparición de resistencia.

Las toxinas Cry y Cyt son toxinas formadoras de poro. Esto significa que para matar a un insecto blanco, las toxinas Cry y Cyt se insertan en la membrana de las células apicales del intestino formando un poro que permite el paso de iones y agua, provocando un desbalance osmótico y finalmente la lisis celular. (**Soberón y Bravo, 2007**).

### 3. METODOLOGÍA

El enfoque metodológico del proyecto fue cualitativo y cuantitativo, llevando a formar un modelo Mixto (**Sampieri et al, 2003**) en donde se mezcla los dos enfoques metodológicos simultáneamente durante todo el proceso de la investigación. Se determinó la dosis media letal ( $DL_{50}$ ) del *B. thuringiensis* var. *israeliensis* para el III estadio tardío y IV estadio temprano de larvas de *A. aegypti* (Linnaeus, 1762), vector transmisor del virus del dengue, de igual manera se describió macroscópicamente de las colonias del *Bacillus thuringiensis* var. *Israelinesis* cultivada en agar tripticasa soya.

#### 3.1. Recolección Muestras de *A. aegypti* (Linnaeus, 1762)

Para establecer las colonias de *A. aegypti* L. fue necesario la instalación de ovitrampas, elaboradas en envases plásticos oscuros, con un volumen de 250 mL de agua y un soporte de madera (baja lenguas). Las ovitrampas corresponden a las utilizadas en Argentina (**CIPEIN OV-1**), éstas se rotularon con etiquetas que identificaban el lugar y fecha de instalación. Se dispusieron en algunas viviendas del barrio Cándido Leguízamo comprendidas entre las calles 27 y 30, escogiéndose 10 casas al azar en cuyos patios se encontraba gran cantidad de residuos inservibles que servían de criaderos (Ver figura N° 11). Las ovitrampas se ubicaron durante los meses de Febrero a Abril de 2013, monitoreándolas cada 5 días, tiempo durante el cual se realizó la colecta de huevos y larvas. A partir del momento de su instalación se realizó la respectiva revisión y si se encontraban larvas éstas se

depositaban en recipientes plásticos con tapas herméticas; si se encontraban huevos se procedía a retirarlos mediante lavado de baja lengua.

Una vez se colectaron los huevos y larvas (si los huevos ya habían eclosionado) se llevaron al laboratorio para realizar la respectiva identificación, se separaron los huevos y se dispusieron en agua libre de cloro para que eclosionaran a su etapa larval y realizar la respectiva identificación taxonómica (**Bertel et al. 2008**).



**Figura 11: Ovitrapas ubicadas cerca de posibles sitios de ovoposición**

### **3.2. Población de Estudio**

La muestra de estudio fue aproximadamente 420 larvas del mosquito *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) tomando 180 larvas por cada bioensayo que se realizó cada semana, incluyendo las de control, estas fueron tomadas de la colonia establecida con anterioridad en el laboratorio de biología de la Universidad Surcolombiana, al obtener y criar en cautiverio un grupo aproximadamente de 150 mosquitos adultos para que gracias a su reproducción natural se obtuvieran larvas desde el primer hasta el cuarto estadio, disponiendo de material necesario para los respectivos bioensayos.

### 3.3. Identificación de Larvas

Una vez recolectadas las larvas, se emplearon claves de identificación morfológicas (**Rossi G et al, 2003**) aislando las larvas que correspondieran a la especie *A. aegypti* L. para establecer la respectiva colonia.

Para la respectiva observación de las larvas en el laboratorio se utilizaron los siguientes elementos: estereoscopio binocular 3x, cajas de petri, pincel pelo de Martha, beaker de 100 mL y papel filtro

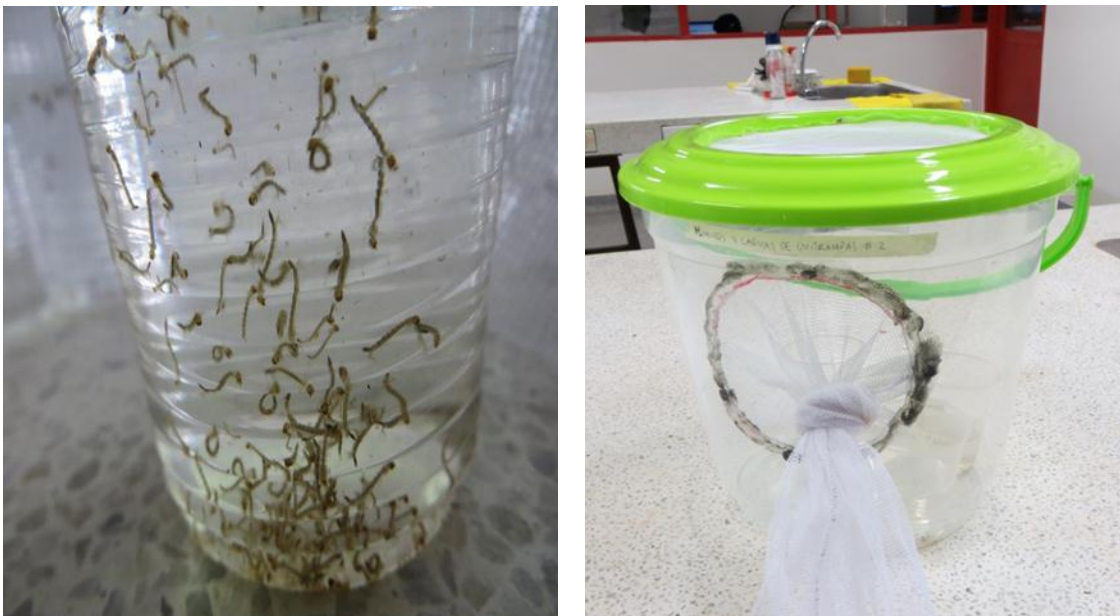


Figura 12: 1. Larvas de *A. aegypti* L. en tercer y cuarto estadio. 2. Jaula mantenimiento de adultos Fuente: Montealegre y Hermosa, 2013

### 3.4. Mantenimiento de las Colonias *A. Aegypti* Linnaeus, 1762

El protocolo a seguir en el laboratorio siguió los siguientes pasos:

**Mantenimiento de las Larvas:** Las larvas fueron mantenidas en vasos desechables de siete onzas que contiene agua libre de cloro, para garantizar su desarrollo; su alimentación consiste en comida para peces pulverizada suministrándola cada dos días (Figura N° 12).

**Mantenimiento de las Pupas:** Las pupas se aislaron de las larvas en agua libre de cloro y se empleó un velo en la boca del recipiente para que cuando llegaran a su estado adulto estos no escaparan. Una vez cambiaron de estado a adultos, estos se liberaron en la jaula de cría (recipiente de plástico artesanal).

**Mantenimiento de la jaula de cría de los adultos:** Los adultos se mantuvieron en una jaula de cría, recipiente hermético de veinticuatro centímetros de diámetro y dieciocho centímetros de alto, (Figura N° 12). La dieta alimenticia consistió en solución azucarada humedecida en algodón, haciendo recambios cada dos días. Para las hembras, especialmente, se les proporcionó sangre humana durante 30 minutos aproximadamente cada dos días, esto para que maduraran los huevos que ellas ovopositaron.

**Mantenimiento de los Huevos:** Para la Ovoposición se empleó un vaso de siete onzas con agua libre de cloro y un baja lenguas sumergido a la mitad, en donde las hembras ovopositaban. Con ayuda de un pincel de pelo de Martha se retiraron los huevos sumergiéndolos en el mismo vaso con agua y se taparon con un velo, rotulando el vaso con el número de la jaula donde se tomó la muestra; las jaulas se mantuvieron en el laboratorio a una temperatura promedio de 25 °C y una humedad relativa de 60% con un fotoperiodo de 12 horas.

### **3.5. Técnicas de Tinción empleadas**

#### **3.5.1. Tinción de GRAM**

La tinción de Gram es usada para clasificar bacterias, conocer sus formas tamaños, morfología celular y la reacción a la tinción para diferenciar una bacteria Gram positiva de una Gram negativa. El procedimiento que se llevó a cabo fue:

En un porta objetos limpio se colocó una gota de agua destilada a la que con el asa de siembra, previamente esterilizada se tomó una muestra de las colonias de *Bti* establecidas anteriormente, extendiéndolas y fijándolas calentando suavemente a la llama del mechero de bunsen hasta que secaron. El procedimiento que se siguió para la tinción fue:

1. Agregar cristal violeta sobre toda la muestra durante un minuto. Pasado este tiempo se lava con abundante agua
2. Se agrega reactivo de Lugol cubriendo toda la muestra durante un minuto, después de este tiempo se lava con abundante agua
3. Se cubre la muestra con alcohol acetona para decolorarla. Este debe cubrir la muestra por 30 segundos, después de este tiempo se lava con abundante agua.
4. Por último se agrega una tinción de contraste con Safranina, cubriendo la muestra durante un minuto, después de este tiempo se lava con abundante agua y se deja secar y observar al microscopio, ajustando con cada uno de los objetivos. Manual de prácticas de laboratorio Valencia, 2010.

### **3.5.2. Tinción de Esporas con Verde de Malaquita**

La tinción con verde de malaquita es una técnica que permite observar las esporas bacterianas diferenciándolas de las células vegetativas.

De las colonias de *Bti* cultivadas en el agar tripticasa soya (ver anexo) se realizó un frotis y se tiñó con verde de malaquita al 5% para observar la esporulación. El procedimiento a seguir fue:

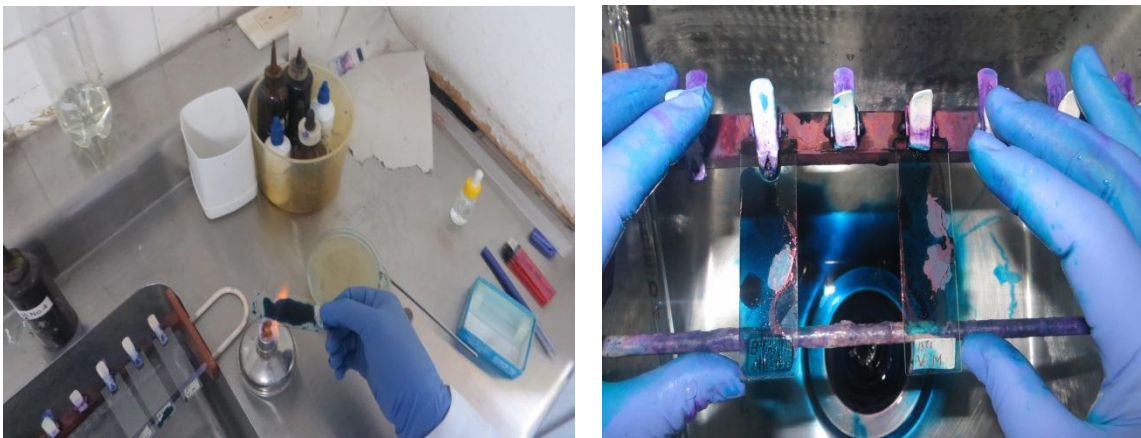
1. Preparar un extendido del microorganismo



2. Fijar con calor y cubrir todo el portaobjeto con solución de verde de malaquita al 5 %

3. Calentar hasta emisión de vapores y seguir dicho calentamiento durante tres minutos (No permitir que se seque el colorante. Si esto ocurriera agregar colorante sobre el preexistente y no sobre la parte seca, hasta cubrirlo nuevamente).

4. Lave con agua y cubrir con solución Safranina. Dejar actuar 30 segundos. Lavar con agua, secar y observar con objetivo de inmersión. **(Parra et al, 2003).**



**Figura 13: Proceso de tinción con Verde de malaquita a la muestra del Bti en laboratorio.**

### 3.6. Determinación del Número de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C) Presentes en el Producto a Evaluar

La técnica utilizada fue la de vertido en placa (siembra en profundidad), tomando como concentración inicial 1mg de *Bti* liofilizado comercial (VECTOBAC G12) suspendido en 100 mL de solución salina estéril al 0.86%; a partir de esta primera dilución  $10^{-1}$  se realizaron cinco diluciones seriadas más, según el factor de dilución 1/10 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ).

Para evaluar el crecimiento de las colonias del *Bti* comercial VECTOBAC G 12, se prepararon 300 mL de agar tripticasa soya y como inóculo se usó 0.1 ml de cada dilución del producto comercial y se sembró en superficie y por duplicado en cajas de Petri, las cajas se incubaron durante 24 a 48 horas, a una temperatura de 37°C.

, En las cajas que presentaron entre 30 y 300 colonias, se calculó el número de unidades formadoras (UFC/g o ml de muestra), así:

$$\frac{UFC}{\frac{g}{ml} \text{ de muestra}} = N^{\circ} \text{ de colonias} = \frac{1}{\text{factor de dilucion}}$$

Para evaluar el crecimiento de las colonias del *Bti* comercial se describieron las características macroscópicas de las colonias: forma, bordes, color, consistencia y superficie.

### **3.7. Pruebas Biológicas**

#### **3.7.1. Bioensayos de Laboratorio**

De acuerdo a la metodología se determinó en condiciones de laboratorio la concentración del *B. thuringiensis* var. *israeliensis* (VECTOBAC G12) sobre las larvas de *A. aegypti* (Linnaeus, 1762), empleándose en III estadio tardío y IV estadio temprano

Se preparó una solución patrón de *Bti* (VECTOBAC G12) con 1 mg (200 Unidades Tóxicas Internacional (UTI)), disueltas en 100 ml de agua destilada estéril, correspondiendo a la solución  $10^{-1}$ , a partir de la cual se prepararon cinco diluciones seriadas ajustando a un volumen final de 100 mL de agua. Estas diluciones correspondieron a las distintas concentraciones del producto a usar.

A cada una de las dosis se le realizaron tres réplicas por cada concentración establecida, colocando 10 larvas por recipiente plástico según la metodología propuesta por Busvine en 1957.

Para analizar los resultados, estos, se procesaron mediante el análisis Probit paquete estadístico SPSS 20.00 (Finney, 1952) para obtener de esta manera la dosis mínima letal DL50 del producto liofilizado VECTOBAC G12, según la U.T.I que compone el *Bti*.

#### **3.7.2. Residualidad**

Para medir la residualidad del producto se tomaron cinco muestras (cada una con tres réplicas), con 100 mL de agua libre de cloro y cuya concentración utilizada fue de  $10^{-1}$  con su respectivo control (agua libre de cloro sin la concentración del producto *Bti* a evaluar) a cada una de estas muestras, se le adicionó una porción de alimento (comida para peces, previamente triturada).

Una vez introducidas las larvas en cada uno de los recipientes, se realizó el respectivo control después de veinticuatro horas, para observar si hubo muerte en los individuos. En los casos donde se presentó muerte se retiraron y de igual forma se procedió a descartar cinco mililitros de agua de cada uno de los vasos pero se volvió a llevar al volumen de cien mililitros con agua libre de cloro sin el producto (VECTOBAC G12), conservando el montaje a una temperatura promedio de 24 a 27°C. Pasados quince días, se adicionaron nuevamente diez larvas en cada uno de los montajes y veinticuatro horas después se procedió a realizar el control respectivo, observando si hay mortalidad total de larvas, al igual que en la primera muestra se retiraron diez mililitros de agua y se le adicionó la misma cantidad para conservar el mismo volumen de cien mililitros.

### **3.7.3. Determinación de la Muerte De Larvas De *A. aegypti* L.**

Para determinar la muerte de las larvas, estas se llevaron al estereoscopio binocular 3x, donde se observó minuciosamente, si las larvas presentaban movimiento aparente, en el caso que las larvas estuvieran inmóviles, con ayuda de una aguja de disección se ejerció presión levemente sobre el cefalotórax, si no se observaba movimiento, se daba la prueba como positiva.

### **3.8. Divulgación y Socialización del Proyecto**

La experiencia se llevó a cabo en tres instituciones educativas del municipio de Neiva: María Cristina Arango, Rafael Pombo y Colegio Departamental Tierra de Promisión, con estudiantes de básica secundaria que comprendían los grados 6 a 9 y cuyas edades oscilaban entre los 11 a 16 años. Mediante la presentación con diapositivas, se ilustró lo realizado durante el proyecto, además con actividades complementarias que consistieron en preguntarles a los estudiantes sobre qué

conocían del virus del dengue y el mosquito trasmisor y en una hoja en blanco, se les solicito que dibujaran (si lo conocían) al mosquito que trasmite el virus del dengue. Finalizada la presentación, se realizó un juego de integración donde se formaron grupos y se preguntó sobre lo ilustrado durante la presentación, indagando de esta forma el conocimiento de los estudiantes.

Estas actividades se realizaron durante los meses de mayo y agosto de 2013, cada sesión con duración de dos horas en cada uno de los grados e implementada una vez.

Se realizó una presentación didáctica sobre lo desarrollado durante el proyecto; antes de comenzar se indagó entre los estudiantes su conocimiento y percepción sobre el dengue y el mosquito trasmisor de este virus

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinación de las Concentraciones del *B. thuringiensis. var israeliensis* liofilizado Utilizado en Medidas de U.F.C

Las concentraciones que se evaluaron fueron los siguientes:

Tabla 4 Concentraciones del *Bti* en Unidades Formadoras de Colonia U.F.C

DOSIS	U.F.C/ml
$10^{-1}$	> 300
$10^{-2}$	> 300
$10^{-3}$	$1.48 \times 10^5$
$10^{-4}$	$3.6 \times 10^5$
$10^{-5}$	< 30
$10^{-6}$	< 30
Agua (destilada)	0

Las dosis de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  estuvieron por encima de las 300 colonias y las dosis  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  están por debajo de las 30 colonias (ver Tabla N° 4), observando de esta manera las principales características macroscópicas de las colonias formadas.

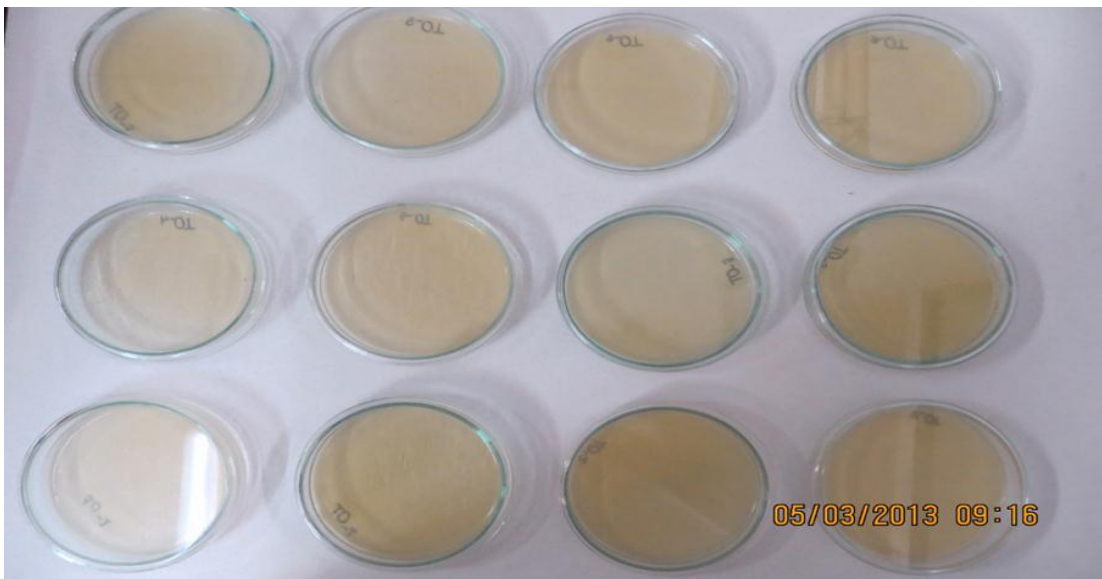


Figura 14: Medios de cultivo de Agar tripticasa Soya



**Figura 15: Medios de cultivo agar tripticasa Soya con colonias del *B. thuringiensis* var. *israeliensis***

Las colonias de Bti presentaron las siguientes características: Forma circulares, con bordes irregulares, sin elevación aparente y de color marfil claro, (Ver figura N° 15) consistencia seca y superficie cerosa. Dado que la bacteria es esporulada, esta característica fue observada en colonias maduras del microorganismo presentándose sobre su superficie central una apariencia más brillante y lisa en el halo externo de las colonias (**Medrano, O et al, 2000, citado por Carrera M. 2009**).

#### **4.1.1 Dosis Media Letal DL<sub>50</sub>:**

El efecto letal en las dosis del *B. thuringiensis* var. *israeliensis* (VECTOBAC G) sobre las larvas de *A. aegypti* L, (Tabla 5) a las 4 horas después del tratamiento se observó la primera mortalidad de larvas con la dosis de  $10^{-1}$ , cabe notar que en dicha dosis se obtuvo en 12 horas mortalidad del 90%, mientras que en la dosis de  $10^{-6}$  se obtuvo la mortalidad del 1%, siendo ésta; la dosis en que presento el menor porcentaje de muertes.



Figura 16: Bioensayos del BTI sobre larvas de *A. aegypti* L

### BIOENSAYO 1:

01 de Abril del 2013

**Tabla 5.** Mortalidad de *A. aegypti* L. por efecto del *Bti* (VECTOBAC G) en condiciones de laboratorio

MORTALIDAD DE LARVAS TIEMPO						
Concentración	Número de larvas	4h	8h	12h	24h	48h
10 <sup>-1</sup>	10	3	5	2	0	0
10 <sup>-2</sup>	10	0	4	5	1	0
10 <sup>-3</sup>	10	0	0	3	3	0
10 <sup>-4</sup>	10	0	0	1	1	1
10 <sup>-5</sup>	10	0	0	0	0	2
10 <sup>-6</sup>	10	0	0	1	0	0
Control (agua)	10	0	0	0	0	0



## REPLICA

MORTALIDAD DE LARVAS TIEMPO						
Concentración	Número de larvas	4h	8h	12h	24h	48h
$10^{-1}$	10	6	3	1	0	0
$10^{-2}$	10	0	2	6	2	0
$10^{-3}$	10	0	2	3	1	0
$10^{-4}$	10	0	0	4	0	0
$10^{-5}$	10	0	0	0	2	0
$10^{-6}$	10	0	0	0	0	0
Control (agua)	10	0	0	0	0	0

## BIOENSAYO 2

17 de Abril del 2013

**Tabla 6.** Mortalidad de *A. aegypti* L. por efecto de *Bti* (VECTOBAC G) en condiciones de laboratorio

.						
Concentración	Número de larvas	4h	8h	12h	24h	48h
$10^{-1}$	10	0	9	1	0	0
$10^{-2}$	10	0	8	0	2	0
$10^{-3}$	10	0	6	0	0	2
$10^{-4}$	10	0	3	2	1	0
$10^{-5}$	10	0	0	0	2	0
$10^{-6}$	10	0	0	0	0	0
Control (agua)	10	0	0	0	0	0

## REPLICA

MORTALIDAD DE LARVAS TIEMPO						
Concentración	Número de larvas	4h	8h	12h	24h	48h
$10^{-1}$	10	0	7	1	0	0
$10^{-2}$	10	0	0	5	2	0
$10^{-3}$	10	0	0	6	1	0
$10^{-4}$	10	0	0	2	3	0
$10^{-5}$	10	0	0	0	4	0
$10^{-6}$	10	0	0	0	0	0
Control (agua)	10	0	0	0	0	0

## BIOENSAYO 3

6 de Mayo del 2013

**Tabla 7.** Mortalidad de *A. aegypti* L. por efecto de *Bti* (VECTOBAC G) en condiciones de laboratorio

MORTALIDAD DE LARVAS TIEMPO						
Concentración	Número de larvas	4h	8h	12h	24h	48h
$10^{-1}$	10	0	6	3	0	0
$10^{-2}$	10	0	0	4	2	0
$10^{-3}$	10	0	0	5	3	1
$10^{-4}$	10	0	0	0	4	0
$10^{-5}$	10	0	0	3	1	0
$10^{-6}$	10	0	0	0	2	0
Control (agua)	10	0	0	0	0	0

## REPLICA

MORTALIDAD DE LARVAS TIEMPO						
Concentración	Número de larvas	4h	8h	12h	24h	48h
$10^{-1}$	10	8	2	0	0	0
$10^{-2}$	10	0	4	2	1	1
$10^{-3}$	10	0	0	6	2	0
$10^{-4}$	10	0	0	0	4	2
$10^{-5}$	10	0	0	5	2	1
$10^{-6}$	10	0	0	0	1	1
Control (agua)	10	0	0	0	0	0

### 4.1.2. Modelo Probit

El modelo Probit, es ampliamente usado para determinar la toxicidad de sustancias biológicas o químicas, además de poder estimar la  $DL_{50}$  a usar para la eliminación de las larvas de *A. aegypti* L. Este modelo fue el utilizado para determinar la fuerza de la relación entre la dosis y mortalidad, así como para determinar la dosis adecuada del *Bti* para asegurar la eliminación en un 50% y 90%.

**Tabla 8.** Mortalidad de larvas de *A. aegypti* L. obtenida con seis concentraciones de *Bti*, bajo condiciones de laboratorio.

Dosis	Log- Dosis	Cantidad total de larvas	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
10 <sup>-1</sup>	-1	10	9	9,512
10 <sup>-2</sup>	-2	10	9	8,622
10 <sup>-3</sup>	-3	10	8	7,000
10 <sup>-4</sup>	-4	10	4	4,834
10 <sup>-5</sup>	-5	10	3	2,717
10 <sup>-6</sup>	-6	10	1	1,202

La dosis letales obtenidas mediante el análisis Probit se muestra en la Tabla 9 y grafica N° 4 donde la DL<sub>50</sub> (Dosis Letal Media) fue de 0,0001 y el límite de confianza inferior de 0,0001 y superior de 0,002 y para la DL<sub>90</sub> (Dosis Letal Máxima) fue de 0,022 y los límites de confianza inferior de 0,001 y superior 4,771. El análisis de chi cuadrado demostró homogeneidad en los resultados, puesto que el ajuste de Pearson es de 1,518 lo que determina que si es mayor a 0,05, el modelo Probit está bien ajustado.

**Tabla 9.** DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> obtenida para el BTI sobre larvas de *A. aegypti* L.

CONTROL BIOLÓGICO	DL <sub>50</sub>	LIMITES DE CONFIANZA (95%)		DL <sub>90</sub>
		INFERIOR	SUPERIOR	
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i>	0,0001	0,146	0,987	0,022

Chi- cuadrado 1,518 gl 3 sig 0,678

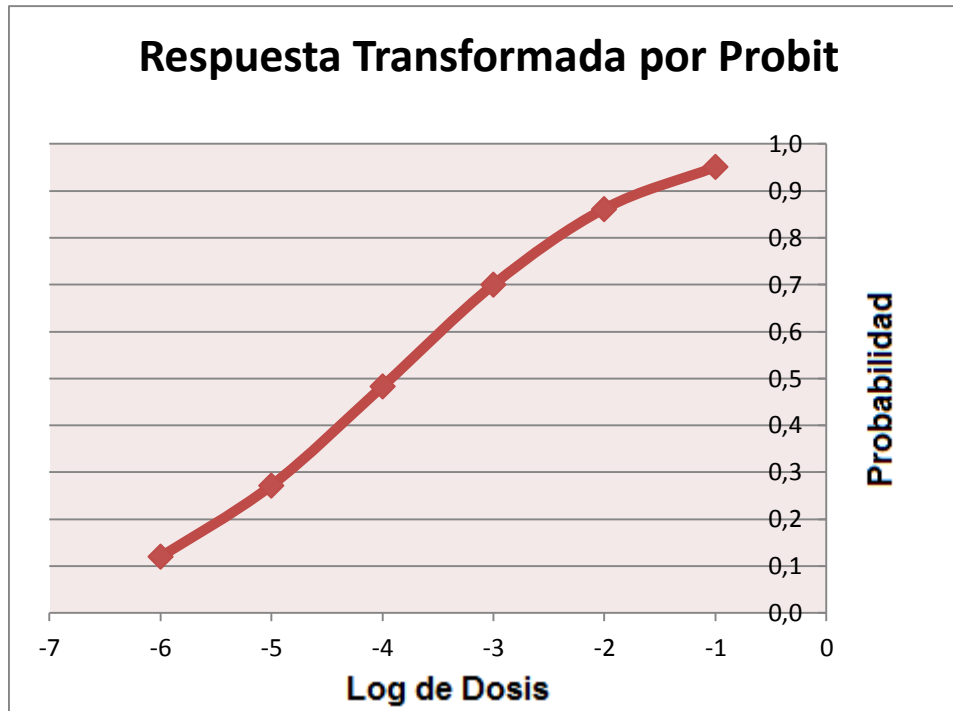


Gráfico 4; Respuestas transformada por Probit

#### 4.2. Residualidad

La residualidad del producto VECTOBAC G12 se midió a tiempo cero, desde el inicio del montaje con observación cada 24 horas y con recambio de agua cada 15 días realizando el respectivo control, donde se extrajo 10 mL de agua y se le adicionó la misma cantidad de esta pero sin el producto. Durante los treinta primeros días se verificó la muerte total de las larvas, pasados los cuarenta y cinco días se evidenció una resistencia al producto de aproximadamente el 20%, manteniéndose de esta manera hasta los sesenta días después. Dos meses y medio de haber puesto el montaje y realizar los respectivos recambios del agua, la mortalidad de las larvas fue del 55%, resultado que después de 75 días de haber aplicado el producto muestra la eficacia del *Bti*

**Tabla 10.** Porcentaje de mortalidad de *A. aegypti* L. por efecto residual de *Bti* (VECTOBAC G) en condiciones de laboratorio (Bioensayo1)

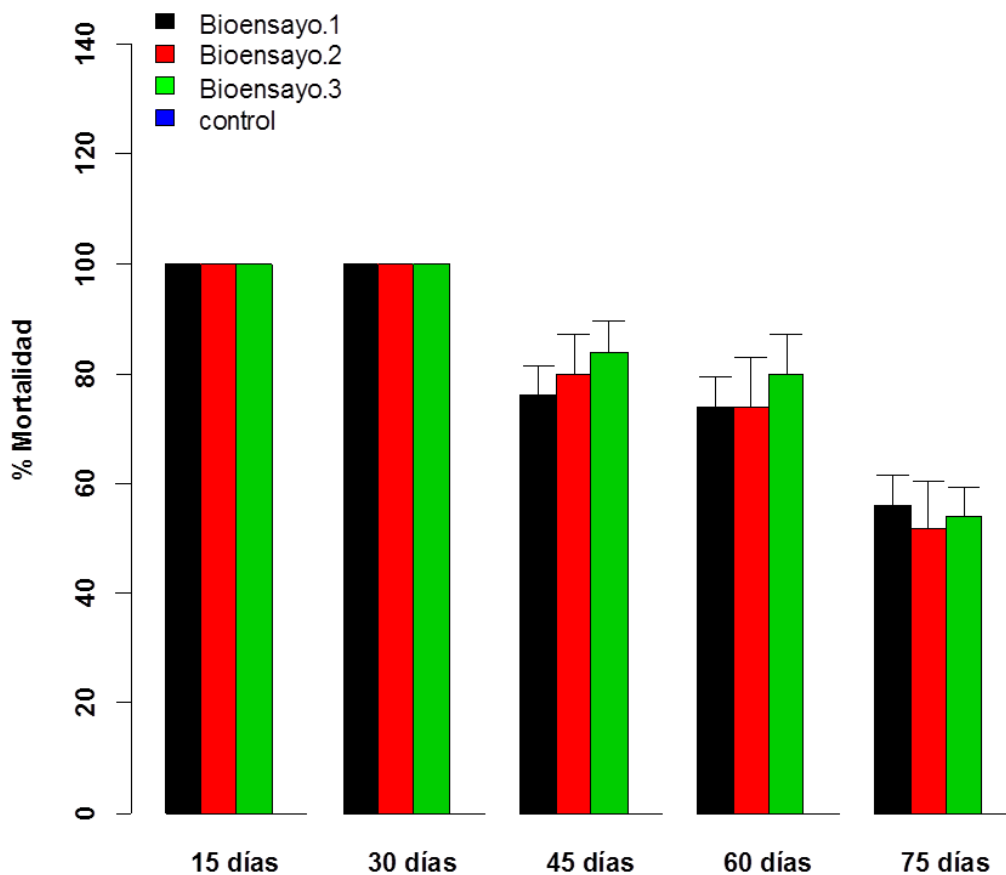
<b>PORCENTAJE DE MOTALIDAD % (Cada 15 Días)</b>						
<b>DOSIS</b>	<b>Número de larvas</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>75</b>
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	80	80	50
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	80	70	60
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	70	80	60
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	80	70	50
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	70	70	60
<b>promedio</b>	10	100	100	76	74	56
<b>Control (agua)</b>	10	0	0	0	0	0

**Tabla 11.** Porcentaje de mortalidad de *A. aegypti* L. por efecto residual de BTI (VECTOBAC G) en condiciones de laboratorio (Bioensayo 2)

<b>PORCENTAJE DE MOTALIDAD % (Cada 15 Días)</b>						
<b>DOSIS</b>	<b>Número de larvas</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>75</b>
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	90	80	60
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	80	80	60
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	80	70	40
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	70	60	50
<b>10<sup>-1</sup></b>	10	100	100	80	80	50
<b>Promedio</b>	10	100	100	80	74	52
<b>Control (agua)</b>	10	0	0	0	0	0

**Tabla 12.** Porcentaje de mortalidad de *A. aegypti* L. por efecto residual de BTI (VECTOBAC G) en condiciones de laboratorio (Bioensayo 3)

PORCENTAJE DE MORTALIDAD (Cada 15 Días)						
DOSIS	Número de larvas	15	30	45	60	75
10 <sup>-1</sup>	10	100	100	90	80	50
10 <sup>-1</sup>	10	100	100	90	80	60
10 <sup>-1</sup>	10	100	100	80	80	50
10 <sup>-1</sup>	10	100	100	80	70	60
10 <sup>-1</sup>	10	100	100	80	90	50
<b>Promedio</b>	10	100	100	84	80	54
<b>Control (agua)</b>	10	0	0	0	0	0



**Gráfico 5:** Residualidad del Producto. %Mortalidad por días

### 4.3. Divulgación y Socialización del Proyecto en Centros Educativos

#### 4.3.1. Presentación a los Estudiantes



Figura 17: Presentación del proyecto ante estudiantes de secundaria



Las actividades realizadas durante la presentación fueron:

#### **4.3.2. Ideas Previas “El Dengue en mi Mundo”**

En términos generales, la percepción que se tuvo al realizar las preguntas a los estudiantes acerca de: ¿Qué era el dengue? ¿Quién o qué causa esta enfermedad? ¿Conocen el nombre del zancudo que trasmite el dengue? ¿Conocen cómo se propaga este mosquito? etc., se acerca al concepto general según los referentes teóricos, puesto que los estudiantes respondieron de manera acertada a las preguntas, pero sus respuestas son limitadas y referidas a lo que han escuchado de los medios de comunicación y de las campañas realizadas por las Secretarías de Salud, Municipal y Departamental.

Conocen que la enfermedad la transmite un zancudo del género *A. aegypti* L. cuyo estilo de vida es urbano y de fácil propagación debido a la cantidad de residuos que se encuentran almacenados en muchos lugares (viviendas, depósitos, cementerios, tanques de almacenamiento, etc).

#### **4.3.3. Presentación “Combatiendo el Mosquito del Dengue”**

Se realizó una presentación en el programa “Prezi” donde se muestran generalidades sobre el vector (reproducción, ciclo de vida, criaderos, etc.), también qué es una bacteria, la importancia de ellas en el mundo y el *B. thuringiensis var. israeliensis* como agente que elimina las larvas de *A. aegypti* L. y la importancia de esta bacteria para eliminar las larvas que dan origen al zancudo vector.

# Aedes Aegypti L.



ES un pequeño insecto blanquinegro con rayas en el dorso y las patas. Los mosquitos que transportan el virus del dengue transmiten la enfermedad a la persona que pican.

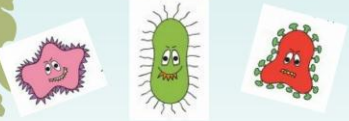
## Conociendo El ciclo de vida del Mosquito transmisor



¿Dónde vive el mosquito del dengue?

El mosquito transmite el virus del dengue al ser humano en cualquier cantidad y a cualquier hora del día. En la actualidad en Colombia existen los mosquitos que transmiten el dengue en las zonas urbanas y suburbanas. El mosquito del dengue vive en aguas estancadas y sucias. El mosquito del dengue vive en aguas estancadas y sucias. El mosquito del dengue vive en aguas estancadas y sucias.

## ¿Que tanto Conoces a las Bacterias?



Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrometros y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, internos.

## Investigando, Ando



Figura 18: Diapositivas de la presentación realizada a los estudiantes de las Instituciones Educativas de Neiva.

## 5. DISCUSIÓN

El *B. thuringiensis var. israeliensis (Bti)* es un bioinsecticida eficaz para eliminar larvas de *A. aegypti L.* El VECTOBAC G12 (200 UTI) es un producto comercial el cual se evaluó en diferentes concentraciones, determinando la Dosis Media Letal ( $DL_{50}$ ) que fue de 0, 0001 mg, resultado que se obtuvo en lo experimentado en los laboratorios de Biología de la Universidad Surcolombiana.

Este estudio demostró que los cristales que poseen las esporas del bacilo resultan ser altamente tóxicos para las larvas de los dípteros (**Tyrell et al, 1979**), además de su especificidad dada la gran plasticidad genética (**Ochoa et al, 2009**). La diversidad de sus toxinas alcanza a producir distintas cepas que son útiles para el efecto de mortalidad de distintos grupos de larvas de dípteros y lepidópteros (**Ochoa et al, 2009**).

La causa de las muertes de las larvas está determinada por el tipo de proteínas presentes en distintas cepas de *B. thuringiensis*. La nomenclatura actual de toxinas Cry las agrupa como: 1) Proteínas tóxicas a lepidópteros grupos Cry1, Cry2 y Cry9; 2) Toxinas activas contra coleópteros grupos Cry3, Cry7 y Cry8; 3) Proteínas con actividad dual grupos Cry1B y Cry11; 4) Proteínas con actividad nematocida , grupos Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14; 5) Proteínas tóxicas a dípteros, grupos Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y las Cyt (Crickmore *et al.*, 2009) citado por (**Ochoa et al, 2009**).

En este sentido, la eficacia del *Bti* depende principalmente de las concentraciones empleadas durante la dilución del producto, encontrándose que pequeñas dosis como la empleada en la dilución  $10^{-4}$  ocasionan la muerte del más

del 50% de las larvas; el efecto letal del *Bti* también se encuentra determinado por las condiciones ambientales en las que están expuestas las larvas, tal es el caso de la temperatura ambiente que interfiere en la acción del *Bti*: lo realizado en el laboratorio de Biología de la Universidad Surcolombiana permitió establecer que la temperatura es una variable determinante en el desarrollo del ciclo biológico del *A. aegypti* L. ya que cuando disminuyó la temperatura en el laboratorio (hasta 17°C), las larvas se morían en su gran mayoría quedando en estado larvario I y II. Según Zequi Lopes, 2007 a temperaturas menores de  $15 \pm 2$  °C es necesaria una mayor concentración del producto biológico para tener los mismos efectos letales.

Las dosis del *Bti* extraída del VECTOBAC G12 (marca comercial), tiene mayor efecto residual que el producto “Aquabac G” , además de su mayor persistencia y eficacia, donde la eficacia fue del 95% de mortalidad hasta 101 y 45 días, respectivamente (**Pereira et al, 2005**); lo anterior se debe a que las 200 UTI presentes en el producto VECTOBAC G12 son altamente tóxicas por encontrarse en mayor concentración, en comparación con el Aquabac G que, aunque también cuenta con 200 UTI, es menos eficiente debido quizás a que la composición del Aquabac G no está compuesta 100% del *Bti*.

La ventaja en el uso de *Bti* liofilizado en cualquier presentación comercial ha demostrado una mortalidad larvaria de 100% aproximadamente en 24 horas; según bioensayos efectuados en prácticas de campo (**Lima et al, 2005**) se ha demostrado que su efecto tóxico sobre larvas de *A. aegypti* L. es elevado en comparación con los controles químicos que se realizan en la actualidad, como con el TEMEFOS (Abate) que ha generado resistencia de las larvas a estos, productos;

adicionalmente, este producto químico impotabiliza el agua y resulta ser altamente tóxica para el consumo humano.

La línea de regresión dosis-respuesta, en el caso de la presente investigación, representada por log-dosis y la proporción de individuos que responde (en unidades Probit), demuestra que cada larva de *Aedes aegypti* L. responde a un efecto bajo las dosis del *Bti* que están expuestas, es permisible observar que cuando la concentración de la dosis del *Bti* es baja la respuesta es poca o no se observa reacción alguna frente a la aplicación de concentraciones altas bajo las cuales responden la mayoría de las larvas (**Hickman et al., 2001**). La susceptibilidad al *Bti* está dada cuando las concentraciones son efectivas en relación a la mayor cantidad de larvas muertas en poco tiempo. En este sentido se está hablando de una dosis mínima letal, cuya respuesta es mayor al 50%, encontrando una alta probabilidad de muerte en las larvas, reduciendo en este sentido la densidad poblacional del mosquito trasmisor del virus del dengue.

Para la prueba de residualidad y recambio de agua se efectuaron los ensayos con la dosis de la dilución  $10^{-1}$ , por el porcentaje alto que se obtuvo en muertes de las larvas de *A. aegypti* L; en los tres bioensayos se observó una mortalidad del 100% en las dos primeras quincenas del pos tratamiento, evidenciando que su efecto residual llegó aproximadamente a 75 días, descendiendo el porcentaje de efectividad cerca del 50%. Se demostró que la dosis ensayada en el laboratorio es idónea por su efecto residual para ser ensayada a escala mayor, como es el caso del tratamiento de tanques y albercas residenciales.

Los resultados obtenidos a partir del efecto residual del *Bti* (VECTOBAC G12), permiten establecer que este producto puede ser una herramienta útil para

reemplazar los Temephos (abate) que son utilizados por las autoridades competentes para la erradicación y control en la eliminación del vector causante del dengue desde su etapa larval. Un estudio realizado por Lee & Zairi 2005 en condiciones de campo, encontraron un decaimiento en el efecto residual por la frecuencia de recambio de agua, alterando la disponibilidad del agente controlador, en donde expone que un tanque donde es depositado el producto a base de *Bti* con poco recambio de agua está disponible durante más tiempo para un efecto mayor en la mortalidad de larvas.

La secretaría de Salud Municipal de Neiva, realizó una capacitación a sus funcionarios en la aplicación del producto VECTOBAC G12 en enero del 2008, donde se concluyó que los funcionarios fueron capacitados en aspectos básicos del control biológico utilizando el *Bti* VECTOBAG G para el control de larvas y que el porcentaje de reducción del vector al momento de evaluarlo fue del 99,92% usando una dosis máxima (Olano, 2009). En artículo realizado por un medio local se afirma que el *B. thuringiensis var israeliensis* probado por la Secretaría de Salud es muy efectivo, resultando ser una muy buena opción para el control del *A. aegypti* L. pero que por los altos costos que representa el producto no lo usaban y se prefiere recurrir a métodos químicos usados hasta el momento.

El fracaso a utilizar el *Bti* como control biológico en la ciudad de Neiva se debe a que los entes encargados no realizaron una capacitación previa a los habitantes de la ciudad, puesto que la cultura que se tiene en cuanto al saneamiento es de lavar los tanques o albercas cada 8 días, adicionalmente que el concepto que tienen las personas acerca de las bacterias no corresponde al uso benéfico de ellas en muchos campos del conocimiento. Toda iniciativa que conlleve a mejorar la calidad

de vida o favorezca la salud pública, debe ir acompañada previamente de divulgación o capacitación al ciudadano, quien en últimas será el encargado de ejercer un real control sobre el vector, campañas que en su momento le hicieron falta a la Secretaría de Salud Municipal de Neiva y que en este trabajo se recomienda para ejercer un verdadero control de este vector que ha cobrado la vida de cientos de personas.

## 6. CONCLUSIONES

1. Al evaluar la eficacia del *B. Thuringiensis var. israeliensis* (VECTOBAC G12) como control biológico sobre larvas de *A. aegypti* L. con DL<sub>50</sub> de 0.0001mg y DL<sub>90</sub> 0.022 mg, se demuestra que el producto es altamente eficaz al utilizarlo en la dosis recomendada.
2. Se determina que la dosis mínima letal del VECTOBAC G12 corresponde a 0.0001 mg con una respuesta en cuanto a mortalidad de larvas del 40% que en los bioensayos representó la muerte de 4 cuatro larvas, aproximadamente.
3. El efecto letal del *B. thuringiensis var. israeliensis* (VECTOBAC G12) fue del 100%, causando muertes desde la dosis mínima hasta la dosis máxima evaluada.
4. La residualidad del producto fue de dos meses y medio en condiciones de laboratorio, en algunas viviendas donde se probó el VECTOBAC G12 de manera preliminar se obtuvo un efecto residual de mes y medio, esto teniendo en cuenta las condiciones ambientales a las cuales fue sometido el producto (recambio de agua, lavado de tanques).
5. La eficacia del producto depende también de las campañas y previa información a la comunidad que efectúen los entes encargados con miras a la utilización del producto biológico en la comunidad de Neiva.



6. La divulgación del trabajo en las instituciones educativas permitió que los estudiantes en edades escolares sean los encargados de transmitir la información recibida, llevando consigo las buenas prácticas saludables a sus hogares lo cual puede contribuir a combatir el mosquito trasmisor del virus del dengue.
  
7. La comunidad estudiantil con la cual se socializó el proyecto cuenta con un conocimiento aceptable sobre las generalidades del vector que transmite el virus del dengue facilitando la divulgación de los resultados del presente trabajo.

## 7. RECOMENDACIONES

Combatir el virus del dengue en la ciudad de Neiva ha sido un trabajo muy arduo para las autoridades de salud pública y mucho más si se tiene que trabajar teniendo en cuenta la cultura que trae consigo la población. En nuestro caso, esta situación se vivenció, pero también se demostró que se puede cambiar esta cultura.

Al concluir este trabajo las recomendaciones que se hacen para futuros trabajos y/o a las autoridades competentes son:

- Se puede recomendar el uso del *B. thuringiensis var. israeliensis*, *Bti*, liofilizado en el producto VECTOBAC G12, ya que éste presentó una eficacia del 100% en las pruebas que se realizaron en el laboratorio.  
Además, al ser usado en algunas viviendas del barrio Cándido se comprobó la eficacia de este producto y de igual forma se evaluó su residualidad, teniendo como resultado aproximadamente dos meses sin presencia de larvas de *A. aegypti* L.
- Para implementar el uso del *Bti* en la comunidad Neivana se deben realizar campañas educativas sobre el uso adecuado de este producto, pues de éstas depende el uso adecuado del producto comercial en cada uno de los hogares Huilenses.

## 8. REFERENCIAS

ARMAS, G. DÍAZ, M. BRUZÓN, R. MENENDEZ, Z. GONZÁLEZ, A. HERNÁNDEZ, Y. GARCIA, I. Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis*. Instituto de Medicina tropical Pedro Kourí. Habana – Cuba. (2007). Encontrado el 13 de septiembre del 2011 en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol60\\_1\\_08/mtr11108.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol60_1_08/mtr11108.htm)

BENAVIDES GAMBOA, Miriam, REALPE CORDOBA, Luís. Evaluación del tiempo en que *Aedes Aegypti* coloniza y desarrolla su fase acuática en albercas domesticas del área ocho en Neiva. Especialización en docencia de la biología. Universidad del Tolima-universidad Surcolombiana. 1993 [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_16/Capitulo16.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_16/Capitulo16.pdf)

BERLITZ, D. FIUZA, L. *Bacillus thuringiensis e Melia azedarach*, aplicacoes e interacoes no controle de insetos- Praga. Universidade do vale Rio dos Sinos- Sao Leopoldo- RS.

BERTEL, P. VILLERO, H. Evaluación de la eficiencia del *Bacillus thurigiensis var. israelensis* cultivada en agua de coco intacto para el control de larvas del mosquito *Aedes aegypti* (TESIS). Universidad de Sucre. Sincelejo, Colombia (2008). Encontrado el 27 de Marzo del 2012 en: [http://biblioteca.unisucre.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/429/1/595.771\\_B482.pdf](http://biblioteca.unisucre.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/429/1/595.771_B482.pdf)

BISSET, J. RODRIGUEZ, M. FERNANDEZ, D. PEREZ, O. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismo de resistencia en larvas del municipio Playa, colectas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en la ciudad de la Habana 2001 - 2002. Revista cubana de Medicina Tropical 56 (1): 61 – 66. Habana- Cuba (2004). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602007000300004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000300004)

CABEZAS, C. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. Instituto nacional de Salud Perú. Lima (2005). Encontrado el 10 de Noviembre del 2013 en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v22n3/a09v22n3.pdf>

CARRERA, M. Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. Escuela Politécnica de Chimborazo; Facultad de ciencias; Escuela de Bioquímica y Farmacia. Tesis. Riobamba- Ecuador (2009). Encontrado el 24 de Agosto del 2011 en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf>

CARRIAL BRAVO, T. VASQUEZ, L. LOPEZ GARCIA, I. La ecología del dengue y el *Aedes Aegypti*, salud pública de México. Vol. 26, mayo junio, 1984.

Ciclo de vida del *Aedes Aegypti*. (2001, p 114 - 115). Consulta realizada el día 15 de Marzo del 2010 en [http://www.nietoeditores.com.mx/download/2001/pediatrica/ActPed2-01\(83-158\).pdf#page=34](http://www.nietoeditores.com.mx/download/2001/pediatrica/ActPed2-01(83-158).pdf#page=34)

CONDE, A. Mecanismo a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes (stegomyia) aegypti*, Linnaeus 1762, en los municipios de victoria, Viterbo, Marquetalia y la Dorada, departamento de Caldas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (2012).

DE BARJAC H., CHARLES, J.F., BOURGOIN, C., LARGET-THIERY, I. Aspects actuels de la lutte microbiologique dans le domaine de la Santé. Revista Bioscience. 3: 11-13. (1984)

DÍAZ, F. MORELOS, M. CARRASCAL, M. PÁJARO, Y. GÓMEZ, H. Actividad larvívora de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). Revista Cubana de Plantas Medicinales. Habana- cuba (2012). Encontrado el 24 de Agosto del 2011 en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962012000300006&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962012000300006&script=sci_arttext)

DUARTE, R. CASTILLO, J. CEPERO, O. CORONA, E. GONZÁLEZ, R. Eficacia del control de larvas de mosquito (Diptera: culicidae) con peces larvívoro. Villa Clara – Cuba. (2007). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol61\\_2\\_09/mtr12209.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol61_2_09/mtr12209.htm)

DUQUE, J. MUÑOZ, A. & NAVARRO, M. Modelo de simulación para el control del mosquito *Aedes aegypti*, transmisor del dengue y la fiebre amarilla, por el crustáceo *Mesocyclops spp.* Revista de salud pública. Vol.6, n.1, pp. 87-99. Bogotá (2004). Encontrado el 23 de agosto del 2011 en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012400642004000100005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012400642004000100005&script=sci_arttext)

DUQUE J. & NAVARRO M. Dynamics of the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) by *Bacillus thuringiensis var. israeliensis*, related with temperatura, density and concentration of insecticide. Universidade Federal de Paraná. Brasil (2006). Encontrado el 13 de Abril del 2013 en: <http://www.scielo.br/pdf/rbent/v50n4/14.pdf>

EQUI, J., LOPES, J., & SANTOS, F. Controle de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 a través de formulados conteniendo *Bacillus thuringiensis israeliensis* em temperaturas controladas. Revista Entomología Brasilis. Brasil (2011). Encontrado el 25 de Abril

del

2012

en:

<http://www.periodico.ebras.bio.br/ojs/index.php/ebras/article/view/98/138>

ERNANDES, S. DEL BIANCHI, V. OLIVEIRA, I. Evaluation of two different culture media for the development of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*. Revista acta scientiarum. Technology . Maringá. Brasil 2006. Encontrado el 02 de Mayo del 2012 en: <http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/13831/pdf>

FAJARDO. P, MONJE. C, LOZANO, G. REALPE.O & HERNANDEZ, L. Nociones populares sobre “Dengue” y “rompehuesos”, dos modelos en la enfermedad en Colombia. Revista Panamericana de Salud Pública, Neiva (2001). Encontrado el 11 de Noviembre del 2013 en : <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v10n3/6561.pdf>

Finney, D.J. 1947. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK

GIBBSON R.V & VAUGHN DW. Dengue: an escalating problem. British Medical Journal 324: 33 - 42. USA (2002). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1123504/>

GUARIDO; M. actividade insecticida de extracto de *Annona foetida* Mart. (*Annonaceae*) sobre imaturos de *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762) (Dipero: Culidae) Universidade Federal do Paraná, Curitiba( 2009)

GUBLER, J. Prevention and control of *Aedes aegypti*- borne Diseases: Lesson Learned from Past Successes and Failures. Journal Molecular Biology, Biotechnology. Vol. 19 (3): 111- 114. (2011). Encontrado 15 de Febrero del 2012 en: <http://www.msmbb.org.my/apjmbb/html193/193f.pdf>

GUERRA, L. & ZAPATA, C. Preferencia y eficacia de *Notonecta indica* (Nontonectidae). Entomología Médica del Laboratorio de Salud Pública, Secretaria de Salud departamento de San Andrés Islas, Colombia & Universidad Nacional de Colombia. San Andrés Isla (2011). Encontrado el 25 de Agosto del 2011 en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/685/#sthash.xiknUrX7.dpuf>

GUZMAN TIRADO, M. KOURI FLORES, G. RAMON, J. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” Revista Cubana de Medicina Tropical, Vol. 51(1): 5 – 13. Habana - Cuba (1999). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507601999000100001&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507601999000100001&script=sci_arttext)

HALSTEAD, S. Dengue in the American and Southeast Asia: do they differ? Revista Panamericana de Salud Publica. Vol. 6 407- 15. (2006). Encontrado el 4 de Mayo del 2012 en: <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v20n6/a07v20n6.pdf>

HERNÁNDEZ, E. MÁRQUEZ, M. Control de larvas de *Aedes aegypti* (L) con *Poecilia reticulata* Peter, 1985: una nueva experiencia comunitaria en el municipio Taguasco, Sancti Spiritus. Revista Cubana Medicina Tropical. Cuba (2006). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58\\_2\\_06/mtr07206.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58_2_06/mtr07206.htm)

LEE Y. W. & ZAIRI J. Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. *Trop. Biomed.* **22**: 5-10.

LEIVA, M. MARQUETTI, M. TACORONTE, J. SCULL, R. OLINKA, T. MESA, A. MONTADA, D. Actividad larvicida de esencial de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Díptera: culicidae) Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Revista Biomédica. Habana - Cuba (2009).

LIMA, J. MELO, N. & VALLE, D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis var. israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. Revista del Instituto de Medicina tropical. Sao Paulo. Brasil (2005). Encontrado el 27 de Marzo del 2012 en: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v47n3/a02v47n3.pdf>

LIMA, J. MELO, N. VALLE, D. Persistence of Vectobac WDG and Metoprag S-2G against *Aedes aegypti* larvae using a semi-field bioassay in Rio de Janeiro, Brazil. Revista Del Instituto Medicina tropical. Sao Paulo- Brasil (2005). Encontrado el 13 de Abril del 2012 en: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v47n1/23115.pdf>

LOPEZ, D. ESPINOZA, P. LOPEZ, M. VALLE, S. RIVERA, P. GARCIA, I. Las libélulas (insecta: odonata) como biorreguladores de larvas de mosquitos en Nicaragua. Revista Nicaragua de Entomología. 45: 1 – 5 Nicaragua (1998). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: <http://www.bio-nica.info/RevNicaEntomo/45-Lopez-Libelulas.pdf>

MARTÍNEZ, E. Dengue. Estudios avanzados. Vol.22, n.64, pp. 33 – 52. Encontrado el 12 de Mayo del 2012 en: <http://www.scielo.br/pdf/ea/v22n64/a04v2264.pdf>

MASUH, H. SECCACINI, E. DE LICASTRO, S. ZERBA, E. Residualidad de un formulado solido del insecticida microbiano Bti (H-14) en el control de larvas de *Aedes aegypti* (Díptera: culicidae). Centro de investigación de plagas e insecticidas – CIPEIN (CITEFA/CONICET). Revista Peruana de epidemiologia. Lima (Perú). 2002. Encontrado el 10 de Abril del 2012 en: [http://rpe.epiredperu.net/rpe\\_ediciones/v10\\_n01\\_2002/CC1.pdf](http://rpe.epiredperu.net/rpe_ediciones/v10_n01_2002/CC1.pdf)

MELO, A. LOPES DA SILVA, A. VIEIRA DA COSTA, M. FUKUDA, M. THOMAS, V. SOCCOL, C. Selection of *Bacillus thuringiensis* Berliner strains to control *Aedes aegypti* Linnaeus. Journal of biotechnology and biodiversity. USA (2013). Encontrado

el 12 de Mayo del 2012 en:  
<http://revista.uft.edu.br/index.php/JBB/article/viewFile/436/292>

MONTENEGRO, C. control biológico de larvas de *Aedes aegypti*, vector del dengue, con larvas depredadoras de *Toxorhynchites sp.* (Diptera Culicidae) en los cementerios municipales de Villa Nueva y Amatitlán, Guatemala. Universidad de san Carlos de Guatemala. Guatemala (2008). Encontrado el 13 de Mayo del 2012 en: <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202007.26.pdf>

MORALES A. control integrado de *Aedes Aegypti*. Biomédica. Vol. 11, N 1 (1991); p.54. Citado por Benavides y Realpe 1993. P. 17

MORALES, C. Evaluación del efecto y residualidad de *Bacillus thuringiensis* (VECTOBAC G) en el control de *Aedes aegypti* vereda Bocas del Palo, Municipio de Jamundí (Valle del Cauca). Cali – Colombia (sin Fecha). Encontrado el 12 de Marzo del 2012 en: <http://www.fitogranos.com/pdf/4/ControlVectores3.pdf>

MORALES, J. CASTILLO, J. & LUNA, I. Aceite del fruto de Noni (*Morinda citrifolia: Rubiaceae*) como larvicida del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). Revista Tecno ciencia. Panamá (2010). Encontrado el 10 de Septiembre del 2011 en: [http://www.up.ac.pa/ftp/2010/f\\_ciencias/tecnociencias/volumen12-1/Articulo4.pdf](http://www.up.ac.pa/ftp/2010/f_ciencias/tecnociencias/volumen12-1/Articulo4.pdf)

MORALES, C. GONZALEZ, R & ARAGON, R. Evaluación de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: culicidae). Revista colombiana de Entomología. Vol. 30 n° 2, pp. 187 – 192. Cali - Colombia (2004). Encontrado el 3 de Septiembre del 2011 en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S169272732008000200006&script=sci\\_art\\_text](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S169272732008000200006&script=sci_art_text)

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (PAHO). Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Estrategia y prevención de control (1995) (pág. 35 -40). Encontrado el día 10 de Marzo en pdf: <http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/vbd/arias-dengue.htm>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. DENGUE guías para el Diagnostico, tratamiento, prevención y control. Nueva edición 2009. Transmisión del virus del Dengue. P. 17.

PARRA G, GARCÍA C, COTES J. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. Revista CES Medicina. 2007;21:47-54

PARRA, L. SALAZAR, V. Determinar la efectividad del *Bacillus thuringiensis variedad israelii* producido por un medio de cultivo natural a partir *Bacillus thuringiensis variedad israelii* liofilizado puro, en el control de larvas de *Aedes aegypti* en el laboratorio de microbiología de la universidad Surcolombiana. Universidad Surcolombiana. Neiva, Colombia ( 2003)

PÉREZ, R. PACHECO, C. RODRIGUEZ, J. LARA, R. MONTES, R. RAMIREZ, G. MARTINEZ, M. Parasitismo de *Romanomermis iyengari* en larvas de tres especies de mosquitos en laboratorio y de *Anopheles pseudopunctipennis* en campo. Instituto Politécnico Nacional. Revista Agrociencia. México (2004). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2004/jul-ago/art-4.pdf>

PONCE, G. FLORES, A. BADI, M. FERNANDEZ, I. GONZALEZ, T. RODRIGUEZ, M. CHIU, J. Evaluación de *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* (VECTOBAC Asa) sobre la población larval de *Aedes aegypti* en el área metropolitana de Monterrey-Nuevo León. México (2003). Encontrado el 11 de Septiembre del 2011 en: [http://www.respyn.uanl.mx/iv/3/articulos/bti\\_ae.htm](http://www.respyn.uanl.mx/iv/3/articulos/bti_ae.htm)

REY, G. Determinación de los grados de resistencias al insecticidas Temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, (díptera Culícidae) y su implicación en la eficacia del insecticida en los departamentos de Cauca, Guajira, Cundinamarca y Atlántico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (2011).

RODRIGUEZ, J. GARCIA, I. MENÉNDEZ, Z. GARCIA, I. SANCHEZ, J. PÉREZ, R. Efecto patogénico de tres nematodos parásitos en larvas de *Aedes aegypti* e condiciones de laboratorio – Cuba. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Revista cubana de Medicina Tropical. Habana (2005). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602005000300011&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602005000300011&script=sci_arttext)

RODRIGUEZ, I. Evaluación de plantas medicinales con potencial en el control biológico del vector transmisor de dengue *Aedes aegypti*. Instituto politécnico Nacional. Tepetitla de lardizabal, Tlaxcala, México (2010)

ROJAS, J. SOJO, M. MAZARRI, M. SOCA, A. GARCIA, Y. Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 sobre larvas de *Anopheles nuñeztovari* en Mérida, Venezuela. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” & Dirección de epidemias Rurales de Malariología del Ministerio de Salud y asistencia social. Maracaibo, Venezuela (2002). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.revistas.luz.edu.ve/index.php/ic/article/viewFile/2027/1957>

ROSSI, G & ALMIRON, W. Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquito de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina.



31 – 33 pp. Fundación Mundo Sano, Buenos Aires – Argentina (2004). Encontrado el 18 de Febrero del 2013 en: <http://www.fumigacionycontrol.com.ar/plagas/plagas06.pdf>

ROZO, A. ZAPATA, C. & BELLO, F. Evaluación del efecto tóxico de extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. (*Asteraceae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) en condiciones de laboratorio. Revista Ciencias de la salud. Vol. 6 N°. 2. Bogotá- Colombia (2008). Encontrado el 24 de Agosto del 2011 en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S169272732008000200006&script=sci\\_art\\_text](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S169272732008000200006&script=sci_art_text)

SAMPIERI, R. COLLADO, C. Y BAPTISTA, P. *Metodología de la investigación*. Mc Graw- Hill. Tercera edición. Mexico D.F. 2003. Encontrado el 01 de Febrero del 2014 en: [http://data.over-blog-kiwi.com/0/27/01/47/201304/ob\\_195288\\_metodologia-de-la-investigacion-sampieri-hernande.pdf](http://data.over-blog-kiwi.com/0/27/01/47/201304/ob_195288_metodologia-de-la-investigacion-sampieri-hernande.pdf)

SECRETARIA DEPARTAMENTAL DE SALUD- HUILA. Dengue. Sin fecha de publicación.

SOBERON, M. BRAVO, A. Bti, una bacteria inteligente. Instituto de Biotecnología/ Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 510-3. Cuernavaca 62250, Morelos. México (2007)

SUÁREZ, M.F. & NELSON M.J. Registro de altitud del *Aedes aegypti*. Revista *Biomédica*, 1981, 1:225

SUAREZ, M.F Y NELSON M. Registro de altitud del *Aedes Aegypti* en Colombia. En: *biomédica*. Vol. 1. N 4 (1981); p 225. Citado por Benavides y Realpe 1993, p. 9.

TURKER, M. OLANO, V. Ecología del *Aedes aegypti* en un pueblo de Colombia, Sur América. OPS/OMS Proyecto AMPRO- 700. Revista *Biomédica*. Vol 13, No 1. Bogotá- Colombia. (1993).

URREGO, G. Ordenamiento del medio, *Biomédica*. Suplemento 1. (Octubre, 1991); p. 56. Citado por Benavides y Realpe 1993. P. 18

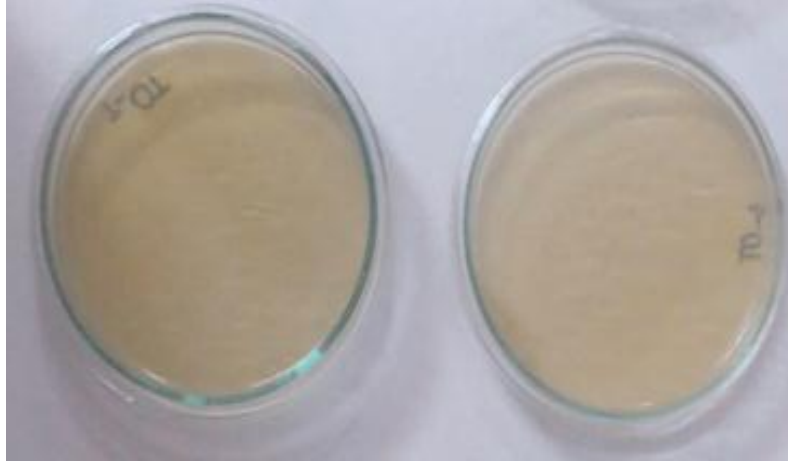
VARGAS, F. ROLDAN, J. ZABALETA, G. et al. Producción de *Bacillus thuringiensis* H – 14 var. *israeliensis* utilizando espárrago (*Asparangus officinalis*) y su uso potencial para el control de la Malaria en la Libertad – Perú. Revista médica de Salud Pública, Vol. 18, n°. 3 -4, 82 – 89 pp. Lima- Perú (2001). Encontrado el 23 de Agosto del 2011 en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342001000200006&script=sci\\_art\\_text](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342001000200006&script=sci_art_text)

VARJAL, M. GOMES, E. LEDA, J. Evaluation of a new Tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israeliensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 96, n. 6, pp. 859 -860. Rio de Janeiro. Brasil (2001).  
Encontrado el 12 de septiembre del 2011 en:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762001000600020&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762001000600020&script=sci_arttext)

VENTOSILLA, P. *Bacillus thuringiensis* subp. *Israelensis*, una alternativa frente a los problemas de resistencia e impacto de insecticidas químico en el ambiente. Instituto de Medicina tropical -Alexander Von Humboldt, Colombia (2000)

## 9. ANEXOS

### Agar Tripticasa Soya, Composición



El TSA Agar es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias. Permite visualizar reacciones hemolíticas que producen muchas especies bacterianas.

Tiene por base una fuente proteica (digeridos trípticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre.

Es un medio recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de microorganismos. La presencia de Lectina y Tween permite neutralizar la actividad antibacteriana, facilitando la investigación de los gérmenes en productos o superficies que contengan: Aldehídos, derivados fenólicos, o amonio cuaternario.

La aportación de caseína y peptonas de soja al Agar de Tripticasa-soja hace el medio muy nutritivo por el suministro de nitrógeno orgánico, particularmente aminoácidos y péptidos de cadena más larga. La presencia de estas peptonas en

el medio permite el cultivo de una gran variedad de gérmenes aerobios y anaerobios que crecen rápidamente, así como los del género *Candida*. También permite el crecimiento de algunos gérmenes exigentes como *estreptococos*, *pneumococos*, *Brucella*, *corinebacterias*, *Erysipelothrix* y *Pasteurella*.

**Fórmula por litro.**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Polisorbato 80	5 g/L
Hisditina	1 g/L
Peptona de Soja	5 g/L
Sodio Tiosulfato	0,5 g/L
Lecitina	0,7 g/L
Peptona de Caseína	15 g/L
Sodio Cloruro	5 g/L
Agar	15 g/L

## Analisis Probit

```

PROBIT MUERTOS OF TOTAL WITH DOSIS
  /LOG 10
  /MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI
  /NATRES
  /CRITERIA P(.05) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
    
```

## Análisis probit

[Conjunto\_de\_datos0]

### Advertencia

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

### Información sobre los datos

	Nº de casos
Válidos	6
Perdidos	0
Rechaza	0
La transformación log no se puede realizar	
dos	0
Número de respuestas > Número de sujetos	
Grupo control	0

### Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	9	Sí

### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT DOSIS	,566	,215	2,638	,008	,146	,987
<sup>a</sup> Intersección	2,223	,552	4,029	,000	1,671	2,774

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

**Covarianzas y correlaciones de estimaciones de los parámetros**

		DOSIS	Respuesta natural
PROBIT	DOSIS	,046	,807
	Respuesta natural	,047	,074

Covarianzas (abajo) y correlaciones (arriba).

**Estimación de tasa de respuesta natural<sup>a</sup>**

	Estimación	Error típico
PROBIT	,000	,271

a. No se ha proporcionado el grupo control.

**Contrastes de chi-cuadrado**

		Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	1,518	3	,678 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es mayor que, 050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	LOG-DOSIS	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
1	-1,000	10	9	9,512	-,512	,951
2	-2,000	10	9	8,622	,378	,862
PRO 3	-3,000	10	8	7,000	1,000	,700
BIT 4	-4,000	10	4	4,834	-,834	,483
5	-5,000	10	3	2,717	,283	,272
6	-6,000	10	1	1,202	-,202	,120

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para DOSIS			Límites de confianza al 95% para log(DOSIS) <sup>a</sup>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
,010	,000	,000	,000	-8,036	-25,296	-5,375
,020	,000	,000	,000	-7,555	-23,435	-5,086
,030	,000	,000	,000	-7,249	-22,256	-4,903
,040	,000	,000	,000	-7,019	-21,369	-4,764
,050	,000	,000	,000	-6,832	-20,648	-4,650
,060	,000	,000	,000	-6,673	-20,035	-4,553
,070	,000	,000	,000	-6,534	-19,498	-4,468
,080	,000	,000	,000	-6,409	-19,017	-4,391
,090	,000	,000	,000	-6,295	-18,580	-4,321
,100	,000	,000	,000	-6,190	-18,178	-4,256
,150	,000	,000	,000	-5,757	-16,517	-3,985
,200	,000	,000	,000	-5,413	-15,200	-3,766
,250	,000	,000	,000	-5,118	-14,074	-3,574
,300	,000	,000	,000	-4,853	-13,067	-3,399
,350	,000	,000	,001	-4,607	-12,137	-3,232
,400	,000	,000	,001	-4,374	-11,260	-3,068
,450	,000	,000	,001	-4,148	-10,417	-2,905
,500	,000	,000	,002	-3,926	-9,594	-2,737
,550	,000	,000	,003	-3,704	-8,780	-2,561
,600	,000	,000	,004	-3,479	-7,965	-2,368
,650	,001	,000	,007	-3,246	-7,141	-2,152
,700	,001	,000	,013	-3,000	-6,302	-1,895
,750	,002	,000	,027	-2,735	-5,443	-1,571
,800	,004	,000	,075	-2,440	-4,571	-1,125
,850	,008	,000	,358	-2,095	-3,713	-,447
,900	,022	,001	4,771	-1,662	-2,906	,679
,910	,028	,002	9,774	-1,558	-2,751	,990
,920	,036	,003	21,992	-1,444	-2,596	1,342
,930	,048	,004	55,435	-1,319	-2,440	1,744
,940	,066	,005	161,035	-1,180	-2,281	2,207
,950	,095	,008	562,931	-1,021	-2,114	2,750

	,960	,147	,012	2543,235	-,834	-1,935	3,405
	,970	,249	,019	16934,056	-,604	-1,732	4,229
	,980	,503	,033	221540,671	-,298	-1,485	5,345
	,990	1,525	,074	13762296,951	,183	-1,130	7,139

a. Base del logaritmo = 10.

