

**EFICACIA DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO ESTRATEGIA  
DE CONTROL BIOLÓGICO PARA MOSQUITOS DE LA FAMILIA  
CULICIDAE: ESTUDIO INICIAL EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

**JOSE DAVID MOJICA SEPULVEDA**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE BIÓLOGO**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
MEDELLÍN**

**2013**

**EFICACIA DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO ESTRATEGIA  
DE CONTROL BIOLÓGICO PARA MOSQUITOS DE LA FAMILIA  
CULICIDAE: ESTUDIO INICIAL EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

**ESTUDIANTE**

**José David Mojica Sepúlveda**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**ASESORA**

**Carolina Torres Gutiérrez**

**Bióloga, MSc, Candidata a PhD, Universidad de São Paulo**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**MEDELLÍN**

**2013**

*'El capitán Nemo me indicó con la mano este amontonamiento prodigioso de ostras, y comprendí que la mina era verdaderamente inagotable, pues la fuerza creadora de la naturaleza triunfa del instinto destructor del hombre.'*

Profesor Pierre Aronnax\*

---

\*Tomado del libro: 20.000 leguas de viaje submarino de Julio Verne

## **Dedicatoria**

A mi familia, que me ha apoyado incondicionalmente.

## **Agradecimientos**

Al Gran Arquitecto, porque su obra, siempre indescifrable plantea constantes retos para el *Homo sapiens*.

A Carolina, por sus correcciones y paciencia.

A Zulay, sin cuya orientación la culminación de este trabajo no habría sido posible.

A los miembros de ENTOMED, Libertad, Jovany, Evencio, Ana, Carolina y Leonardo por su colaboración, sus consejos y ejemplos.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>2. HIPÓTESIS</b>	14
<b>3. OBJETIVOS</b>	14
3.1. Objetivo General	14
3.2. Objetivos Específicos	15
<b>4. MARCO TEÓRICO</b>	15
4.1. Mosquitos: Información Biológica y Ciclo de Vida	15
4.2. Importancia Médica	18
4.3. Control de Vectores y Resistencia a Productos Insecticidas	22
4.4. Control Biológico y Cultivos Probióticos	25
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	30
5.1. Área de Estudio	30
5.2. Material Biológico	30
5.2.1. Mosquitos	30
5.2.2. Colonización del Material Silvestre	30
5.2.3. Peces	31
5.2.4. Mantenimiento de mosquitos	32
5.2.5. Mantenimiento de Ratones	34
5.2.6. Mantenimiento de Peces	34
5.2.7. Cultivo Probiótico	35

<b>5.3. Fase Experimental</b>	<b>35</b>
5.3.1. Bioensayos con Larvas de Mosquitos	35
5.3.2. Bioensayo con Peces	37
5.3.3. Medición de Parámetros Fisicoquímicos	38
5.3.4. Identificación Taxonómica de Mosquitos	39
<b>5.4. Análisis Estadístico</b>	<b>39</b>
5.4.1. Determinación de concentraciones letales 50% y 90%	40
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
6.1. Identificación de los Especímenes de campo.	41
6.2. Ensayo Piloto con <i>Paracheirodon axelrodi</i> .	41
6.3. Análisis Descriptivo Bioensayos con Mosquitos.	41
6.3.1. Mortalidad por grupos.	41
6.3.2. Porcentajes de Mortalidad estimados por Concentraciones de producto evaluadas.	44
6.3.3. Mortalidad por tiempos de lectura.	45
6.3.4. Resultados Condiciones Fisicoquímicas.	47
6.3.4.1. pH.	47
6.3.4.2. Concentración de Oxígeno Disuelto.	48
6.3.4.3. Conductividad ( $\mu$ Siemens).	49
<b>6.4. Análisis Estadístico</b>	<b>51</b>
6.4.1. Selección del modelo logístico.	51
6.4.2. Hipótesis.	51
6.4.3. Hipótesis Nula.	51
6.4.4. Hipótesis Alternativa.	51
<b>6.5. Análisis Estadístico de los parámetros Fisicoquímicos.</b>	<b>53</b>
6.5.1. Análisis ANOVA.	53
6.5.2. Por Concentración.	53
6.5.3. Por condición (Inicial-Final).	55
6.5.4. Por Grupo.	57

<b>6.6. Concentraciones Letales Generales Estimadas</b>	<b>59</b>
6.6.1. CL 50%	59
6.6.2. CL 90%	59
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
7.1. Variables tenidas en cuenta para el análisis estadístico.	61
7.2. Factores Físicoquímicos.	64
7.2.1. pH.	64
7.2.2. Concentración de O <sub>2</sub> .	65
7.2.3. Conductividad (Microsiemens).	66
7.3. Concentraciones letales y otros productos larvicidas.	67
7.4. Cultivos Probióticos en la Naturaleza.	68
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>71</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>72</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>92</b>
11.1. Anexo 1.	92
11.2. Anexo 2.	93
11.3. Anexo 3.	94



## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Porcentajes promedio de Mortalidad para la cepa Rockefeller por Concentración y tiempo medidos.	41
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes promedio de Mortalidad para la cepa Silvestre por concentración y tiempo medidos.	41
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes promedio de Mortalidad para la especie <i>Anopheles albimanus</i> por concentración y tiempo medidos.	42
<b>Tabla 4.</b> Porcentajes promedio de Mortalidad para la especie <i>Culex quinquefasciatus</i> por concentración y tiempo medidos.	42
<b>Tabla 5.</b> Estimativos estadísticos del número de muertes de larvas por especie y cepas de Culicidae evaluadas.	43
<b>Tabla 6.</b> Estimativos estadísticos del número de larvas muertas por concentración del producto (10%, 12%, 14% y 16%) y el control.	45
<b>Tabla 7.</b> Estimativas estadísticas del número de larvas muertas considerando todas las especies evaluadas con relación al tiempo de lectura realizado durante bioensayos con cultivos probióticos.	46
<b>Tabla 8.</b> Prueba Hipótesis nula global.	51
<b>Tabla 9.</b> Comprobación de significancia de factores.	51
<b>Tabla 10.</b> Efecto del Tiempo.	52
<b>Tabla 11.</b> Efecto del Grupo.	52
<b>Tabla 12.</b> Efecto de la Concentración.	52
<b>Tabla 13.</b> Medias Generales de los parámetros fisicoquímicos.	53
<b>Tabla 14.</b> pH Por Concentración.	53
<b>Tabla 15.</b> O2 Por Concentración.	54
<b>Tabla 16.</b> Conductividad Por Concentración.	54
<b>Tabla 17.</b> pH Por condición (Inicial-Final).	55
<b>Tabla 18.</b> O2 Por condición (Inicial-Final).	56
<b>Tabla 19.</b> Conductividad Por condición (Inicial-Final).	56
<b>Tabla 20.</b> pH por Grupo.	56
<b>Tabla 21.</b> O2 por Grupo.	57

<b>Tabla 22.</b> Conductividad por Grupo.	58
<b>Tabla 23.</b> Determinación de concentraciones letales 50% y 90%.	59
<b>Tabla 24.</b> Concentraciones Letales generales 50% y 90%.	60

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Jaula utilizada para mantener los mosquitos adultos adultos de las especies <i>Ae. aegypti</i> , <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i> .	32
<b>Figura 2.</b> Recipiente plástico utilizado para larvas de las especies <i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> y <i>Anopheles albimanus</i> .	33
<b>Figura 3.</b> Recipiente con servilleta humedecida utilizado para ovipostura (derecha), y oviposturas de <i>Aedes aegypti</i> en caja de petri (izquierda).	34

## LISTA DE GRÁFICAS

### Página

- Gráfica 1.** Distribucion de los porcentajes de mortalidad de individuos de las especies *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus*, y *Aedes aegypti* (Rockefeller y Silvestre) durante los bioensayos con cultivos probioticos. 43
- Gráfica 2.** Distribución de larvas muertas en porcentaje para la concentración del producto evaluada (10%, 12%, 14% y 16%) sin considerar la categoría de Especie. 44
- Gráfica 3.** Porcentaje de Mortalidad de larvas por tiempos de lectura (24, 48, 72 y 120 horas). 46
- Gráfica 4.** Comportamiento del pH para los grupos evaluados con respecto a las diferentes concentraciones evaluadas y al control. 47
- Gráfica 5.** Comportamiento del pH con respecto a las diferentes concentraciones evaluadas y al control, comparando mediciones iniciales y finales. 48
- Gráfica 6.** Valores de oxígeno disuelto final e inicial registradas en las diferentes unidades experimentales con relación a la concentración del producto (10%, 12%, 14% y 16%) además del control, considerando todas las especies de Culicidae. 48
- Gráfica 7.** Concentración de oxígeno disuelto visto por grupos. 49
- Gráfica 8.** Conductividad Inicial y Final. 50
- Gráfica 9.** Conductividad vista por grupos y concentraciones. 50
- Gráfica 10.** Concentraciones Letales CL 50% y CL90% generales para el producto. 60

## 1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por insectos vectores tienen un gran impacto negativo sobre la calidad de vida de las personas en todo el mundo. Algunas de estas enfermedades particularmente el Dengue, la Malaria, la Fiebre Amarilla, y varios tipos de Encefalitis, entre otras, ocurren en nuestro país y disminuyen la productividad y la salud de las personas afectadas (Bisset y col 1998; Carmona-Fonseca, 2003; Berrocal y col, 2006; Cáceres-Manrique y col, 2009). Estas enfermedades son el resultado de una infección por agentes patógenos transmitidos por la picadura de mosquitos de la familia Culicidae.

Estos culícidos vectores abarcan muchos géneros, pero en nuestro contexto se trabajó con tres géneros de importancia médica nacional. Los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*. Siendo las especies involucradas *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus*; que transmiten al agente causal del virus del dengue, Encefalitis y Malaria respectivamente, cuyos efectos negativos tienen gran repercusión en el territorio nacional (Góez-Rivilla Y. y col, 2010; Blanco y Hernández, 2009).

Durante un largo período de tiempo diferentes estrategias de salud pública se han concentrado en reducir el impacto de estas enfermedades, generando líneas de acción encaminadas a mejorar el diagnóstico, tratamiento, vigilancia y control de las enfermedades transmitidas por vectores (Brochero y Quiñones, 2008; Cáceres-Manrique y col., 2010). Cabe resaltar en este contexto iniciativas globales que buscan desarrollar vacunas que generen inmunidad contra agentes infecciosos, y productos de control que reduzcan las poblaciones de los insectos vectores, responsables de transmitir los diferentes agentes patógenos.

En algunas de estas iniciativas se han implementado estrategias encaminadas a disminuir o frenar la transmisión de la enfermedad, centrándose en el insecto vector, siendo uno de uno de los métodos de control más utilizados, por muchos años, los productos químicos (insecticidas), que desde su invención, mostraron alta eficacia en reducir las poblaciones de vectores, pero a causa de

su alta toxicidad también han tenido impacto negativo sobre otras especies, como microorganismos, plantas y animales que no participan en la dinámica de transmisión de agentes infecciosos al ser humano. A esto se suma el reporte posterior de los primeros signos de resistencia de los insectos a algunos de los compuestos activos de productos insecticidas. Esta problemática ha motivado esfuerzos por descubrir otro tipo de productos de control, menos tóxicos y específicos para insectos vectores.

La idea original de los cultivos probióticos surgió precisamente buscando una alternativa a las problemáticas de resistencia química y la búsqueda de productos de base biológica que sean menos nocivos con el medio ambiente que además sean fáciles de producir y resulten económicos. Los cultivos probióticos están compuestos por varias especies de microorganismos, que pueden dividirse en tres grupos principales: Bacterias ácido lácticas, bacterias fototróficas y levaduras; son organismos que no han sido modificados genéticamente, que pueden ser hallados de forma natural en cualquier lugar; y que han sido previamente evaluados, con resultados que los señalan como promisorios para diversos fines como la recuperación de suelos, aguas, además de la producción agropecuaria y recientemente para el control de mosquitos de importancia médica.

## **2. Hipótesis**

Los cultivos probióticos tienen efecto larvicida sobre estadios inmaduros de mosquitos de las especies *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Evaluar la eficacia del cultivo probiótico como agente larvicida de las especies *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar las concentraciones letales (50% y 90%) del cultivo de microorganismos probióticos para cada una de las especies de mosquitos: *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Culex quinquefasciatus*.
- Comparar el efecto larvicida del cultivo probiótico en una población de mosquitos de laboratorio versus una población silvestre colonizada de *Aedes aegypti*.

## **4. MARCO TEORICO**

### **4.1 Mosquitos: Información Biológica y Ciclo de Vida**

Los mosquitos son insectos holometábolos de distribución mundial pertenecientes a la familia Culicidae, grupo compuesto por las subfamilias Anophelinae y Culicinae. Los culícidos comprenden 3490 especies descritas, que ocurren en diferentes tipos de ecosistemas, por todo el mundo (Harbach, 2007).

Los mosquitos presentan cuatro fases de desarrollo durante su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. En condiciones de laboratorio, se ha observado que la mayoría de los huevos eclosionan entre 24 y 48 horas, el desarrollo de las larvas requieren un período entre cuatro y cinco días, y la pupa cumple su desarrollo entre dos y tres días, hasta la emergencia de los individuos adultos. El período completo del ciclo (huevo – adulto) puede comprender entre 6 y 10 días, en un rango de temperatura comprendido entre 25 a 29°C. Sin embargo, el tiempo de desarrollo es una característica variable entre las diferentes

especies y está influenciado por condiciones ambientales y la disponibilidad de recursos alimenticios para los diferentes estados de desarrollo (Soekiman y col. 1984; Oda y col. 2002; Foster y Walker, 2002).

Los estados larvarios son acuáticos y se pueden encontrar en una amplia variedad de hábitats principalmente lénticos, o en cualquier depresión o recipiente con agua acumulada (Harbach, 2007). Algunas especies ocurren también en aguas salobres y marismas (McCafferty y Provonsha, 1983). Las larvas de la mayoría de las especies son filtradoras y se alimentan de algas y de materia orgánica en descomposición (Badii y col., 2006). Las larvas de los mosquitos de los géneros *Culex* (Linnaeus, 1758) y *Aedes* (Meigen, 1818) se alimentan filtrando microorganismos y materia orgánica presente en la columna de los cuerpos de agua, mientras que los inmaduros del género *Anopheles* (Meigen, 1818) lo hacen en la superficie del agua (Merritt y col., 1992. Yee y col., 2004).

Diferentes especies de Culicidae exhiben gran variedad de preferencias en la selección de sus hábitats acuáticos (artificiales, naturales, temporales, permanentes, etc.), siendo que en regiones tropicales, prácticamente cualquier acumulación de agua tiene el potencial de ser explotada por alguna especie de mosquito (Lester y Pike, 2003; Foster y Walker, 2002; Roberts, 1996; Sherratt y Church, 1994; Wilton, 1968). El tiempo de desarrollo de los estadios larvales es diferente, siendo el segundo y tercer estadios más cortos que el primero, y el cuarto estadio corresponde al período de desarrollo más extenso en la fase larval. En términos generales y en condiciones normales, la duración de todo el proceso larval varía entre 8 y 10 días. Los períodos de desarrollo larval con un lapso de tiempo menor son observados en mosquitos con criaderos transitorios, con bajas temperaturas e inestables, sin embargo, los periodos de crecimiento más lento ocurren en mosquitos de criaderos pequeños y estables, como por ejemplo, agua colectada en entrenudos de bambú (Forattini, 2002).

La urbanización e industrialización han influido en la aparición de vasto número de contenedores artificiales de agua, tales como tanques de almacenamiento, envases desechables, llantas, sistemas de alcantarillado expuestos, etc., éstos



contenedores de agua sirven como sitios para el desarrollo de huevos larvas y pupas de mosquitos de importancia médica, como el *Aedes aegypti* (Linneus, 1762), vector del virus dengue y *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) vector de virus causantes de Encefalitis de San Luis, ESL; encefalitis equina venezolana, EEV y el virus del Oeste del Nilo, VON; entre otros agentes infecciosos, causando además molestias sanitarias a la población (Forattini, 2002; Hwang y Roam, 1994; Chen y col., 1994).

Las pupas de los mosquitos son también acuáticas, y muy activas; no se alimentan y respiran en la superficie del agua a través de pequeñas estructuras denominadas trompetas respiratorias, localizadas en el céfalo-tórax del organismo (Forattini, 2002). Después de aproximadamente tres días, ocurre la emergencia del adulto (Oda y col., 2002). “Los mosquitos adultos presentan un aspecto delgado, tamaño entre 3 y 9 mm de longitud; cabeza pequeña que presenta ojos compuestos en forma de riñón; partes bucales o proboscis, en forma de estilete de longitud variable; un par de antenas largas, plumosas en los machos y simples en las hembras; tórax redondeado que posee numerosas escamas de diferente coloración que pueden presentar iridiscencias y patrones con utilidad taxonómica; un par de alas de venación completa, cubiertas de escamas; un abdomen estrecho y subcilíndrico, y unas patas largas que en ocasiones poseen coloración vistosa” (Wolff, 2006, Forattini, 2002).

Los mosquitos adultos pueden ser hallados desde unos metros sobre el suelo, hasta grandes alturas en el dosel de los árboles, dependiendo del hábito alimenticio de cada especie; algunos son activos en la noche, durante el día o durante el crepúsculo (Harbach, 2007). En cuanto a su tiempo de vida, estudios en condiciones de laboratorio con hembras adultas de *Aedes aegypti*, han documentado un promedio de vida de 31 días, con un máximo de 92; mientras que los machos de *Aedes aegypti* en las mismas condiciones tuvieron un promedio de 16 días y un máximo de 71 días de vida (Styer, 2008). Comparativamente, existen registros del tiempo de vida de estos insectos en condiciones naturales, en zonas templadas, donde el tiempo de vida del adulto es de alrededor de 30 días; aunque en áreas tropicales esta expectativa de vida se reduce a alrededor 15 días (Forattini, 2002).

En general, los mosquitos adultos explotan diferentes fuentes alimenticias, siendo las hembras de hábito hematófago, pudiendo complementar esta dieta succionando sustancias vegetales; mientras que los machos se alimentan únicamente de soluciones azucaradas de origen vegetal (Woodbridge, 1994; Wolff, 2006). Las hembras de la familia Culicidae tienen la necesidad de ingerir sangre de animales vertebrados para llevar a cabo su ciclo reproductivo. La sangre proporciona la proteína necesaria para que las hembras desarrollen huevos viables (Joy y col., 2010). Posterior a la ingesta sanguínea, las hembras ovipositan un número variable de huevos, estimado entre 50 a 500 huevos por hembra (Forattini, 2002); es durante estas alimentaciones de sangre de vertebrados, que la hembra puede convertirse en agente transmisor de microorganismos patógenos.

#### **4.2 Importancia Médica**

Los mosquitos son susceptibles de infectarse con agentes patógenos como virus, protozoarios y bacterias, y de transmitir estos agentes a animales vertebrados cuando se alimentan de su sangre (Joy y col., 2010). Muchas enfermedades tropicales y subtropicales son causadas por virus como el dengue y la fiebre amarilla, que pertenecen al género *Flavivirus*, familia Flaviviridae (OMS, 2009; 2011); virus de la Encefalitis Equina perteneciente a la familia Togaviridae, género *Alphavirus* (Armstrong y Andreadis, 2010; CDC, 2010) y el parásito del género *Plasmodium* que pertenece a la familia Plasmodiidae, género *Plasmodium*, agente causal de la malaria (Nair y Striepen, 2011); estas enfermedades constituyen una gran amenaza para la salud pública y son transmitidos por mosquitos de la familia Culicidae (Gubler, 2004). Sobresalen tres géneros dentro de Culicidae, *Culex*, *Aedes* y *Anopheles*, por agrupar especies de amplia distribución, reconocido hábito antropofílico y capacidad vectorial de agentes patógenos (Forattini, 2002).

Aunque han sido décadas de esfuerzo por controlar los mosquitos vectores, en muchas regiones del mundo, la incidencia actual de las enfermedades causadas por agentes patógenos, transmitidas por las picaduras de los mosquitos representa altos índices de morbilidad y mortalidad (Nevill y col., 1996, Mwanziva y col., 2011; LeBeaud y col., 2011). La morbilidad de

enfermedades transmitidas por vectores a escala global está considerada en aproximadamente  $7 \times 10^8$  personas que cada año son infectadas en el mundo y más o menos una de cada 17 personas muere por alguna de estas enfermedades (Murugesan y col. 2008; LeBeaud y col., 2011).

*Culex quinquefasciatus*, presenta una amplia distribución geográfica, principalmente en zonas urbanas (Forattini, 2002), y cabe resaltar que esta especie ha ampliado su rango de distribución porque está ligada al crecimiento de la población humana. Un ejemplo de este hecho es que ha sido documentada desde mediados del siglo XX en aviones comerciales y militares que cubren las rutas entre países tropicales y templados, en Europa, Asia, África, algunas islas del pacífico y América, entre ellos Colombia (Welch, 1939), junto con otras especies de mosquitos incluyendo *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820) con demostrada capacidad vectorial para enfermedades como malaria, fiebre amarilla, dengue y otras (Duguet, 1949).

Así mismo, la especie *Culex quinquefasciatus* es considerada el vector principal en los Estados Unidos del virus que causa la Encefalitis de San Luís (ESL) y junto con otras especies, se ha incriminado como vector del Virus del Oeste del Nilo (VON) (Sardelis y col., 2001; Ahumada y col., 2004; Marra y col. 2004). En Colombia, *Culex quinquefasciatus* ha sido asociado con la transmisión del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), transmisión que fue documentada en la comunidad indígena Wayúu, del departamento de La Guajira durante 1995, que afectó alrededor de 75 mil personas y 50 mil equinos (Rivas y col., 1997). El virus de la ESL pertenece a la familia Flaviviridae dentro del grupo de la encefalitis japonesa, al igual que el VON. El VON fue reconocido por primera vez en el hemisferio occidental en 1999 en Nueva York y desde entonces se ha desplazado hacia el sur del continente americano (Komar y Clark, 2006), está presente en Colombia desde el 2004 aproximadamente (Mattar y col., 2011).

En los Estados Unidos, el VON es transmitido por al menos tres especies de mosquitos, *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) en el extremo oeste, *Culex tarsalis* (Coquillet, 1896) en el oeste y medio oeste, y *Culex quinquefasciatus* en el sureste (Hayes y col., 2005); de estas tres especies, solo *Culex*

*quinquefasciatus* se encuentra en Colombia, sin embargo es de anotar que, “Colombia, por su ubicación geográfica, diversidad de reservorios y vectores, y características climatológicas de predominio tropical, reúne todas las condiciones que favorecen la entrada y desarrollo del VON” y de otras enfermedades transmitidas por vectores (Berrocal y col., 2006).

Sin embargo, *Culex quinquefasciatus* hace parte de lo que se denomina un complejo de especies. Un complejo de especies es un grupo de varias especies cercanamente relacionadas, generalmente de distribución espacial muy amplia, muy similares morfológicamente entre sí, cuya identificación por métodos taxonómicos clásicos es complicado, razón por la cual se recurre frecuentemente a análisis moleculares para diferenciarlos (Paskewitz, 2010; Ruiz y col., 2005).

Es importante identificar y diferenciar estas especies, debido a que algunas son de gran importancia para el ser humano por su papel como vectores de agentes infecciosos.

Parásitos del género *Plasmodium* son parásitos transmitidos por la picadura de algunas especies de mosquitos del género *Anopheles*. En Colombia, las especies transmisoras del agente causal de la malaria está ampliamente distribuido; además, la malaria se conoce desde hace varios siglos atrás y puede presentarse en casi el 85% del territorio, lo que expone a 5 millones de personas al agente causal y la enfermedad (Carmona-Fonseca, 2003). En 2010 se reportaron en Colombia 115.884 casos de malaria al sistema de vigilancia epidemiológica SIVIGILA, de los cuales el 70% es causado por *Plasmodium vivax* (Grassi y Felletti, 1890), y el resto por *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897); anteriormente (durante el año 2009), se habían reportado en el país 79.252 casos. Este incremento está relacionado a factores sociopolíticos, económicos, y ecológicos propios del país, como falta de regularidad en la aplicación de medidas de control, deforestación y colonización de hábitats silvestres por parte de población humana, entre otros. Estos aspectos dificultan los procesos de seguimiento y control efectivos de dicha enfermedad, así como de los pacientes; llegando a un punto crítico por la existencia de

transmisión urbana de malaria (Montoya-Lerma y col. 2011; SIVIGILA, 2011a; SIVIGILA, 2011b; Padilla y col. 2011).

Existen más de 300 millones de personas en el mundo que cada año, son infectados con parásitos del género *Plasmodium* spp., además, se ha estimado que un millón de niños, solamente en África sub-Sahariana mueren cada año por la malaria (Tolle, 2009), y los casos aumentan en regiones tropicales, resultando fuertemente afectadas las comunidades de bajos ingresos económicos y condiciones sociales especiales (indígenas, pescadores, mineros, etc.) (Sachs y Malaney, 2002, Tikar y col, 2011).

*Aedes aegypti* es vector de virus que son los agentes causales de tres importantes enfermedades: Dengue, Fiebre amarilla y Chikungunya; y es capaz de transmitir otros agentes infecciosos. Además desarrolla la totalidad de su ciclo de vida en el interior o en las cercanías de las habitaciones humanas (Morrison y col., 2008; Charrel y col. 2007).

El virus del dengue se ha expandido en un amplio rango geográfico en las últimas décadas ya que su vector *Aedes aegypti* y en menor proporción, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), se encuentran adaptados a zonas urbanas; siendo la última especie común tanto en centros urbanos como en ambientes rurales (Gubler, 1998). *Aedes aegypti* tiene gran presencia en el país, luego de la reinvasión ocurrida después de que se interrumpieron las campañas de erradicación durante la década de 1960 (Ocampo y Wesson, 2004, Rojas-Gil y Brochero, 2008). Esta especie se encuentra en más del 90% de Colombia, por debajo de los 2.200 metros de altitud (Castañeda y col., 2011).

El dengue en Colombia se ha convertido en un problema de salud pública, su prevalencia ha aumentado en las últimas décadas, es re-emergente y de intensa transmisión (Castañeda y col., 2011), registrándose circulación simultánea de varios serotipos en el país, en las ciudades principales como Medellín, Bucaramanga, Neiva, Cali, Buga y otras (Villar LA, 2011; Ospina y col, 2010; Cáceres-Manrique M y col., 2009; Salgado MD y col., 2008). Estas ciudades y muchas otras dentro del territorio nacional, presentan un ambiente adecuado para la proliferación de mosquitos con capacidad vectorial eficiente

para la transmisión de los diferentes serotipos del dengue que circulan en el país (Cáceres-Manrique y col, 2010).

*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* también ocurren en el territorio colombiano (Méndez y col., 2006), en zonas urbanas como Medellín, Buenaventura y Cali, y sitios tan distantes como la ciudad de Leticia, a orillas del río Amazonas (Cuéllar-Jiménez y col. 2007, Rojas-Gil y Brochero, 2008, Rúa-Uribe y col. 2011). En Colombia, se registraron 39.847 casos de dengue en 2008; siendo el departamento de Santander uno de los más afectados por esta enfermedad. La letalidad del dengue ha presentado un aumento desde 1997, cuando en el país se registraba 6.8 personas por cada mil habitantes, cifra que pasó a 45.8 personas por cada mil en el año 2000 (Vesga-Gómez y Cáceres-Manrique, 2010). Se estima que cerca de 50 millones de personas son infectadas cada año en el mundo por el virus del dengue, transmitido por la picadura del mosquito, con aproximadamente 500.000 individuos con necesidades hospitalarias y 12.500 con riesgo de muerte (Chaturvedi y col., 2006; OMS, 2006; Teo y col., 2009).

Adicionalmente, la gran movilidad de los grupos humanos influencia la dinámica de transmisión de estas enfermedades tropicales, pues personas con la infección de virus o parásitos se desplazan hacia lugares en donde la enfermedad no circulaba, y entran en contacto con mosquitos locales que se infectan y transmiten los patógenos a personas susceptibles (Martens y Hall, 2000; Prothero, 1977).

#### **4.3 Control de Vectores y Resistencia a Productos Insecticidas**

En Colombia, “los planes y políticas de salud enfrentan algunas limitaciones, como el alto costo de los insecticidas sintéticos, los suministros erráticos, sin seguimiento de impacto, la falta de materiales y de equipos de aplicación, además de la falta del conocimiento adecuado sobre su uso, agravando de esta manera la lucha antivectorial” (Castañeda y col., 2011; Mosquera y col., 2011; Brochero y Quiñones, 2008). Otros inconvenientes tienen que ver con el

difícil acceso a zonas de transmisión continua de enfermedades como malaria, a falta de medios de transporte y carencia de recursos humanos y económicos para apoyar las diferentes acciones de prevención y control. Por esta razón, las acciones de control de vectores durante los brotes epidémicos no siempre alcanzan el impacto necesario (Franco-Agudelo, 1997; Brochero y Quiñones, 2008; Gómez-Dantés H y Ramsey J 2009; Dujardin J-C y col., 2010; Mosquera y col., 2010; Montoya-Lerma y col. 2011).

La reducción de las poblaciones de mosquitos de importancia médica constituye un componente importante en el marco de los programas para el control de enfermedades tropicales. Para esto se han utilizado tradicionalmente métodos químicos, como insecticidas, que están dirigidos a reducir las poblaciones de adultos o inmaduros de mosquitos considerados vectores (Chandra y col. 2008).

Los agentes insecticidas tienen principalmente dos atributos: toxicidad y residualidad (WHO. 2003). En general estos dos atributos están típicamente representados como los indicadores principales para la evaluación de dichos productos insecticidas, y estos factores pueden presentar variación según el tipo de sustancia que contengan como ingrediente activo (organofosforados, piretroides, organoclorados, entre otros) (Hardin y col., 2009).

Los productos que tienen alta toxicidad y pueden eliminar poblaciones de mosquitos efectivamente (piretroides, organofosforados), son comúnmente utilizados pero pueden causar efectos secundarios perjudiciales para los organismos no blanco, que van desde leves disminuciones en número y talla hasta efectos letales que comprometen una o varias especies de una cadena trófica (Hardin y col., 2009).

Se ha encontrado que combinando una alta toxicidad con una residualidad prolongada, se puede aumentar la eficacia de los productos insecticidas (Shalan y col., 2005), sin embargo, algunas especies de mosquitos pueden desarrollar resistencia a ciertos insecticidas y este hecho representa un gran obstáculo para el control de los vectores de agentes infecciosos (Hardin y col., 2009, Bisset y col. 1998, Santacoloma-Varon y col., 2010, Tikar y col., 2011, Curtis, 2002).

La resistencia puede definirse como “Un cambio heredable en la susceptibilidad de una población expuesta a un determinado producto (insecticida), que se refleja en la tolerancia de los organismos expuestos, ocasionando fallas repetidas del producto en el intento de suprimir una determinada población” (McCaffery y Nauen, 2006).

Además de la capacidad de desarrollar resistencia a los insecticidas por parte de los mosquitos, el constante uso de estos productos químicos puede causar problemas agudos o crónicos en la productividad de los terrenos dedicados a la agricultura y en la salud de quienes aplican el producto (Pimentel y col., 1992; Kolaczinski y Curtis, 2003; Perry y col. 2007; Crow y col. 2007). En Colombia, se han detectado casos de resistencia a los insecticidas lambda-cialotrina, deltametrina, DDT, fenitrotión, y malatión en poblaciones de mosquitos de *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti*, en áreas endémicas para la malaria, y el dengue, (Fonseca-González y col. 2008; 2009; 2011, Ocampo y col. 2011); otros estudios demostraron resistencia de la especie *Culex quinquefasciatus* frente a malathion, methil-pyrimifos, clorpirifos, temephós y fenitrotión (Bisset y col., 1998).

El fenómeno de resistencia a insecticidas, comúnmente documentado para diferentes especies de mosquitos a productos insecticidas como el DDT, y las generaciones de piretroides, continúa actualmente siendo un problema de salud pública a nivel mundial (Hemingway y Ranson 2000; Brooke y col., 2002; Chandre y col., 1999; Liu y col. 2006).

Las consideraciones sobre el impacto ambiental de los productos insecticidas o larvicidas han sido objeto de estudio reciente, debido a que actualmente se sabe de los efectos negativos, como contaminación de suelos, de aguas superficiales y subterráneas, y de cultivos. Se conocen diversos métodos de control vectorial que implicaron daños al ambiente, como aplicación indiscriminada de insecticida, uso de sustancias tóxicas como larvicidas (aceites o mezclas de aceite-insecticida y sustancias similares), alteración de los cauces de ríos, desecación de cuerpos de agua, entre otros. Estas alteraciones en los paisajes están asociadas con costos medioambientales en los ecosistemas dulceacuícolas que afectan la productividad, conservación y



aprovechamiento que las comunidades humanas locales hacen de los mismos (Dudgeon y col., 2006; Vittor y col. 2006, 2009).

Adicionalmente, este impacto de insecticidas en ambientes naturales se puede traducir en la disminución poblacional de organismos no blanco (otros seres vivos que comparten hábitat con los mosquitos); intoxicación de individuos humanos y alteración de las cadenas tróficas. Un ejemplo de alteración de cadenas tróficas se documentó en diferentes regiones del mundo con el uso masivo del insecticida DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) mostrando las consecuencias de su uso (Alava y col., 2011; Shrivastava y col., 2011; Van Dyk y col. 2010; Hardin y col., 2009; O'Shaughnessy, 2008; Jemec y col. 2007; Ashauer y col., 2006).

Los efectos negativos sobre organismos no blanco que se han atribuido a los productos químicos de uso regular, comprenden impactos sobre poblaciones de especies que pueden ser controladores naturales de las especies de mosquitos, entre otros organismos, bien sea la desaparición de las poblaciones, o la disminución en la diversidad presente en la zona de aplicación (Blaustein y Chase, 2007).

A través de la historia, las campañas anti-mosquitos han alterado de forma negativa las características de los ecosistemas acuáticos en donde se desarrollan estos organismos, como lagunas, pantanos, ríos y otras fuentes hídricas que han sido objeto de diversos procedimientos (Van Dyk y col. 2010; Duchet y col. 2008, Dudgeon y col., 2006; Vittor y col. 2006; Castro y col. 2002).

#### **4.4 Control Biológico y Cultivos Probióticos**

A pesar del amplio uso y aplicación de los productos insecticidas para el control de mosquitos vectores de enfermedades, existen alternativas de control que emplean productos biológicos, como larvicidas elaborados a partir de metabolitos o colonias de bacterias, virus, hongos o extractos vegetales con acción entomopatógena (Chapman, 1974; Georghiou y Wirth, 1996, Ritchie y col. 2010, Knols y col. 2010; Ibarra y col. 2006); en donde las relaciones que ocurren naturalmente entre el insecto y uno o varios patógenos que impiden su

desarrollo, son controladas para beneficio humano (Engler y Rogoff, 1976). Los esquemas de control biológico, a partir del uso de microorganismos entomopatógenos específicos, representan una alternativa razonable y amigable con el ambiente (Vyas y col. 2007), debido a su especificidad, a su efectividad comprobada (Hancock y col., 2008, Scholte y col., 2005), y a que su presencia y degradación presentan efectos mínimos en el medio ambiente (Rodrigo-Simón y col., 2006; Eilenberg y col., 2006). Existe relativamente poca variedad en el número y el tipo de productos de este tipo disponibles en el mercado y los que existen están elaborados casi exclusivamente a partir de especies de *Bacillus* spp. (Clase Bacilli, Orden Bacillales, Familia Bacillaceae, género *Bacillus* (Cohn, 1872) que contiene numerosas especies, ubicuas en la naturaleza).

Los productos elaborados con *Bacillus* tienen un elevado costo y la gran desventaja de inactivarse a temperaturas ambientales cálidas, y/o como resultado de la exposición a la luz solar (Omoya y Akynyosoye, 2011; Raso y col., 1998; Griego y Spence, 1978); sin embargo, son de comprobada efectividad contra *Aedes aegypti* (Ritchie y col., 2010), mosquitos del género *Anopheles* (Geissbühler y col., 2009) y contra *Culex quinquefasciatus* (Barbosa y col., 2010). Destacando entre éstos los productos con *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) y *Bacillus sphaericus* (Neide y Mayer, 1904) para el control de insectos vectores e insectos plaga (Bourgouin y col. 1984, Kellen y col. 2004).

Aunque se han descrito ya productos naturales con efecto larvicida, como extractos de la planta *Azadirachta indica* (Linneaus) y algunas plantas de la familia Euphorbiaceae (Rahuman y col., 2008; Okumo y col., 2007), además de los conocidos a base de microorganismos como *Bacillus*, existen también muchos otros ensayos realizados con otros microorganismos como el hongo *Metharizium anisoplie* que se han mostrado prometedores (Scholte y col., 2006). En el país, se ha experimentado con la producción de *Bacillus thuringiensis* para el control del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Vallejo y col., 1999). De igual forma, las formulaciones a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisoplie* (Metchnikoff, 1879) que muestran reducciones en la fecundidad y en el número de veces que el mosquito vector de malaria en África, *Anopheles gambiae* (Giles) se alimenta de sangre (Scholte

y col. 2006). También formulaciones de *Bacillus subtilis* han resultado exitosas en el control de estadios inmaduros, principalmente pupas, pero también larvas de varias especies de mosquitos (Geetha y Manonmani, 2008, 2010).

Sin embargo, estudios de laboratorio han mostrado que los mosquitos pueden desarrollar resistencia a *Bacillus thuringiensis* (Paris y col., 2010), y niveles bajos de resistencia ya han sido registrados en poblaciones de campo en Brasil, Francia e India para las especies *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) y *Culex quinquefasciatus* (Singh y Prakash, 2009; de Melo y col., 2008; Wirth y col. 2000).

Este panorama ha motivado la búsqueda de alternativas diferentes de control, que minimicen eventos de resistencia y que conserven las propiedades de los microorganismos. En este contexto, ha surgido interés sobre el uso de cultivos probióticos, como producto de control. La historia de los cultivos probióticos comienza cerca del año 1900, “con el Nobel de Medicina, Elias Metchnikoff, que observó que no todos los microorganismos eran dañinos para la salud humana y que algunas bacterias intestinales producían compuestos útiles contra el envejecimiento” (Caramia y Silvi, 2011).

El término “Cultivo Probiótico” hace referencia a un grupo de microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965), pero esta definición ha sido ampliada en la medida que avanza la microbiología, definiéndose más tarde como “organismos vivos que cuando son ingeridos en una dosis definida, ejercen efectos beneficiosos para la salud” (Guarner y Schaafsma, 1998). De hecho, el término “Probióticos” está asociado con las bacterias ácido lácticas y las bifidobacterias (Martin y col., 2006) que se consideran “benéficos” para la salud humana, y que se han utilizado, en la elaboración de productos alimenticios como el queso y el yogurt desde hace miles de años.

Dado su carácter ubicuo, los microorganismos juegan el rol principal en la evolución de la vida en la Tierra (Finlay y Clarke, 1999), transformando y moldeando nuestro ambiente, en la atmósfera, los cuerpos de agua, el suelo, en los seres vivos, manteniendo el funcionamiento del planeta y los ecosistemas (Ingraham e Ingraham, 1998). Esto ha llevado a que se

identifiquen especies de microorganismos particularmente útiles en diferentes campos como la medicina, la agricultura, y el sector industrial; denominándolos “microorganismos eficientes”, o EM por sus siglas en inglés (efficient microorganisms) (Higa, 1989).

El concepto de EM, fue desarrollado por el profesor Teruo Higa, y consiste en cultivos mixtos de microorganismos benéficos, no exóticos, seguros, no modificados genéticamente; compuestos por tres tipos de microorganismos: bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias fototróficas compatibles entre sí, que actúan sinérgicamente en un medio líquido (Higa, 1989; Correa M. 2011), bajo un sistema de estímulos y respuestas químicas correlacionado con la densidad poblacional microbiana denominado *Quorum sensing* (Bassler, 2009; Miller y Bassler, 2001). Este cultivo de microorganismos ha sido previamente utilizado en diversos sectores agropecuarios e industriales, en el control de aguas residuales, en el tratamiento de desechos orgánicos, para eliminación de olores molestos, producidos por la descomposición de excretas, mejoramiento de la producción en granjas de animales, salud humana, disminución de lodo en aguas de desecho, recuperación de suelos, reducción de la carga bacteriana en drenajes, y otras más (SCD Probiotics 2011).

Una aplicación reciente de estos cultivos probióticos está en el control de mosquitos de importancia médica. El uso de los probióticos ha logrado reducciones significativas de dípteros vectores en India (Correa 2002, 2003, 2009) y Honduras (SCD Probiotics, disponible en línea). Sobre este uso específico para el control de insectos, cabe resaltar dos experiencias del uso de los microorganismos probióticos en el control biológico de dípteros llevadas a cabo en India y Honduras. El primer caso fue desarrollado en el estado de Puthajhora, en India, una zona endémica para malaria, donde se utilizó una solución de cultivos probióticos, como agente larvicida contra poblaciones de mosquitos *Anopheles*. El programa de control consistió en la aplicación de cultivos probióticos en criaderos identificados de los vectores de malaria en la localidad. Los resultados registrados mostraron disminución de la población de mosquitos, y reducción del número de pacientes con malaria, así como la reducción de un tercio de los costos normales para el control del vector y del

porcentaje estimado en gastos hospitalarios asociados con el tratamiento de la enfermedad (Correa, 2009).

El segundo caso, fue llevado a cabo en Roatán, Honduras (área turística), en donde se registraban altísimas densidades de dípteros hematófagos (mosquitos y culicoides). En esta área donde tradicionalmente se había utilizado control químico, se utilizaron cultivos probióticos en los lugares detectados con alta infestación de insectos (incluyendo sitios de cría). Posterior al período de aplicación del producto, se registró una reducción del 99% de las larvas de mosquitos previamente evaluadas en criaderos locales, con 100% de reducción en canales de agua y cisternas y un 99% de reducción de adultos en áreas de playa, recreación y áreas silvestres circundantes a establecimientos turísticos (SCD Probiotics, 2010).

Además de la disminución de la población de mosquitos y del positivo impacto socio-económico, el uso de larvicidas de origen biológico ha disminuido también el impacto ambiental sobre los ecosistemas donde se presenta la transmisión de algunas enfermedades (Legner, 1995; Correa 2009, Higa y Parr 1994).

El uso de productos naturales podría reducir la población de mosquitos en fases larvales evitando impactos negativos al medioambiente y controlando efectivamente la población de vectores. Además la residualidad corta de estos productos biológicos previene la evolución de resistencia por parte de los mosquitos y no implica daño permanente de los cuerpos de agua en donde habitan dichos organismos (Hardin y Jackson, 2009).

Es necesario continuar la investigación sobre dichas alternativas hasta demostrar con suficiente evidencia su eficacia contra organismos blanco y su inocuidad contra organismos no blanco. Por lo tanto, conocer el efecto de cultivos probióticos como posibles agentes larvicidas contra mosquitos como *Anopheles albimanus*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* representa una oportunidad de avanzar en el control de los insectos vectores.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Área de Estudio**

Los Bioensayos fueron realizados en el insectario del PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) de la Universidad de Antioquia. Las condiciones del insectario fueron controladas y monitoreadas por personal autorizado de la SIU (Sede de Investigación Universitaria), manteniendo los siguientes rangos: 26 a 28°C de temperatura, 65 a 80% de humedad y fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas oscuridad.

### **5.2 Material Biológico**

#### **5.2.1 Mosquitos**

Se realizaron bioensayos con larvas de tercer estadio de mosquitos Culicidae, de tres especies: *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus*, *Aedes aegypti*. El material biológico se obtuvo de las colonias mantenidas en el insectario del PECET, y de colectas realizadas en zona urbana del municipio de Envigado. De la especie *Cx. quinquefasciatus*, se utilizó una cepa control susceptible, denominada “Medellín”. Para *Anopheles albimanus*, se usaron individuos de una cepa denominada “Cartagena” y para *Aedes aegypti*, se trabajó con dos cepas: la cepa de referencia denominada “Rockefeller” y una cepa silvestre de *Aedes aegypti*, proveniente del barrio Oasis II de Envigado (Antioquia).

#### **5.2.2 Colonización del Material Silvestre**

Se realizaron dos colectas de material silvestre, en el mismo lugar geográfico, ocurriendo la segunda colecta, 3 meses después de la primera.

Para la obtención del material silvestre se colectaron huevos de mosquitos, por esto se utilizaron recipientes pequeños con dos centímetros de altura de agua de llave reposada, que se ubicaron en varios sitios al aire libre en la localidad del Oasis II, en el municipio de Envigado. Esto con el fin de que hembras de

mosquito silvestres realizaran oviposición y obtener así inmaduros para las pruebas.

Pasados tres días se revisaron los recipientes y se recuperaron larvas de primer estadio y huevos, que fueron llevados al insectario del PECET para realizar la cría de estos individuos. Se siguió exactamente el mismo protocolo de cría que se usó para los inmaduros de las cepas de laboratorio. Una vez obtenidos los adultos, estos fueron mantenidos de acuerdo a los protocolos de cría establecidos en el insectario (Protocolos descritos en otra sección).

Una vez establecidos los parentales de la especie *Aedes aegypti*, se alimentaron con ratones albinos (*Mus musculus*), de la variedad conocida como BALB/c con el fin de estimular alimentación de sangre en las hembras y reunir ovipostura para obtener una primera generación, también llamada Filial 1, o F1. Una vez se obtuvo la postura de estos individuos F1, los huevos fueron tratados de acuerdo al protocolo de cría establecido, obteniendo larvas de las cuales se utilizó una parte para realizar las pruebas y el resto se llevó hasta la fase de adultos, a los cuales se les permitió cruzarse entre sí (F1 x F1), previamente se realizó una identificación taxonómica confirmando la especie como *Aedes aegypti*, y de esa manera lograr la posterior F2 o Filial 2. Con las larvas de esta F2, se completó el número de pruebas requeridas, concluyendo los bioensayos. El material establecido en el insectario se mantuvo hasta la segunda generación (F2).

### **5.2.3 Peces**

Se utilizaron peces de la especie *Paracheirodon axelrodi* Orden Characiformes, familia Characidae, conocido como tetra cardenal o neón cardenal. Los ejemplares fueron obtenidos en un acuario del comercio local; siendo alimentados y aclimatados durante 8 días previo a la realización de los bioensayos con los cultivo probióticos.

Para las pruebas con los cultivos probióticos, se sometieron los peces adultos de la especie mencionada y se consideraron organismos no blanco durante los bioensayos.

#### 5.2.4 Mantenimiento de mosquitos

Los mosquitos adultos *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* se mantuvieron en los cuartos del insectario bajo condiciones controladas. Los individuos adultos (machos y hembras) se mantuvieron en jaulas plásticas de aproximadamente 35cm x 35cm x 35cm con aberturas cubiertas de malla fina y con una abertura circular a la cual está adherida una manga en malla que permite tener acceso a la jaula para las diferentes labores de mantenimiento. Los inmaduros de mosquitos se mantuvieron en recipientes plásticos de 25 cm x 15 cm x 10 cm, ubicados en el mismo cuarto donde estaban los adultos, y expuestos a las mismas condiciones de fotoperiodo, temperatura y humedad relativa.



**Figura 1.** Jaula utilizada para mantener los mosquitos adultos de las especies *Ae. aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Culex quinquefasciatus*.

Diariamente, las larvas fueron alimentadas con concentrados como Truchina® pulverizada, retirando el exceso de materia orgánica de las bandejas de cría, reponiendo el volumen perdido con agua libre de cloro y limpia.

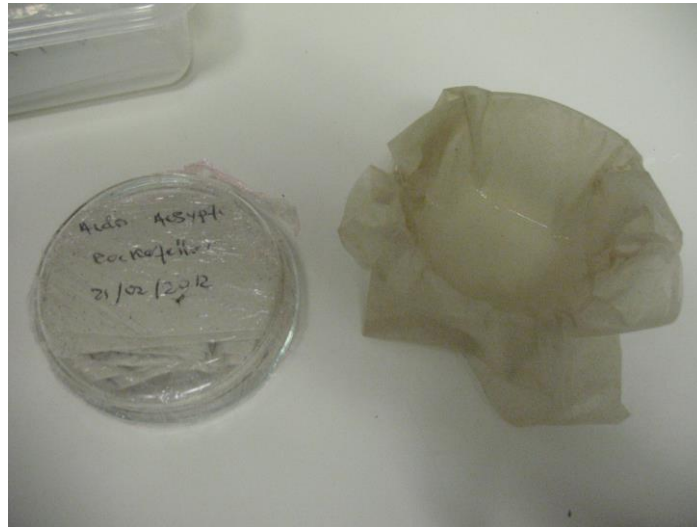




**Figura 2.** Recipiente plástico utilizado para larvas de las especies *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus*.

Tanto las colonias de mosquitos establecidas, como la colonia obtenida de las colectas en Envigado, se mantuvieron según protocolos establecidos por el insectario PECET, de tal forma que los mosquitos fueron frecuentemente alimentados a partir de la exposición dos veces por semana de ratones Balb/C por cortos periodos de tiempo.

Para facilitar la oviposición al interior de las jaulas de mosquitos adultos se utilizaron pequeños recipientes plásticos de boca ancha y de 6 centímetros de altura, cubiertos en su interior con una servilleta de papel humedecida. Esto les ofrece a las hembras un sitio adecuado de oviposición, y así se obtienen los huevos de cada especie para ser empleados en experimentación. Una vez los huevos se recuperaron de las jaulas de cría, éstos se depositaron en bandejas con agua, y se mantuvieron al interior de los cuartos del insectario por un par de días hasta observar eclosión de larvas.



**Figura 3.** Recipiente con servilleta humedecida utilizado para ovipostura (derecha), y oviposturas de *Aedes aegypti* en caja de petri (izquierda).

### 5.2.5 Mantenimiento de Ratones

El mantenimiento de los ratones (*Mus musculus*, variedad BALB/c) se cumple manteniéndolos en recipientes plásticos que tienen un manto de viruta de madera en la base, que agrupan 4 individuos del mismo sexo, por cada recipiente. Dichos recipientes se conservan al interior de un cuarto independiente (fuera de las instalaciones del insectario), cumpliendo estrictos estándares de bioseguridad, con acceso controlado que garantiza un ambiente tranquilo, libre de ruidos. El cuarto está programado para mantener un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, además de agua y comida *Ad libitum*.

### 5.2.6 Mantenimiento de Peces

Los peces se mantuvieron durante 8 días aclimatándose antes de la prueba en un recipiente de 60cm x 40cm x 40cm, adecuado con un termostato y un filtro para mantener la calidad del agua y la temperatura por encima de 23 grados Celsius. Se utilizó agua de llave reposada, buscando reducir la concentración de Cloro y el volumen usado fue de 80 litros.

Los peces se alimentaron diariamente *Ad libitum* con TetraColor de la casa comercial Tetra y con larvas del mosquito *Aedes aegypti* criadas en el insectario. Todo el alimento no ingerido fue retirado, y el volumen de agua fue restituido. Se realizaron observaciones diarias del estado de los mismos para asegurar que los ejemplares incluidos en los ensayos correspondieran con individuos sanos y activos.

### **5.2.7 Cultivo Probiótico**

Se utilizaron cultivos madre de microorganismos probióticos con marca registrada por SCD Probiotics (USA). La formulación específica de la concentración madre fue preparada por la Dra. Margarita Correa, investigadora asociada del PECET (Especificaciones no publicadas por proceso actual de patente). Cultivos probióticos es un producto líquido, mantenido a temperatura ambiente, de coloración ámbar, que presenta un olor fermentado, y está compuesto por estas especies:

*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus thermophilus*.

Este conjunto de microorganismos puede agruparse en tres categorías: Bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias fototrópicas.

## **5.3 Fase Experimental**

### **5.3.1 Bioensayos con Larvas de Mosquitos**

La susceptibilidad de las larvas a los cultivos probióticos se analizó mediante bioensayos utilizando larvas de tercer estadio, de acuerdo con el método estándar recomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2005),

con modificaciones incluidas por el equipo del PECET, para el estudio de productos larvicidas. Los Bioensayos se realizaron en el insectario del PECET bajo condiciones reguladas de temperatura, humedad y fotoperíodo

Los cultivos probióticos fueron utilizados en diferentes concentraciones, diluidas a partir de una solución madre concentrada. Las diluciones se realizaron con agua autoclavada, hasta alcanzar las concentraciones de 10%, 12%, 14% y 16%. Para los bioensayos se dispuso de 1 vaso plástico de 10 onzas para cada tratamiento y un vaso de control que contenía únicamente agua. Los recipientes de los bioensayos fueron debidamente marcados y se utilizó un volumen total por vaso de 100 mL. Cada una de estas concentraciones (10%, 12%, 14% y 16%) tuvo tres réplicas independientes y por cada prueba que se realizó, se incluyeron 10 repeticiones con cada una de las especies incluidas en el estudio, *Culex quinquefasciatus* (1 cepa), *Aedes aegypti* (2 cepas) y *Anopheles albimanus* (1 cepa). Estas concentraciones fueron seleccionadas debido a que en los estudios preliminares con el cultivo probiótico mostraron efecto larvicida.

El material biológico (larvas de mosquitos) fue retirado de las colonias establecidas en el insectario del PECET, escogiendo las larvas que presentaban la característica requerida: Larvas de tercer estadio.

Se sometieron 20 larvas de tercer estadio, a diferentes concentraciones de cultivos probióticos (10%, 12 %, 14%, y 16%); y 20 larvas adicionales para un control negativo compuesto solamente por agua, para un total de 400 larvas por cada bioensayo. Se hicieron lecturas de mortalidad de larvas cada 24, 48, 72 y 120 horas, después del inicio de cada bioensayo.

La lectura de mortalidad fue realizada para las diferentes concentraciones evaluadas y su respectivo control. El registro de datos fue consignado en el formulario especialmente diseñado para este experimento (Anexo 1).

Adicionalmente, para cada prueba realizada, se tomaron mediciones de una serie de variables fisicoquímicas de todos los vasos (tratamientos y control), las

mediciones de estos parámetros fisicoquímicos se hicieron en cada recipiente al inicio y al final de la prueba. Las variables medidas son: el pH, la concentración de oxígeno disuelto en el agua y la conductividad que presentaba el agua; medida en microsiemens. Los registros fueron consignados en el formulario para datos diseñado para el caso (Anexo 2).

Las larvas fueron alimentadas una vez al día para descartar el hecho de que algunas larvas pudiesen morir por falta de alimentación; se utilizaron 0.28 gramos de Truchina (pesados en una balanza analítica OHAUS), distribuyéndola de manera uniforme sobre la superficie del líquido.

La lectura de mortalidad se interpretó como el efecto larvicida del probiótico sobre los inmaduros. Los individuos muertos hallados durante las lecturas de mortalidad en cualquier vaso, fueron retirados inmediatamente utilizando una pipeta Pasteur, pero devolviendo el líquido al vaso para no alterar el volumen del mismo, registrando este evento en los formularios establecidos. (Anexo 1)

Se estableció un porcentaje de mortalidad máximo permitido para los vasos control que no podía igualar o superar el 20%, en caso de registrar o superar este porcentaje, la prueba era repetida. Siempre que el porcentaje de mortalidad del control se hallaba por debajo del 20% se corregía utilizando la fórmula expresada en el protocolo (WHO, 2005).

### **5.3.2 Bioensayo con Peces**

Se utilizó la especie *Paracheirodon axelrodi* como ejemplo de organismo no blanco, fue evaluada en las mismas instalaciones que las pruebas con mosquitos y bajo las mismas condiciones, utilizando individuos adultos siguiendo una metodología similar a la usada con los mosquitos para efectos comparativos.

Se usó la menor concentración de cultivos probióticos que se mostró efectiva para los mosquitos (10%); se dispuso de tres réplicas y un control, con 20 individuos por recipiente. El total de individuos sometidos a la prueba fue de 80

individuos, 60 individuos sometidos a la acción de los cultivos y los 20 restantes comprendieron el control.

Para el bioensayo se usaron recipientes plásticos de 34 cm x 34 cm x 17.5cm utilizando un volumen de 2 litros para cada recipiente. Los peces fueron colectados con una nasa mediana del tanque de 80 litros donde fueron aclimatados y depositados uno a uno en los recipientes donde se llevó a cabo la prueba.

El bioensayo realizado se planeó para tener la misma duración que en las pruebas de mosquito (120 horas máximo) con lecturas de mortalidad cada 24 horas, y medición inicial y final de los parámetros fisicoquímicos.

### **5.3.3 Medición de Parámetros Fisicoquímicos**

Tanto en el momento de preparar cada prueba (a las 0 horas), como al finalizar cada ensayo (un tiempo variable que fue de 24 a 120 horas), se realizó la medición de los parámetros fisicoquímicos presentes en cada uno de los recipientes de la prueba. Los parámetros medidos fueron:

Conductividad del agua (Microsiemens,  $\mu\text{S}$ ): Se define como la medida de la capacidad de una sustancia de conducir la corriente eléctrica. Da una medida aproximada del valor de la dureza del agua; estando la dureza determinada por la concentración de carbonatos.

Porcentaje de Oxígeno Disuelto (% O<sub>2</sub>): Es el porcentaje de oxígeno que está disuelto en el agua. Este se logra por difusión del aire del entorno principalmente.

Potencial de Hidrógeno (pH): Es una medida de la acidez o alcalinidad que presenta una disolución. Indica la concentración de iones hidronio  $\text{H}_3\text{O}^+$ .

Estos parámetros fueron registrados usando un equipo portátil para medición multiparámetro a prueba de agua EXTECH EC600 equipado con celda de conductividad EC605 y electrodo para temperatura, pH y mV PH305.

### **5.3.4 Identificación Taxonómica de Mosquitos**

La identificación taxonómica de los mosquitos colectados en campo se realizó mediante la observación de caracteres morfológicos externos de estadios adultos, tanto machos como hembras. Se utilizó la clave propuesta por Forattini (2002).

### **5.4 Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se usó el programa SAS v 9.2.

En el análisis descriptivo se realizaron gráficos de perfil, boxplot y medidas resumen de los datos.

Se analizó si los datos cumplían con los supuestos requeridos de normalidad y varianza constante mediante la prueba de Smirnov-Kolmogorov, y Shapiro Wills.

Se usó un modelo lineal de Poisson para analizar los datos y evaluar la eficacia del cultivo probiótico como agente larvicida para las especies de interés, dado que la variable respuesta es un número de larvas muertas por recipiente cumple con las características de una variable de este tipo, y debido al nivel de ajuste que presentaron los datos y a que existen estudios similares, se decidió trabajar con un modelo de regresión logística.

Para realizar el análisis de número de larvas muertas y las concentraciones letales con un modelo logístico, primero se convirtió la variable (número de larvas muertas) en porcentaje de larvas muertas, donde la variable respuesta es la proporción de larvas muertas, y las variables independientes los factores que se controlaron para este experimento (concentración, tiempo, grupo). Para el análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos, se realizaron pruebas ANOVA con un test de Dunnett para encontrar significancia o no de los efectos. Para las concentraciones letales 50% y 90% se asume que la concentración es una variable de naturaleza continua y se hallan las CL a través de la función acumulada del modelo de regresión logística.

#### 5.4.1 Determinación de concentraciones letales 50% y 90%.

Para la determinación de estas concentraciones se utilizó la función acumulada del modelo de regresión logística.

$$\frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x)}} = p$$

En donde se realiza el despeje de la incógnita “x” que corresponde a la concentración letal, obteniendo la siguiente ecuación.

$$x = \frac{-\beta_0 - \ln\left(\frac{1-p}{p}\right)}{\beta_1}$$

Los valores de “Beta” de la función acumulada se obtienen a partir del análisis del estimador de máxima verosimilitud realizado por el SAS.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificación de los Especímenes de campo

Todo el material colectado, correspondiente a la cepa denominada "Silvestre" fue identificado positivamente como *Aedes aegypti*.

### 6.2 Ensayo Piloto con *Paracheirodon axelrodi*

Este ensayo piloto registró una mortalidad del 100% para los individuos expuestos al producto al registrarse la primera lectura de mortalidad (24 horas); mientras los controles del ensayo no registraron ninguna muerte.

### 6.3 Análisis Descriptivo Bioensayos con Mosquitos

#### 6.3.1 Mortalidad por grupos

**Tabla 1.** Porcentajes promedio de Mortalidad para la cepa Rockefeller por Concentración y tiempo medidos.

<b>Aedes aegypti cepa ROCKEFELLER</b>					
<b>Tiempo de Lectura</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>14%</b>	<b>16%</b>	<b>control</b>
<b>24h</b>	68,88	76,5	84,5	88	0
<b>48h</b>	75,94	83,15	91,6	86,5	0,005
<b>72h</b>	85	91,71	93,75	91,94	0,0087
<b>120h</b>	85,75	93,93	91,65	76,25	0,012

**Tabla 2.** Porcentajes promedio de Mortalidad para la cepa Silvestre por concentración y tiempo medidos.

<b>Aedes aegypti cepa SILVESTRE</b>					
<b>Tiempo de Lectura</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>14%</b>	<b>16%</b>	<b>control</b>
<b>24h</b>	70,1	77	86	91	0,002
<b>48h</b>	77	85,2	92,4	90	0,001
<b>72h</b>	86,2	93	94,7	92	0
<b>120h</b>	86,8	93,1	95	81,2	0

**Tabla 3.** Porcentajes promedio de Mortalidad para la especie *Anopheles albimanus* por concentración y tiempo medidos.

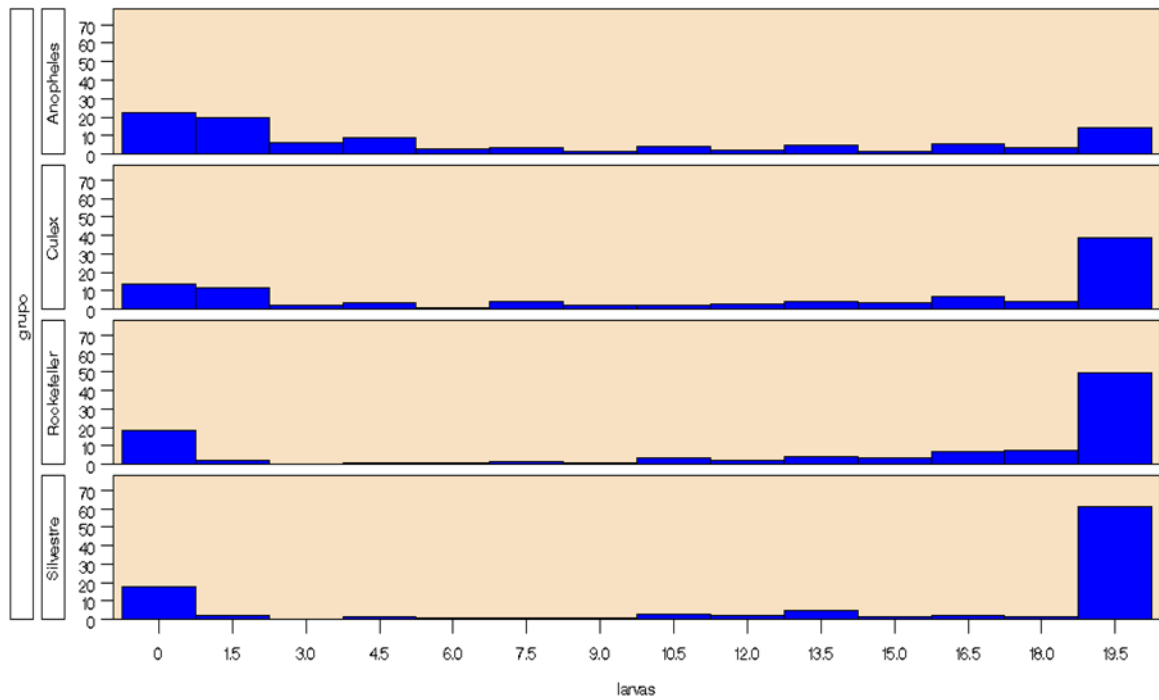
<b>Anopheles albimanus</b>					
<b>Tiempo de Lectura</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>14%</b>	<b>16%</b>	<b>control</b>
<b>24h</b>	10,1	14,3	21,35	23,6	2,87
<b>48h</b>	22,2	34,4	40	38,3	4,4
<b>72h</b>	49,7	66,1	65,8	65,95	5
<b>120h</b>	75,95	85,55	87,5	84,5	5,13

**Tabla 4.** Porcentajes promedio de Mortalidad para la especie *Culex quinquefasciatus* por concentración y tiempo medidos.

<b>Culex quinquefasciatus</b>					
<b>Tiempo de Lectura</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>14%</b>	<b>16%</b>	<b>control</b>
<b>24h</b>	42,1	48,75	58,05	64	1,9
<b>48h</b>	60,25	66,35	72,1	78,75	4,7
<b>72h</b>	61,85	69,7	72,65	79,5	6,65
<b>120h</b>	70,45	75,55	82,3	88,75	7,9

El analisis descriptivo general del conjunto de datos mostro que éstos no siguen una tendencia normal, ni de varianza constante. La variable "numero de larvas muertas" es una variable discreta, por tanto no tiene distribucion aproximada a la normal.

Se observa que para cada especie de Culicidae evaluada, el conjunto de datos mostró una tendencia diferente, pues al considerar los datos sin tener en cuenta las concentraciones, la mortalidad fue mayor para las dos cepas correspondientes a la especie *Aedes aegypti*, La especie *Anopheles albimanus* presenta el menor registro de mortalidad en larvas, estando siempre por debajo de 15 individuos muertos por cada 20 que se utilizaron por recipiente (Ver Gráfica 1, Tablas 1, 2, 3 y 4). En las tablas 1, 2, 3 y 4 pueden observarse los porcentajes promedio de mortalidad de cada uno de las especies y cepas evaluadas.



**Gráfica 1.** Distribución de los porcentajes de mortalidad de individuos de las especies *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus*, y *Aedes aegypti* (Rockefeller y Silvestre) durante los bioensayos con cultivos probióticos.

En la gráfica 1 se ve claramente como *Anopheles* es el grupo con menor número de muertes independientemente de la concentración, mientras la especie *Aedes aegypti* con la cepa Silvestre muestra la tasa de mortalidad más alta, esta información se evidencia al ver las medias de la Tabla 5 para ambos grupos.

La media más baja se observó en *Anopheles* con 7.28 larvas, mientras la más alta se observó en la cepa Silvestre con un valor de 14.54 larvas.

**Tabla 5.** Estimativos estadísticos del número de muertes de larvas por especie y cepas de Culicidae evaluadas.

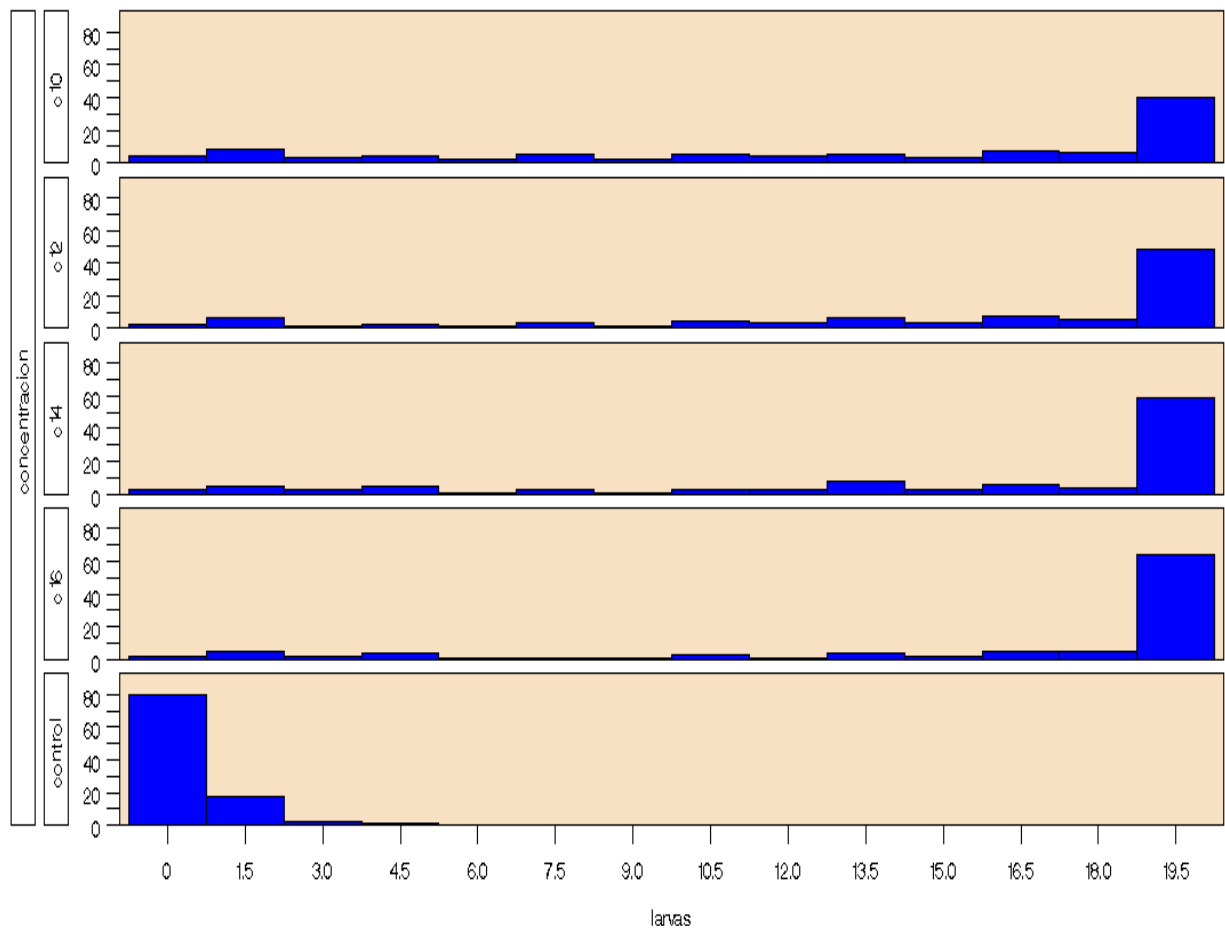
Grupo	Media	Desv.	Varianza	Mediana
<b>Anopheles</b>	7.28	7.43	55.25	4.00
<b>Culex</b>	12.06	8.08	65.44	15.00
<b>Rockefeller</b>	14.19	7.75	60.08	18.00
<b>Silvestre</b>	14.54	7.96	63.48	20.00

Es de resaltar que los estimativos se miden de acuerdo al número de individuos presentes en el vaso de prueba (de 0 a 20 individuos).

Al analizar las medias reportadas en la Tabla 5, es de destacar que para las larvas de *Anopheles albimanus* el número promedio de individuos muertos correspondió al 36.4%, este valor comparado con los obtenidos para *Culex* que registra un 60.3% de individuos expuestos muertos, mientras para las cepas Rockefeller y Silvestre de *Aedes aegypti* los porcentajes de mortalidad son 70.95% y 72.7% respectivamente. Esto deja a *Aedes aegypti* como la especie expuesta al producto más susceptible, seguida por *Culex quinquefasciatus* y siendo *Anopheles albimanus* la especie menos susceptible.

### 6.3.2 Porcentajes de Mortalidad estimados por Concentraciones de producto evaluadas.

Durante los bioensayos se registraron para las diferentes concentraciones evaluadas mortalidades entre cero y 19.5 individuos (ver gráfica 2).



**Gráfica 2.** Distribución de larvas muertas en porcentaje para la concentración del producto evaluada (10%, 12%, 14% y 16%) sin considerar la categoría de Especie.

El número de individuos expuestos al producto por cada vaso fue de 20 larvas, por lo tanto el número de larvas muertas tiene un rango de cero a 20. La concentración del 10% registra una mortalidad mínima de cero larvas en el 5% de los vasos, mientras su máximo se halla en 19.5 larvas muertas en el 40% de

los vasos. La concentración del 12% registra así mismo un mínimo de cero larvas muertas en el 5% de los vasos, y un máximo de 19.5 en el 50% de los vasos. La concentración del 14%, presenta un mínimo de cero larvas muertas en el 5% y su máximo de 19.5 larvas en el 60%; mientras la concentración del 60% tiene el mínimo de cero larvas muertas en el 5% y el máximo de 19.5 larvas en el 70% de los vasos. El control registra el menor número de individuos muertos, donde se aprecian cero muertes en el 80% de los casos, y donde el máximo de larvas muertas es 4.5 por vaso en menos del 5% de los ensayos.

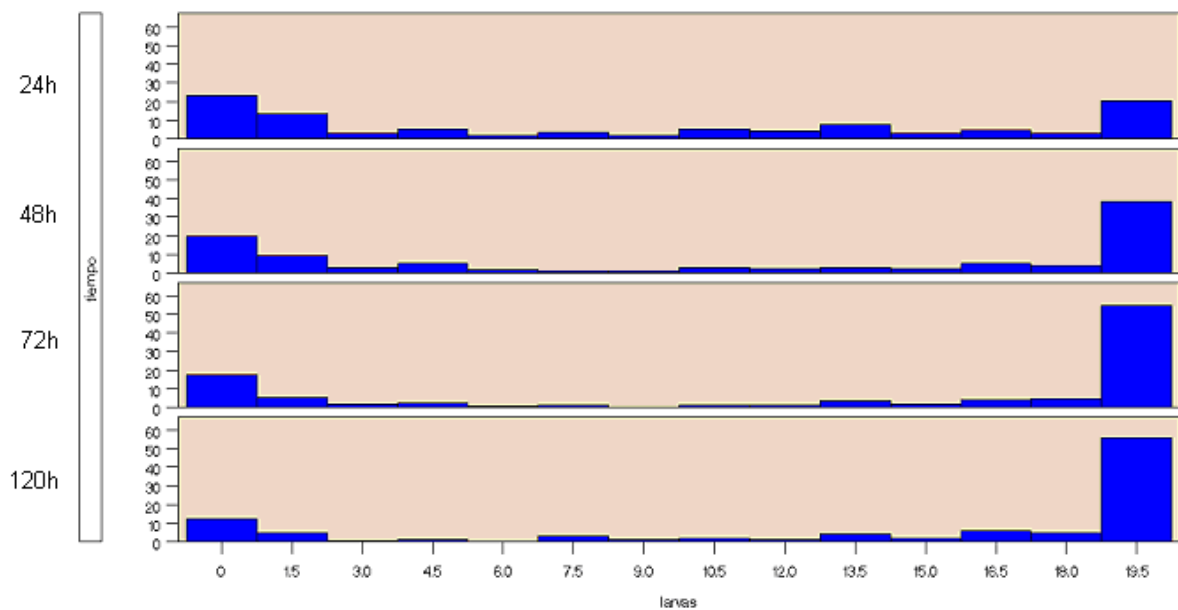
En promedio, puede verse en la Tabla 6 que, para los ensayos realizados con la concentración del 10% existe una mortalidad del 67.9% de las larvas expuestas, para la concentración del 12% es del 75%, para la concentración del 14% es del 79.05% y para la concentración del 16% es del 82.05%. Mientras que el control registró mortalidad del 1.65%

**Tabla 6.** Estimativos estadísticos del número de larvas muertas por concentración del producto (10%, 12%, 14% y 16%) y el control.

<b>Concentración</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.</b>	<b>Varianza</b>	<b>Mediana</b>
<b>C10</b>	13.58	6.91	47.78	16.00
<b>C12</b>	15.00	6.34	40.28	18.00
<b>C14</b>	15.81	6.18	38.19	20.00
<b>C16</b>	16.41	6.04	36.56	20.00
<b>Control</b>	0.33	0.81	0.65	0

### **6.3.3 Mortalidad por tiempos de lectura.**

A las 24 horas de ser iniciado el experimento, puede observarse una mortalidad de 19.5 larvas por vaso cercana al 20%. A medida que se realizan las lecturas siguientes esta mortalidad de 19.5 larvas por vaso se eleva de un 20% a un 55% (Ver gráfica 3).



**Gráfica 3.** Porcentaje de Mortalidad de larvas por tiempos de lectura (24, 48, 72 y 120 horas).

**Tabla 7.** Estimativas estadísticas del número de larvas muertas considerando todas las especies evaluadas con relación al tiempo de lectura realizado durante bioensayos con cultivos probióticos.

Tiempo de lectura de los bioensayos	Media	Desviación	Varianza	Mediana
<b>24 horas</b>	8.89	7.80	60.91	8.00
<b>48 horas</b>	11.41	8.49	72.10	15.00
<b>72 horas</b>	13.78	8.26	68.30	19.00
<b>120 horas</b>	14.700	7.54	56.93	20.00

Las lecturas realizadas 24 horas después de iniciados los bioensayos registran según la tabla 7 un 44.45% de mortalidad, para las 48 horas se observa un 57.05%, a las 72 horas el porcentaje de individuos expuestos muertos alcanza el 68.9%, y a las 120 horas el porcentaje corresponde con 73.5%.

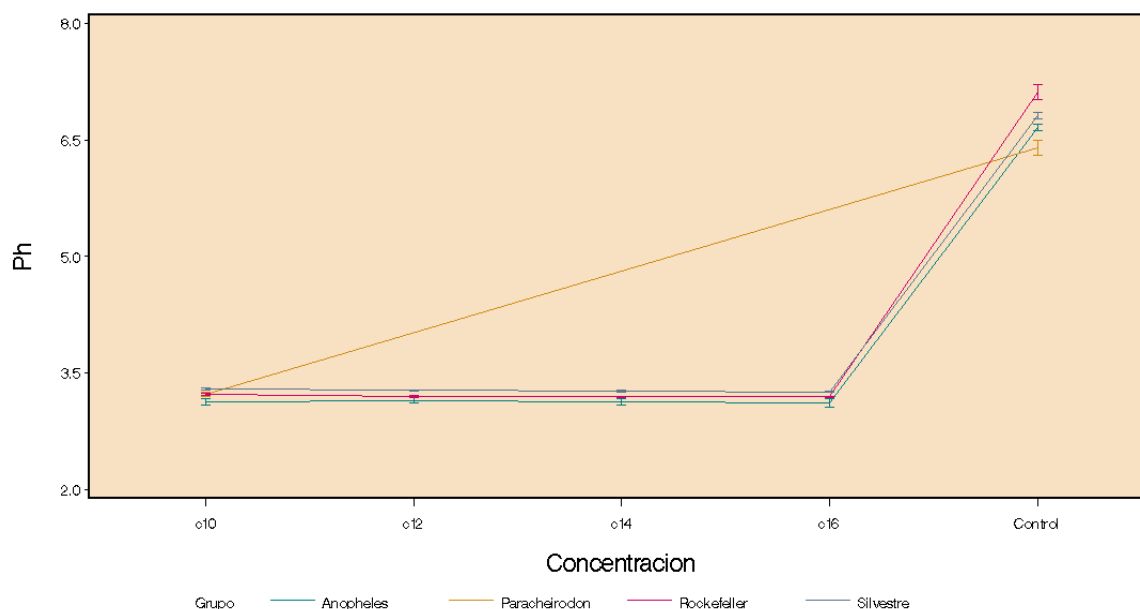
## 6.3.4 Resultados Condiciones Fisicoquímicas

### 6.3.4.1 pH

El parámetro pH muestra un comportamiento inferior a 3.5, pero relativamente constante en todas las concentraciones y en todos los grupos con excepción del control, en donde se registraron mediciones cercanas a la neutralidad (7).

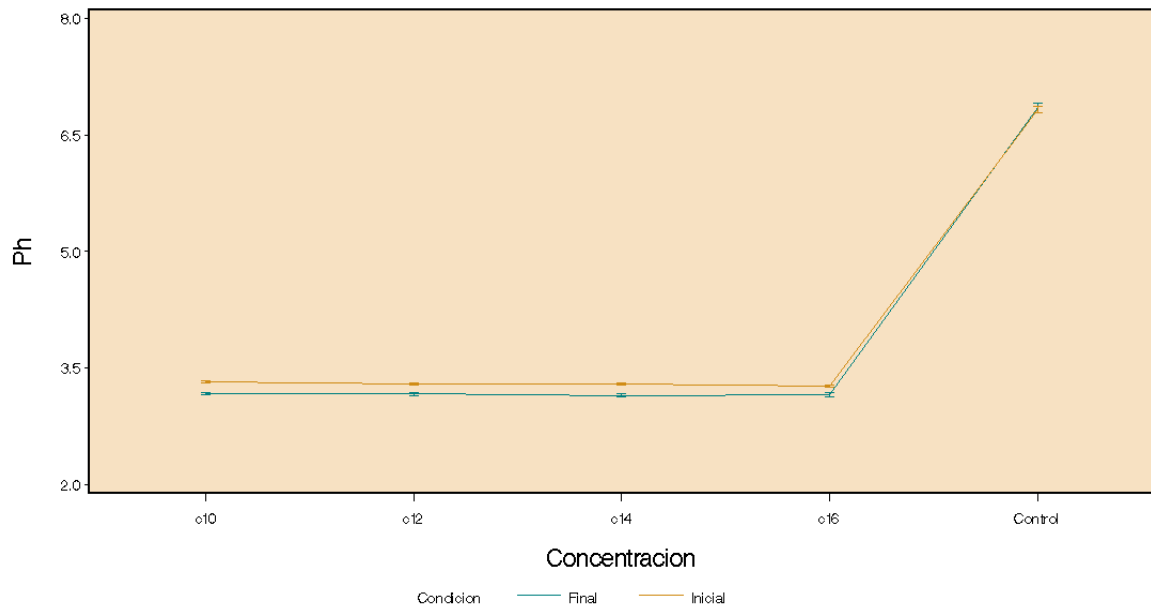
En la gráfica 4 se muestra el comportamiento del pH en cada una de las concentraciones evaluadas durante el estudio.

Es de anotar que también se registra el pH en función de cada una de las concentraciones, evidenciándose un patrón similar independientemente de la concentración utilizada. En la gráfica 4, puede verse como el pH se muestra muy poco variable tanto en la medición inicial como en la final.



**Gráfica 4.** Comportamiento del pH para los grupos evaluados con respecto a las diferentes concentraciones evaluadas y al control.

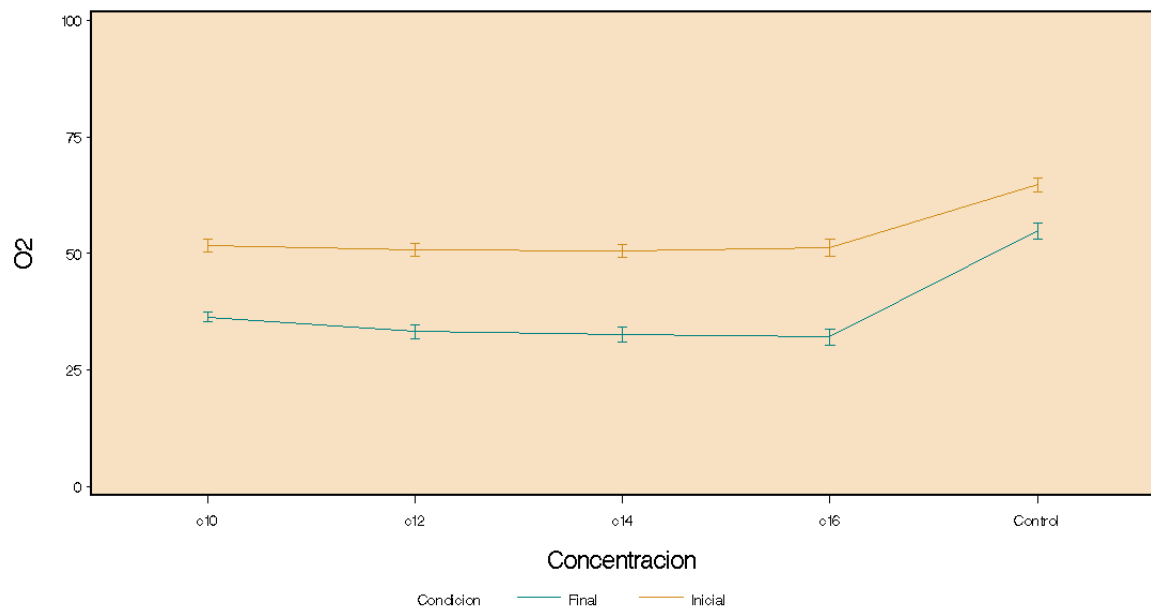
Para el grupo *Paracheirodon* se realizó un ensayo piloto con la concentración c10 y el control. Los resultados de las mediciones de pH para este ensayo muestran valores muy similares a los registrados en las pruebas con los demás grupos en la concentración c10 y el control, donde fue evaluada. En la gráfica 5 puede observarse que el pH inicial y final se mantuvo estable por debajo de 3.5 sin importar la concentración del producto empleada. Nótese la diferencia al contrastar con el pH mostrado por el control que permaneció cerca de la neutralidad (7).



**Gráfica 5.** Comportamiento del pH con respecto a las diferentes concentraciones evaluadas y al control, comparando mediciones iniciales y finales.

### 6.3.4.2 Concentración de Oxígeno Disuelto

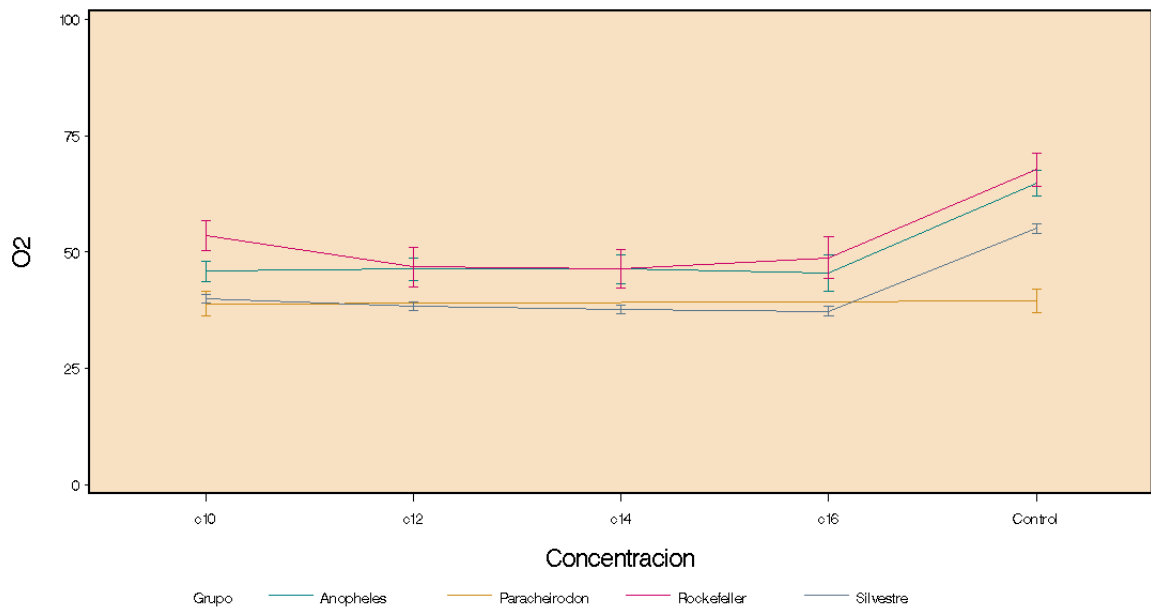
La medición del oxígeno disuelto en las pruebas muestra el mismo patrón entre la concentración inicial y la final, para todos los grupos evaluados; pero registrando un valor inicial por encima de 50 ppm, mientras la condición final registra un valor inferior cercano a 30 ppm. En la gráfica 5 puede verse como esta diferencia es evidentemente menor para el grupo control que no fue expuesto al producto.





**Gráfica 6.** Valores de oxígeno disuelto final e inicial registradas en las diferentes unidades experimentales con relación a la concentración del producto (10%, 12%, 14% y 16%) además del control, considerando todas las especies de Culicidae.

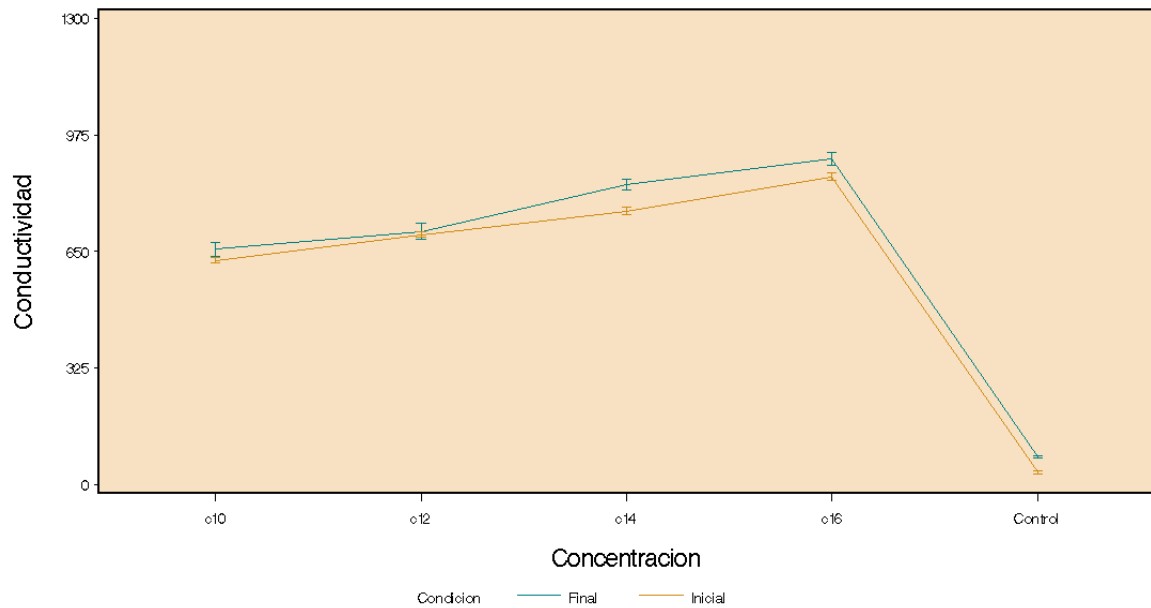
Vista de forma general, la concentración de oxígeno disuelto disminuye durante las pruebas, al examinar los datos diferenciando entre las diferentes especies y concentraciones (Ver Gráfica 7) se observa una tendencia similar para las larvas de *Anopheles*, Rockefeller y Silvestre. Sin embargo, para el grupo *Paracheirodon*, la concentración de oxígeno disuelto es igual entre la concentración del 10% (c10) y el control, al contrario de lo observado para las larvas. Este resultado era esperado debido a que los peces consumen el oxígeno presente en el agua, contrario a las larvas que toman el oxígeno del aire utilizando estructuras especializadas conocidas como sifones en *Culex* y *Aedes*, y aparato espiracular en *Anopheles*.



**Gráfica 7.** Concentración de oxígeno disuelto visto por grupos.

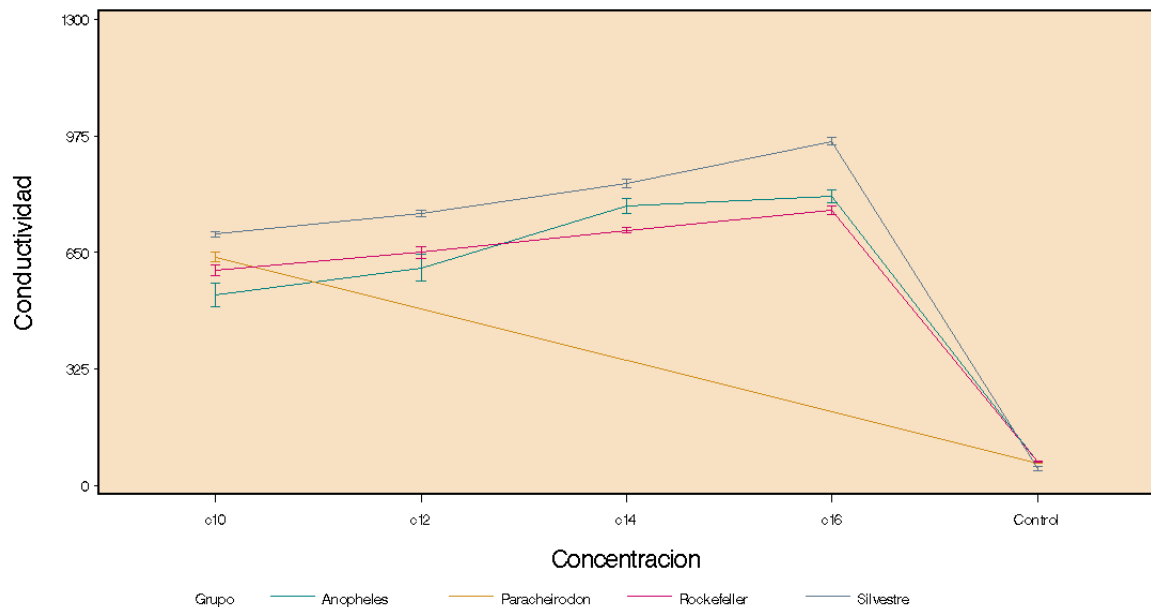
### 6.3.4.3 Conductividad ( $\mu$ Siemens)

La conductividad registró diferencias al evaluarse las mediciones al inicio y al final de las pruebas. En la gráfica 7, se aprecia cómo se mantiene la tendencia al compararse las mediciones iniciales y finales entre las diferentes concentraciones. La concentración c16 presenta la medida de microsiemens ( $\mu$ Siemens) más alta, mientras el control muestra la más baja tanto antes como después de la prueba.



**Gráfica 8.** Conductividad Inicial y Final.

Al visualizar los datos de conductividad por grupos y por concentraciones puede apreciarse que los grupos Silvestre y Rockefeller poseen valores diferentes en la gráfica 9, pero la tendencia es similar. La gráfica que describe los datos del grupo Anopheles muestra en las concentraciones c10 y c12 los valores más bajos de todos los grupos; pero para las concentraciones c14 y c16, muestra valores superiores al grupo Rockefeller. El grupo Paracheirodon muestra valores normales tanto para el control como para la concentración c10.



**Gráfica 9.** Conductividad vista por grupos y concentraciones.

## 6.4 Análisis Estadístico

### 6.4.1 Selección del modelo logístico

Usando el SAS se realiza una asociación de probabilidades predichas y respuestas observadas, y se obtuvo un valor de 0.818, (82%). Este valor corresponde al ajuste que muestran los datos al modelo, a ser un ajuste muy elevado, se escoge el modelo logístico para procesar los datos.

Para usar el modelo, se deben fijar algunos de los componentes de los efectos para tener un punto de comparación al realizar los ensayos. Los elementos escogidos como punto de referencia fueron para la concentración los controles; para el tiempo las 24 horas y para grupo se decidió fijar silvestre. Todos los análisis comparativos se realizaron en base a estas fijaciones.

### 6.4.2 Hipótesis

**6.4.3 Hipótesis Nula:** Los efectos concentración, grupo y tiempo no son significativos sobre las larvas.

**6.4.4 Hipótesis Alternativa:** Los efectos concentración, grupo y tiempo son significativos sobre las larvas.

**Tabla 8.** Prueba Hipótesis nula global.

Test	Chi-cuadrado	Grados de Libertad	Pr> ChiSq
Ratio de verosimilitud	14794.4775	10	<.0001
Puntuación	13520.7928	10	<.0001
Wald	9954.9118	10	<.0001

**Tabla 9.** Comprobación de significancia de factores.

Efecto	Grados de Libertad	Pr> ChiSqr
Concentración	4	>0.001
Grupo	3	>0.001
Tiempo	3	>0.001

Como puede verse en la Tabla 9, al ser el valor p menor a 0.05, los efectos son significativos y por tanto se rechaza la hipótesis nula, aceptando la alternativa. Se demuestra por lo tanto que los efectos Concentración, Grupo y Tiempo son estadísticamente significativos sobre las larvas.

Para probar si había diferencias entre los grupos, los tiempos y las concentraciones se analizaron los estimadores de cocientes de disparidad, comparando contra los componentes fijos.

**Tabla 10.** Efecto del Tiempo.

Efecto Tiempo	Error Estimador	Pr > ChiSq	Obtenemos
48h	-1,8794	<.0001	-84,7318313
72h	-2,2915	<.0001	-89,8885324
120h	-2,6508	<.0001	-92,9405285

Para el efecto tiempo se compararon cada una de las mediciones versus los datos observados en la primera medición (24 horas). Los resultados muestran que en el período de las 24 horas la probabilidad de morir es la más alta, y que esta probabilidad disminuye a medida que el tiempo pasa (Ver tabla 4).

**Tabla 11.** Efecto del Grupo.

Efecto Grupo	Error Estimador	Pr > ChiSq	Obtenemos
Anopheles	-0.3180	<.0001	-27,23
Culex	-0.2344	<.0001	-20,89
Rockefeller	-0.0833	0.0109	-7,99

Analizando el efecto grupo puede verse que comparado con *A. aegypti*, cepa Silvestre, *A. aegypti*, cepa Rockefeller tiene un 7% menos de probabilidad de morir, mientras que Culex y Anopheles muestran un 20% y un 27% menos de probabilidad de morir, respectivamente.

Esto significa que la cepa menos susceptible al producto es Anopheles, seguida por Culex y Rockefeller, mientras la cepa más susceptible es Silvestre.

**Tabla 12.** Efecto de la Concentración.

Efecto Concentración	Error Estimador	Pr > ChiSq	Obtenemos
C10	3,7682	<.0001	4230,20
C12	3,8625	<.0001	4658,41
C14	3,9130	<.0001	4904,88
C16	3,9645	<.0001	5169,39

Al observar la tabla 12 vemos el efecto concentración, en donde cada una de las concentraciones (10%, 12%, 14% y 16%) fue comparada con el control. Para la concentración más baja (C10), se nota un aumento significativo en la probabilidad de morir de 4230.20%, probabilidad que aumenta a medida que aumenta la concentración.

## 6.5 Análisis Estadístico de los parámetros Fisicoquímicos.

### 6.5.1 Análisis ANOVA

Se consideraron 3 factores: concentración, condición inicial - final y especie. Se utilizó el test de Dunnett para encontrar si el efecto de cada uno de los factores mencionados fue significativo o no. Los valores considerados significativos correspondieron con los valores de p menores que 0.05.

**Tabla 13.** Medias Generales de los parámetros fisicoquímicos.

Parámetro Fisicoquímico	Media
pH	3.94
O <sub>2</sub>	45.79 %
Conductividad	614.72 (μSiemens)

### 6.5.2 Por Concentración.

Al comparar las medias por concentraciones para cada uno de los parámetros, se halló que, con referencia al control todos tienen diferencias significativas.

**Tabla 14.** pH Por Concentración.

Alpha	0.05
Error Grados de libertad	696
Error de cuadrado medio	0.043
Valor crítico de t de Dunnett	2.44

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por \*\*\*.

	Diferencia entre medias	Límites de Confianza	
c10 - Control	-3.59543	-3.65486	-3.53601 ***
c12 - Control	-3.60850	-3.66874	-3.54827 ***
c14 - Control	-3.62100	-3.68124	-3.56077 ***
c16 - Control	-3.62725	-3.68749	-3.56702 ***

Para la ANOVA del pH se puede observar que todos los valores son significativos para el alfa propuesto, lo que quiere decir que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el pH registrado en las diferentes concentraciones vs el control.

El control mostró medidas cercanas a la neutralidad (7), mientras que las diferentes concentraciones mostraron un valor medio de 3.94 (Ver gráfica 5).

**Tabla 15.** O2 Por Concentración.

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Grados de libertad</b>	696
<b>Error de cuadrado medio</b>	126.49
<b>Valor crítico de t de Dunnett</b>	2.44

	Diferencia entre medias	Límites de Confianza	
c10 - Control	-15.753	-18.943	-12.564 ***
c12 - Control	-17.767	-21.000	-14.534 ***
c16 - Control	-18.121	-21.354	-14.889 ***
c14 - Control	-18.260	-21.493	-15.027 ***

La ANOVA de la concentración de oxígeno disuelto muestra una diferencia significativa entre las concentraciones y el control. Con una medida mucho más baja en las concentraciones del producto usadas (45.79 %) que en el control (aprox. 60%, ver gráfica 7).

**Tabla 16.** Conductividad Por Concentración.

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Grados de libertad</b>	696
<b>Error de cuadrado</b>	8078.43

<b>medio</b>	
<b>Valor crítico de t de Dunnett</b>	2.44

	Diferencia entre medias	Límites de Confianza	
c16 - Control	828.76	802.92	854.59 ***
c14 - Control	744.34	718.51	770.18 ***
c12 - Control	646.35	620.51	672.18 ***
c10 - Control	585.99	560.50	611.48 ***

Para la ANOVA de la conductividad también se observan diferencias significativas entre las concentraciones y el control. Ver gráfica 9.

### 6.5.3 Por condición (Inicial-Final)

También se evaluó cada uno de los parámetros usando un test de Dunnett, para indagar si existen diferencias significativas entre la lectura inicial y la lectura final al comparar las medias.

Todas las ANOVAS para la condición mostraron una diferencia significativa entre el valor inicial y el valor final.

**Tabla 17.** pH Por condición (Inicial-Final).

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Grados de libertad</b>	696
<b>Error de cuadrado medio</b>	0.043
<b>Valor crítico de t de Dunnett</b>	1.96
<b>Diferencia significativa mínima</b>	0.0305

	Diferencia entre medias	Limites de confianza
--	-------------------------	----------------------

Inicial - Final	0.10296	0.07251	0.13341 ***
-----------------	---------	---------	-------------

**Tabla 18.** O2 Por condición (Inicial-Final).

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Grados de libertad</b>	696
<b>Error de cuadrado medio</b>	126.49
<b>Valor crítico de t de Dunnett</b>	1.96
<b>Diferencia significativa mínima</b>	1.63

	Diferencia entre medias	Límites de confianza	
Inicial - Final	15.93	14.29	17.56 ***

**Tabla 19.** Conductividad Por condición (Inicial-Final)

<b>Alpha</b>	0.05
Error Grados de libertad	696
Error de cuadrado medio	8078.43
Valor crítico de t de Dunnett	1.96
Diferencia significativa mínima	13.06



	Diferencia entre medias	Límites de confianza	
Inicial - Final	-40.91	-53.97	-27.85 ***

#### 6.5.4 Por Grupo.

Para realizar la comparación por especies, se fijó la especie menos afectada por el producto según el modelo. Esta especie fue *Anopheles*.

**Tabla 20.** pH por Grupo.

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Grados de libertad</b>	696
<b>Error de cuadrado medio</b>	0.043
<b>Valor crítico de t de Dunnett</b>	2.36

	Diferencia entre medias	Límites de Confianza	
Rockefeller - <i>Anopheles</i>	0.148	0.093	0.20 ***
Silvestre - <i>Anopheles</i>	0.144	0.098	0.19 ***
<i>Paracheirodon</i> - <i>Anopheles</i>	0.024	-0.13	0.18

En cuanto al pH, la ANOVA muestra que entre los grupos *Paracheirodon* y *Anopheles* no existen diferencias significativas, mientras al comparar *Anopheles* con Rockefeller o Silvestre sí existen diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 21.** O2 por Grupo.

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Grados de libertad</b>	696
<b>Error de cuadrado</b>	126.49

<b>medio</b>	
<b>Valor crítico de t de Dunnett</b>	2.36

	Diferencia entre medias	Límites de Confianza	
Rockefeller - Anopheles	2.90	-0.079	5.87
Silvestre - Anopheles	-8.11	-10.60	-5.62 ***
Paracheirodon - Anopheles	-10.75	-19.43	-2.06 ***

Para el O2 la ANOVA muestra que no hay una diferencia significativa entre *Anopheles* y Rockefeller, pero sí existen diferencias significativas entre *Anopheles* y los otros dos grupos (*Paracheirodon* y Silvestre).

**Tabla 22.** Conductividad por Grupo.

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Grados de libertad</b>	696
<b>Error de cuadrado medio</b>	8078.43
<b>Valor crítico de t de Dunnett</b>	2.36

	Diferencia entre medias	Límites de Confianza	
Rockefeller - Anopheles	103.63	83.71	123.55 ***
Silvestre - Anopheles	1.19	-22.61	25.00
Paracheirodon - Anopheles	-35.76	-105.17	33.64

Esta ANOVA muestra que solo existe diferencia significativa entre Silvestre y *Anopheles*, mientras no hay diferencias entre los otros grupos.

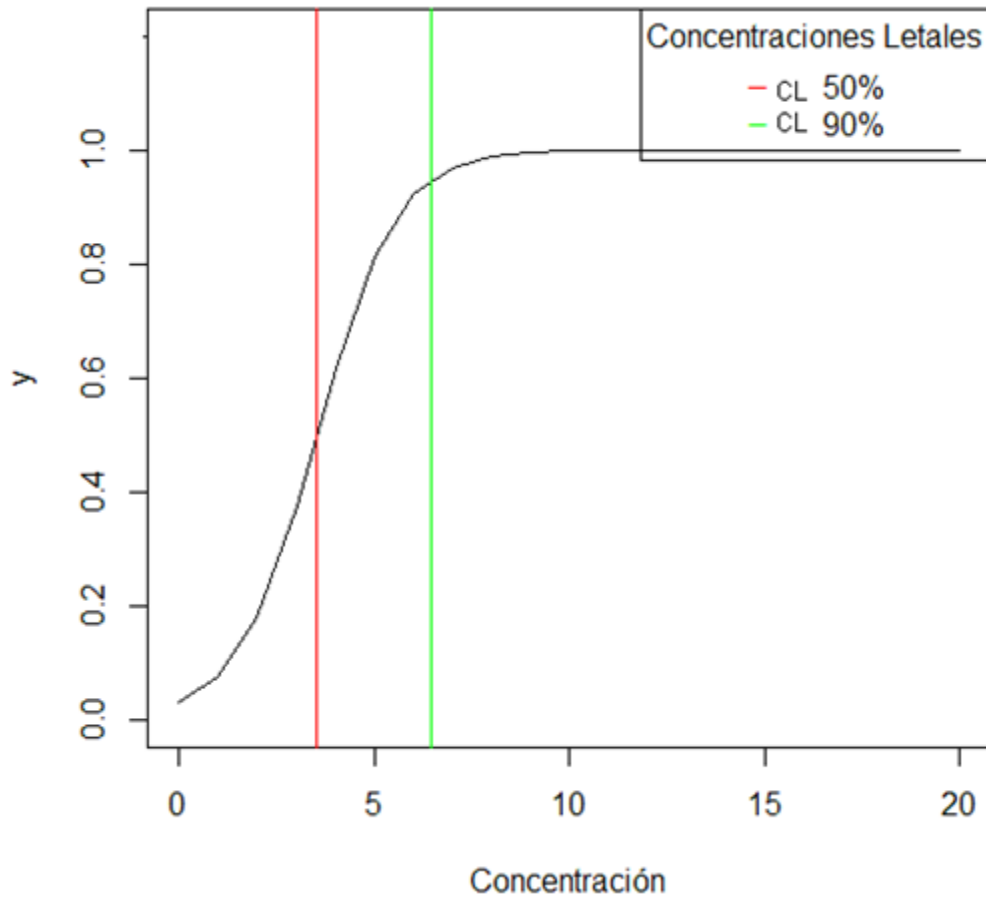
**Tabla 23.** Determinación de concentraciones letales 50% y 90%.

<b>Análisis del Estimador de Máxima Verosimilitud</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>GL</b>	<b>Estimador</b>	<b>Estándar</b>	<b>Pr &gt; ChiSq</b>
<b>Intercepto</b>	1	-3.51	0.1002	<.0001
<b>C10</b>	1	3.76	0.1013	<.0001
<b>C12</b>	1	3.86	0.1012	<.0001
<b>C14</b>	1	3.91	0.1012	<.0001
<b>C16</b>	1	3.96	0.1012	<.0001
<b>Grupo Anopheles</b>	1	-0.31	0.0335	<.0001
<b>Grupo Culex</b>	1	-0.23	0.0333	<.0001
<b>Grupo Rockefeller</b>	1	-0.08	0.0327	0.0109
<b>Tiempo 120h</b>	1	-2.65	0.0370	<.0001
<b>Tiempo 48h</b>	1	-1.87	0.0300	<.0001
<b>Tiempo 72h</b>	1	-2.29	0.0332	<.0001

## **6.6 Concentraciones Letales Generales Estimadas.**

**6.6.1 CL 50%** = 3.51709916 mL

**6.6.2 CL 90%** = 6.46153897 mL



**Gráfica 10.** Concentraciones Letales CL 50% y CL90% generales para el producto.

**Tabla 24.** Concentraciones Letales generales 50% y 90%.

De esta manera, se calcularon las concentraciones letales 50 y 90, para los diferentes grupos de mosquitos expuestos al producto. Las concentraciones letales se calculan a partir del volumen total de 100 mL.

<b>Concentraciones Letales</b>	<b>50%</b>	<b>90%</b>
Anopheles	3.835 mL	6.779 mL
Culex	3.751 mL	6.695 mL
Rockefeller	3.600 mL	6.544 mL
Silvestre	3.517 mL	6.461 mL

## 7. Discusión

Los resultados obtenidos de este estudio son los primeros registros para este producto en condiciones de laboratorio utilizando la metodología propuesta por la OMS (WHO, 2005), tanto en las propiedades fisicoquímicas medidas del producto, como en el efecto del mismo sobre especies con capacidad vectorial y especie no blanco.

El producto mostró ser eficaz contra las especies de mosquito expuestas, resultando más susceptible la especie *Aedes aegypti*, en la cepa denominada silvestre, la cepa denominada Rockefeller perteneciente a la misma especie fue menos susceptible; seguida por la especie *Culex quinquefasciatus*, mientras que la especie menos susceptible al producto a base de organismos probióticos correspondió con *Anopheles albimanus* (Ver Tablas 5 y 11).

### 7.1 Variables tenidas en cuenta para el análisis estadístico.

- 1) Tiempo de lectura de cada prueba (24 horas, 48 horas, 72 horas y 120 horas),
- 2) Especie (especies de Culicidae y cepas correspondientes expuestas al producto: *Anopheles*, *Culex*, Silvestre, Rockefeller y *Paracheirodon*) y
- 3) Concentración del producto evaluado (10%, 12%, 14% y 16%) (Ver tablas 9, 10, 11 y 12).

Los grupos se conformaron por especies; para el caso de la especie *Aedes aegypti* se evaluó la acción del probiótico sobre dos poblaciones diferentes de la misma especie, una denominada silvestre, con 3 generaciones, y la otra Rockefeller, cepa de referencia mantenida en el insectario. Al analizar estadísticamente los resultados, se determinó que la especie de mosquito con la probabilidad más alta de muerte por contacto con el producto es la cepa silvestre, por lo que se seleccionó para servir de referencia al comparar los diferentes grupos.

De los resultados del estudio se observa que *Anopheles* tuvo un 27% menos de probabilidad de morir por contacto con el producto, *Culex* tuvo un 20% menos de probabilidad de muerte por contacto y Rockefeller que pertenece a la misma especie que silvestre (*Aedes aegypti*), tuvo un 7.99% menos de probabilidad de morir por contacto con el producto. Esto muestra a la especie *Anopheles albimanus* como la especie con menor susceptibilidad al producto y

a la especie *Aedes aegypti* como la especie más susceptible, siendo la cepa Silvestre la que presentó mayor susceptibilidad.

Este resultado llama la atención porque se esperaba que la cepa de *Aedes aegypti* colonizada (cepa Rockefeller) presentara datos compatibles con mayor susceptibilidad, sin embargo, nuestros resultados apuntan en la dirección contraria, siendo la cepa denominada silvestre, más susceptible al producto.

La literatura científica indica que la colonización, y por tanto el cruce constante de individuos cercanamente relacionados (denominado endogamia), en un contexto genético, puede modificar la apariencia externa (fenotipo) y la composición genética (genotipo) de las poblaciones (Benedict y col., 2009). Esta premisa se ha relacionado generalmente a que las poblaciones en condiciones de laboratorio tienden a ser susceptibles cuando expuestas a determinados agentes de control o a infecciones (Gargan y col., 1983; Lorenz y col., 1984). Esta susceptibilidad puede explicarse en parte por la teoría de retrocruce y el equilibrio de Hardy-Weinberg; que sostienen respectivamente, que el cruce endogámico constante en una población reducirá el número de copias diferentes de un mismo gen que estén presentes en la población. Afirma además, que mientras no ingresen individuos nuevos a la población, no existan cambios genéticos, ni algún tipo de selección, existirá un equilibrio en la composición de los genes de dicha población (Munstermann, 1994).

Existen también, estudios en los que los resultados muestran un mayor grado de susceptibilidad a insecticidas de una cepa silvestre frente a una cepa de colonia bajo condiciones de cría y mantenimiento muy estables a lo largo del tiempo, como la humedad relativa, la temperatura, el fotoperiodo (Self y Pant, 1966; Knop y col., 1987, Benedict y col., 2009), e incluso la alimentación.

Las colonias sometidas a condiciones de cría variantes en los parámetros mencionados anteriormente, tienden a mantenerse de cierta manera más heterocigóticas y más cercanas a los parentales, mientras que las colonias mantenidas bajo condiciones constantes tienden a presentar una mayor homocigocidad (Knop y col., 1987; Seawright y col., 1991; Brooke y col., 2002). Por lo tanto y en vista de cómo se mantienen las colonias de dípteros en el insectario del PECET, se puede pensar que las colonias allí mantenidas

tendrían diferencias frente a los parentales originales a partir de los cuales se inició la colonia, sin embargo, los huevos se almacenan por un tiempo y se activan después de períodos comprendidos entre 2 y 3 meses lo que mantendría la variabilidad de la colonia en el laboratorio.

La totalidad de los ejemplares de *Paracheirodon axelrodi* expuestos al producto murieron, posiblemente debido a la exposición durante la prueba a parámetros fisicoquímicos por fuera de los límites reportados para esta especie, particularmente el pH (que para esta especie está reportado en 3.7), además de no proveerles un tiempo suficiente de aclimatación (Schofield, 1976) en el experimento ya que los individuos se sometían a un cambio drástico de pH al realizar la prueba. Sin embargo, en la literatura también se reporta que una especie cercana, *Paracheirodon innesi*, presenta mecanismos de adaptación osmoregulatorios que le permiten subsistir a condiciones de pH de 3.5 en su hábitat natural (González y Preest. 1999); siempre y cuando el cambio fuese gradual. A pesar de esto, el mismo artículo menciona que el agua donde habita este pez presentan un pH muy bajo, al igual que una conductividad muy baja, caso contrario a lo evidenciado en el probiótico, donde se observa un pH bajo y conductividad elevada.

Las concentraciones usadas del producto se determinaron a partir del protocolo para evaluación de larvicidas en condiciones de laboratorio y campo de la OMS (WHO, 2005). La mínima concentración usada fue la del 10% y mostró ser 4230.20 veces más efectiva al compararla con los grupos control (Ver Tabla 12). Así mismo, nuestros datos muestran que a medida que aumenta la concentración, también aumenta la probabilidad de morir, al igual que en otros estudios, en donde se evidencia un aumento en la mortalidad de larvas a medida que se eleva la concentración del producto larvicida (Mittal, 2003; Ashauer y col., 2006; Duchet y col., 2008, 2010).

Nuestros resultados indican que hay diferencia en la respuesta de culicinos y anofelinos al producto. Se presume que una de las causas de estas diferencias en la probabilidad de morir radique en las propiedades físicas del producto, como su carácter líquido, ya que se ha reportado que la presentación de biolarvicidas (ya sea líquida, en polvo, gránulos, etc.) pueden influir en el

desempeño, siendo la formulación líquida más efectiva contra culicinos y la presentación granulada o en polvo más efectiva contra anofelinos debido al sitio que ocupa cada uno de estos grupos en la columna de agua (Mittal, 2003). Es de resaltar que cada grupo tiene adaptaciones evolutivas distintivas y representativas, en el caso de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*, la estructura conocida como sifón es relativamente alargada y les permite a las larvas respirar en una posición casi vertical con respecto a la superficie; mientras que las larvas de *Anopheles albimanus* no disponen de un sifón largo y la posición de las larvas es horizontal con respecto a la superficie del agua (Merrit, 1992). Esto incide drásticamente en el lugar que la larva ocupa dentro de la columna de agua. Mientras las larvas de *Culex* y *Aedes* se desplazan frecuentemente por toda la altura de la columna, la larva de *Anopheles* permanece mucho más tiempo cerca de la superficie (Merrit, 1992; Curtis, 1996; Mittal, 2003), lo que posiblemente la haga más susceptible a un producto de lento hundimiento o lenta dilución (granulado), al compararlo con uno que se disuelva más rápido como el líquido (formulación utilizada de probióticos).

## **7.2 Factores Físicoquímicos.**

### **7.2.1 pH.**

Al analizar los factores físicoquímicos se encuentra que el pH registrado para los bioensayos realizados muestran un valor promedio igual para los mosquitos y los peces (pH de 3.5), manteniéndose relativamente estable sin importar las concentraciones evaluadas (Ver gráfica 4), tanto al inicio como al final de cada bioensayo (Ver gráfica 5), lo anterior indica que sin importar la concentración del producto, el pH de la solución es ácido y se estabilizará en 3.5, mientras el control presenta un pH con una media de 7, que lo ubica en la neutralidad, podemos decir que el probiótico modifica el pH del medio donde se encuentra, y lo acidifica.

Sin embargo este valor de pH se halla por debajo del valor reportado para las especies expuestas al producto que tiene una media general de 3.5, tanto peces como mosquitos; para *Aedes aegypti* se ha registrado desarrollo larvario normal para un pH entre 4 y 11 en pruebas de laboratorio, registrando por debajo de 4 mortalidad en las larvas (Clark y col., 2004). *Anopheles albimanus*



ha sido hallado en criaderos naturales con una medida de pH que varía de 7 a 9, con una media de 7.5 (Rojas, E., 2013) y en condiciones de laboratorio se mantiene con un pH de 6.9 (Morales-Saldaña, 2008); *Culex quinquefasciatus* ha sido registrado en criaderos naturales con un pH entre 7.4 y 8.1 (Ramírez y col., 1999), muy diferentes al promedio de 3.5 que se registra con cultivos probióticos. Las larvas expuestas a valores de pH por fuera del rango de supervivencia tienden a morir en un periodo de tiempo muy corto, sin embargo, también se ha sugerido que disminuyendo el pH gradualmente permitiría a las larvas de ciertos mosquitos vivir un periodo de tiempo más prolongado en valores de pH por fuera de su rango de supervivencia registrado (Clark y col., 2004). Los valores de pH registrados para los controles tienden a la neutralidad (pH 7) que es el valor al cual se mantienen los estadios inmaduros en el insectario del PECET, al igual que para otros estudios realizados con biolarvicidas como el VectoBac (*Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*, Bti) y el Spinosad (Espinosa A y D, productos fermentados de *Saccharopolyspora spinosa*), en donde el pH de las soluciones se mantiene muy cercano a la neutralidad (7.2), dentro del rango conocido para las especies y por lo tanto no se asocia a la muerte de las larvas (Duchet y col., 2008, 2010; Sadanandane y col., 2009).

En el caso de la especie no blanco *Paracheirodon axelrodi* en un rango de pH entre 4 y 8.5 ha mostrado un 100% de supervivencia, pero se observa una mortalidad del 45% de los individuos expuestos cuando este valor es de 3.6 (Ragonha de Oliveira y col. 2008), aunque en nuestros ensayos registramos mortalidad del 100% cuando fueron expuestos a pH 3.6 e inferiores en menos de 24 horas.

### **7.2.2 Concentración de O<sub>2</sub>.**

Contrario a lo obtenido en nuestros bioensayos, Duchet y col., 2008 muestran un aumento en las concentraciones de oxígeno disuelto con diferencias significativas independientemente si el producto evaluado fuera Bti, Spinosad o el microcosmos de control; mientras en nuestros ensayos el oxígeno disminuye a medida que se aumenta la concentración del producto, manteniendo una

media de saturación de oxígeno de 45.79%, que a 27 grados centígrados en Medellín equivale a 3.6 mg/L; Duchet y col. muestran valores promedio de 4.77 mg/L para Bti y 6.20 mg/L para Spinosad. La saturación de oxígeno disuelto al finalizar los bioensayos se observa muy baja en el piloto realizado con *P. axelrodi* al compararse a los bioensayos con mosquitos, esto es posible de explicar debido a que los peces consumen el oxígeno del agua por ventilación.

Puede suponerse que los microorganismos presentes estén realizando procesos oxidativos que utilizan oxígeno disuelto en el medio; por esto el oxígeno puede convertirse en un factor limitante para organismos acuáticos (Kramer, 1987), a pesar de que esto no fue medido en este estudio se presume está presente debido a las variaciones entre las condiciones iniciales y finales de los parámetros fisicoquímicos medidos en los bioensayos con larvas de mosquito.

Las larvas de mosquito no toman su oxígeno directamente del agua, sino que utilizan sus sifones para tomar aire de la superficie en el caso de *Culex* y *Aedes*, mientras en el caso de *Anopheles* el intercambio gaseoso se realiza por medio de su espiráculo, presente en el abdomen (Curtis, 1996). Por lo tanto las larvas no contribuyen a la disminución en la saturación de oxígeno disuelto en el agua de los bioensayos, sino que se debe al metabolismo de los microorganismos que hacen parte del probiótico y a microorganismos no asociados al probiótico pero que están presentes en el control.

### **7.2.3 Conductividad (Microsiemens).**

Siendo una medida indirecta de los nutrientes disponibles en el medio, ha mostrado que afecta las comunidades de mosquitos en recipientes contenedores, así como a otros organismos presentes en el medio acuático (Yee y Juliano, 2007; Yee y col., 2010). Para todos los bioensayos la conductividad aumentó, inclusive en los controles se nota un leve aumento de la conductividad. La gran diferencia de la conductividad entre los controles y los grupos expuestos al producto sostienen que la conductividad aumenta a

medida que aumenta la concentración del producto (Correa, 2009, 2011), y que este aumento se debe a la presencia de microorganismos vivos en el producto.

Desenvolverse en un medio altamente iónico supone un esfuerzo extra para los organismos presentes para mantener el balance celular, la integridad de las membranas, y contrarrestar los efectos del bajo pH (Mulla y col., 1990; González y Preest. 1999; Mittal, 2003; Yee y Juliano, 2007; Mireji y col., 2007; Mwangangi y col., 2010; Yee y col., 2010).

### **7.3 Concentraciones letales y otros productos larvicidas.**

Debido a la naturaleza del producto, resulta complejo realizar comparaciones entre cultivos probióticos y otros productos larvicidas, debido en parte a que la mayoría de los biolarvicidas disponibles en el mercado constan de una sola especie, generalmente del género *Bacillus*, en donde tanto la especie, como las proteínas responsables del efecto larvicida han sido plenamente identificadas y aisladas; mientras los cultivos probióticos son un consorcio de microorganismos en el cual cada especie cumple un rol específico y aporta a su estabilidad (Correa, 2002, 2003, 2009, 2010, 2011), pero no se ha identificado plenamente la forma de acción del producto.

Tomando como referencia a la especie evaluada *Culex quinquefasciatus*, las concentraciones letales obtenidas con el probiótico fueron de 37510 ppm y 66950 ppm para la CL 50% y 90% respectivamente, mientras utilizando *Bacillus thuringiensis*, las CL 50% y 90% son 206.80 y 430.95 ppm respectivamente (Mahesh Kumar y col., 2012). Esto demuestra que es necesaria una cantidad mayor de probiótico para equiparar el efecto mostrado por *Bacillus thuringiensis*; sin embargo, el costo de los productos es muy diferente; mientras 5 kilogramos del formulado VectoBac a base de Bti cuestan unos 215.910 pesos, producir un litro de cultivos probióticos cuesta solamente 3.383 pesos, y las especies que conforman el consorcio de lo probióticos son ubicuas (Correa, 2002, 2003, 2009, 2010, 2012), mientras el VectoBac debe ser adquirido de una casa comercial e importado (Mittal, 2003).

Para la especie *Aedes aegypti*, estudios utilizando *Bacillus thuringiensis* var *israeliensis* (VectoBac) muestran resultados similares en el porcentaje de

mortalidad >90% para el probiótico y >95% para VectoBac a las 48 horas de exposición (Chung y col., 2001), y en bioensayos realizados sobre la especie *Anopheles albimanus* donde se evaluaron los efectos del Bti en condiciones similares (Perich y col., 1987). Se ha reportado que en espacios cerrados Spinosad (producto basado en Espinosina A y D, fermentos de *Saccharopolyspora spinosa*) alcanza entre 79% y 83% de mortalidad a las 48 horas de exposición para *Cx. pipiens*, así como buenos resultados frente a *Aedes aegypti*, pero existen inconvenientes con la fotodegradación (Sadanandane y col., 2009); frente al >90% de mortalidad evidenciada para el cultivo probiótico.

Se ha propuesto que un hábitat turbio y rico en materia orgánica, como el que se presenta en pozos, charcas, tanques de agua, tanques sépticos y en general aguas lénticas, posee parámetros fisicoquímicos que afectan la eficacia de biolarvicidas basados en Bti o Bs (*Bacillus sphaericus*). Las altas temperaturas o disminuciones del pH (Mulla y col., 1990), presencia de metales como el cromo, el cobre, el hierro, plomo, manganeso y zinc (Mireji y col., 2007), o incluso presencia de algas ejercen un efecto negativo en la actividad de las formulaciones basadas en Bti o Bs. Estos hallazgos tienen una implicación epidemiológica cuando estas formulaciones sean usadas individualmente, recomendándose la utilización y combinación con otros agentes para controlar eficazmente la población de mosquitos (Mwangangi y col., 2010), mientras cultivos probióticos prosperan bajo estas condiciones y se desenvuelven óptimamente (Correa, 2002, 2003, 2009, 2010, 2012).

#### **7.4 Cultivos Probióticos en la Naturaleza.**

La anteriormente mencionada ubicuidad de los microorganismos que componen el probiótico puede consultarse en publicaciones científicas y médicas que registran la presencia de estos microorganismos en diversidad de ambientes, silvestres o antrópicos. Adicionalmente, muchas especies hacen parte de los tractos digestivos de animales, e inclusive componen productos alimenticios de gran consumo a nivel mundial como los *Lactobacillus* presentes en los lácteos y sus derivados (Ver Anexo 3 para la lista de microorganismos presentes en cultivos probióticos) como se describe en los siguientes párrafos.

*Bacillus subtilis*, es una bacteria saprofítica que puede ser encontrada en el suelo, el aire, el agua y materia vegetal en descomposición (Serafini, 2001), la variedad que se usa en probióticos proviene de la elaboración de Natto, un alimento fermentado a base de soya. *Bifidobacterium animalis*, se encuentra frecuentemente en el sistema digestivo de animales, incluido el ser humano, comprendiendo un 3% de la flora intestinal de un individuo saludable (Karimi y Pena, 2003; Solano-Aguilar y col., 2008), al igual que *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*, que cumplen funciones importantes en el tracto digestivo resaltando en la defensa contra microbiota perjudicial (Khailova y col., 2010; Ishikawa y col., 2013).

Como su nombre lo indica, el grupo de los *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*) se halla principalmente en lácteos y sus derivados, aunque también en tractos digestivos de mamíferos (Weaver, 1932), y estudios han demostrado que cumplen funciones en el procesamiento y absorción de aminoácidos, azúcares, grasas y otros compuestos útiles (Anderson y Gilliland, 1999; Merenstein y col., 2010; Mukisa y col., 2012).

*Rhodopseudomonas palustris* y, *Rhodopseudomonas sphaeroides* son dos tipos de bacterias fotosintéticas encontradas en el fango, de las cuales se ha mostrado potencial para uso como probióticos en acuicultura y resistencia a pH muy ácidos, propios de sistemas digestivos en ciertos animales (Zhou y col., 2007).

*Saccharomyces cerevisiae* se ha usado por miles de años en la elaboración de cerveza, pan y vino, además de servir en el tratamiento de gastroenteritis y por manifestar propiedades antimicrobiales útiles para el ser humano (Hatoum y col., 2012), al igual que *Streptococcus thermophilus*, que ha sido reportado como benéfico, mostrando efectos terapéuticos en el tratamiento de gastritis y se puede hallar en fermentos lácteos, (Anderson y Gilliland, 1999; Rodríguez y col., 2010).

## 8. Conclusiones.

1. Se evaluó la eficacia del cultivo probiótico como agente larvicida para las especies *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*; el producto fue eficaz contra las larvas de dichas especies en diferente grado.
2. La especie de mosquito más susceptible al producto fue *Aedes aegypti*, cepa silvestre, mientras la especie de mosquito menos susceptible fue *Anopheles albimanus*.
3. Se determinó la C50 para las especies de mosquito evaluadas está entre 3.51 mL y 3.83 mL del probiótico.
4. Se determinó la C90 para las especies de mosquito evaluadas está entre 6.54 mL y 6.69 mL del probiótico.
5. Se comparó el efecto larvicida en una población de laboratorio versus una población silvestre colonizada, la cepa silvestre muestra mayor susceptibilidad al compararse con la cepa de referencia.
6. Los resultados muestran que el producto altera los parámetros fisicoquímicos del medio al cual se aplique, principalmente el pH.
7. Los resultados de la prueba con la especie *Paracheirodon axelrodi*, sugieren que el producto podría no ser seguro para peces en las concentraciones evaluadas.

## 9. Perspectivas

- Cultivos probióticos muestra efectividad contra las especies de mosquito expuestas, lo que lo convierte en un producto interesante para seguir analizando y desarrollando.
- Dado el resultado con la especie no blanco, sería interesante continuar realizando pruebas en estos organismos con concentraciones que sigan siendo efectivas contra las especies blanco como los mosquitos analizados en este trabajo.
- Debido a que no conocemos exactamente los mecanismos mediante los cuales ejerce su efecto larvicida, Cultivos Probióticos supone un reto biológico. Es recomendable realizar estudios más a fondo que permitan identificar la o las especies responsables de este efecto larvicida, o si se trata de un efecto conjunto del conglomerado microbiano.

## 10. Bibliografía

- Ahumada J, Lapointe D, Samuel L. 2004. Modeling the population dynamics of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), along an elevation gradient in Hawaii. *Journal of Medical Entomology*. 41(6): 1157-70.
- Alava JJ, Salazar S, Cruz M, Jiménez-Uscátegui G, Villegas-Amtmann S, Páez-Rosas D, Costa DP, Ross PS, Ikonomou MG, Gobas F. 2011. DDT Strikes back: Galápagos Sea Lions Face Increasing Health Risks. *AMBIO*. 40:425-430.
- Anderson WJ, Gilliland SE. 1999. Effect of fermented Milk (Yogurt) Containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans. *Journal of the American College of Nutrition*. Vol. 18, No. 1, 43 – 50.
- Armstrong PM, Andreadis TG. 2010. Virus in Mosquitoes and Their Role as Bridge Vectors. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (12). Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/12/pdfs/10-0640.pdf>
- Ashauer R, Boxall A, Brown C. 2006. Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1899–1912.
- Badii M, Garza V, Landeros J, Quiroz H. 2006. Diversidad y relevancia de los mosquitos. *CULCyT*. Año 3 N° 13.
- Barbosa R, Regis L, Vasconcelos R, Leal W. 2010. *Culex* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Egg Laying in Traps Loaded With *Bacillus thuringiensis* Variety israelensis and Baited With Skatole. *J Med Entomol*. 47(3): 345–348.
- Bassler B. 2009. How Bacteria Talk. *TED*. Disponible en: [http://www.ted.com/talks/bonnie\\_bassler\\_on\\_how\\_bacteria\\_communicate.html](http://www.ted.com/talks/bonnie_bassler_on_how_bacteria_communicate.html). Consultado el 15 de junio de 2010.
- Berrocal L, Peña J, González M, Mattar S. 2006. Virus del oeste del nilo: ecología y epidemiología de un patógeno emergente en Colombia. *Rev. salud pública* vol.8 no.2



- Benedict MQ, Knol BGJ, Bossin H, Howell P, Mialhe E, Caceres C, Robinson A. 2009. Colonisation and mass rearing: Learning from others. *Malar J.* 8 (suppl 2): S4
- Bisset J, Rodriguez M, Díaz C, Soca A. 1998. Estudio de la Resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus* procedente de Medellín, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 50(2): 133-7.
- Blanco J, Hernández D. 2009. The potential cost of Climate Change in Tropical Vector Borne Diseases – A Case study of Malaria and Dengue in Colombia. *LCR Sustainable Development Working Paper No. 32.*

Disponible en:

[http://siteresources.worldbank.org/INTLAC/Resources/Assessing\\_Potential\\_Consequences\\_CC\\_in\\_LAC\\_7.pdf](http://siteresources.worldbank.org/INTLAC/Resources/Assessing_Potential_Consequences_CC_in_LAC_7.pdf)

- Blaustein y Chase 2007. Interactions between mosquito larvae and species that share the same trophic level. *Annual Review of Entomology.* 52:489-507.
- Bourgouin C, Larget-Thiery I, de Barjac C. 1984. Efficacy of dry powders from *Bacillus sphaericus*: RB 80, a potent reference preparation for biological titration. *Journal of Invertebrate Pathology.* Vol 44, issue 2. P. 146,150.
- Brochero H, Quiñones ML. 2008. Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: Reflexión para el caso de la Malaria. *Biomédica.* Vol28 no.1.
- Brooke BD, Hunt RH, Chandre F, Carnevale P, Coetzee M. 2002. Stable chromosomal inversion polymorphisms and insecticide resistance in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology.* 39(4): 568-73.
- Cáceres-Manrique M, Vesga-Gómez C, Angulo-Silva M L. Empoderamiento para la prevención y control del Dengue. 2010. *Rev. salud pública* vol.12 no.5

Disponible en <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642010000500010>

- Cáceres-Manrique M, Vesga-Gomez C, Perea-Flóres X, Ruitort M Talbot Y. 2009. Conocimientos, Actitudes y Prácticas sobre Dengue en dos barrios de Bucaramanga, Colombia. *Rev. salud pública.* 11 (1): 27-38.
- Carmona-Fonseca 2003. La malaria en Colombia, Antioquia, y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: Panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. *Iatreia.* Vol 16:N°4.

- Caramia G, Silvi S. 2011. Chapter 1: Probiotics: From the Ancient Wisdom to the actual Therapeutical and Nutraceutical Perspective. En: Malago JJ. 2011. Probiotics: Bacteria and Enteric Infections. Springer Science + Business Media B.V.
- Castañeda O, Segura O, Ramírez AN. 2011. Knowledge, attitudes and community practicing during an outbreak of Dengue in a town in Colombia, 2010. *Rev Salud Publica*. 13 (3): 514-527.
- Castro S, Colombi E, Flores L, Canales D. 2002. Aplicación del biolarvicida *Bacillus sphaericus* -2362 (GRISELESF) para el control de la Malaria en un área de salud de la república de Honduras. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 54 (2):134-41.
- CDC. 2005. West Nile.  
[http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount05\\_detailed.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount05_detailed.html)– (Consultado 12 de Diciembre de 2011).
- CDC. 2010. Eastern Equine Encephalitis.  
<http://www.cdc.gov/EasternEquineEncephalitis/tech/virus.html>  
(Consultado 25 de enero de 2012).
- Chandra G, Bhattacharjee I, Chatterjee S. Ghosh A. 2008. Mosquito control by larvivorous fish. *Indian Journal of Medical Research*. 127(1): 13-27.
- Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensulato*. *Bulletin of the World Health Organization*. 77(3):230-4.
- Chapman HC. 1974. Biological Control of Mosquito Larvae. Annual Review of Entomology. Vol. 19: 33-59.
- Charrel R, de Lamballerie X, Raoult D. 2007. Chikungunya Outbreaks The Globalization of Vectorborne Diseases. *N Engl J Med* 2007; 356:769-771.
- Chaturvedi 2006. The curse of Dengue. *Indian Journal of Medical Research*. 124(5):467-70.
- Chen J, Cho W, Raikhel A. 1994. Analysis of mosquito vitellogenin cDNA. Similarity with vertebrate phosvitins and arthropod serum proteins. *Journal of molecular Biology*. 237(5): 641-7.
- Chung YK, Lam-Phua SG, Chua RY. 2001. Evaluation of biological and chemical insecticide mixture against *Aedes aegypti* larvae and adults by

thermal fogging in Singapore. *Medical and Veterinary Entomology*. Vol. 15, 321-327.

- Correa M, 2009; 2010, 2012. Reporte preliminar, No publicado.
- Correa, M. 2002. Experiences with Effective Microorganisms (EM) in disease and pest control in farms and gardens in India. Seventh International Conference on Kyusei Nature Farming. New Zealand. 164-169.
- Correa, M. 2003. Experiences with Effective Microorganisms (EM) and Neem Technology. Proceedings of the 4th All India Peoples' Technology Congress, 22-23, Kolkata, India. AB18:58-66.
- Cowgill UM, Emmel HW, Hopkins DL, Applegath SL, Takahashi IT.1986. The influence of water on reproductive success and chemical composition of laboratory reared populations of *Daphnia magna*. *Water Research*. Vol 20, Issue 3, Pág. 317-323.
- Crow A, Borazjani A, Potter P, Ross M. 2007. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Volume 221, Issue 1, 15. Pages 1-12.
- Cuéllar-Jiménez ME, Velásquez-Escobar OL, González-Obando R, Morales-Reichmann CA. 2007. Detection of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in the city of Cali, Valle del Cauca, Colombia. *Biomédica*. 27(2):273-9.
- Curtis 2002. Should the use of DDT be revived for Malaria vector control?. *Biomédica*. Vol 22 N°004. P 455-461.
- Curtis CF. 1996. An overview of mosquito biology, behavior and importance. *Ciba Found Symp. London School of Hygiene & Tropical Medicine*. 3-7.
- De Melo KD, Romao PT, Amorim LB, Anastacio DB, Arruda R, Fontes CM, Regis L, Pompilio O, Neves MH. 2008. Detection of an Allele Conferring Resistance to *Bacillus sphaericus* Binary Toxin in *Culex quinquefasciatus* Populations by Molecular Screening. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 75. no4. 1044-1049.
- Duchet C, Larroque M, Caquet Th, Franquet E, Lagneau C, Lagadic L. 2008. Effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israeliensis* on *Daphnia pulex* in field microcosms. *Chemosphere*. Vol 74, p. 70-74.

- Duchet C, Coutellec MA, Franquet E, Lagneau C, Lagadic L. 2010. Population-level effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna*: comparison of laboratory and field microcosm exposure conditions. *Ecotoxicology*.
- Dudgeon D, Arthington A, Gessner M, Kawabata Z, Knowler D, Lévêque C, Naiman R, Prieur-Richard A, Soto D, Stiassny M, Sullivan C. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*.81:163-182.
- Duguet J. 1949. Disinsectization of Aircraft. *Boletín World Hlth Org*. Vol 2. 155 -191.
- Dujardin J-C, Herrera S, do Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, y col. 2010. Research Priorities for Neglected Infectious Diseases in Latin America and the Caribbean Region. *PLoS Negl Trop Dis* 4(10): e780. doi:10.1371.
- Eilenberg J. 2006. Chapter 1. Concepts and Visions of Biological Control. En: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds.). 2006. An Ecological and Societal Approach to Biological Control, 1 -11. Springer.
- Engler R, Rogoff M. 1976. Entomopathogens: ecological manipulation of natural associations. *Environ Health Perspect*. 14: 153–159.
- Finlay B, Clarke K. 1999. Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature*. 400. 828.
- Fonseca-Gonzalez I, Quiñones M, Lenhart A Y Brogdon WG. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science*. 67(4) 430-437.
- Fonseca-González I, Cárdenas R, Quiñones M, McAllister J, Brogdon GW. 2009. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* (Root, 1926) populations from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(1): 18-26, February 2009.
- Fonseca-González I, Cárdenas R, Quiñones M, McAllister J, Brogdon GW. Pyrethroid and organophosphates resistance in *Anopheles (N.) nuneztovari* Gabaldón populations from malaria endemic areas in Colombia. 2009. *Parasitol Res*. 105:1399–1409.
- Forattini OP. 2002. *Culicidología Médica*. São Paulo, Brazil. Universidade de São Paulo. Vol II. Pag 30.

- Foster WA, Walker ED. 2002. Mosquitoes (Culicidae). In Mullen, G., Durden, L. (Eds.) *Medical and Veterinary Entomology* (p 203-262). Academic press, Sand Diego, CA. 597 pp.
- Franco- Agudelo S. 1997. Violencia y Salud en Colombia. *Rev Panam Salud Publica* vol.1 n.2.
- Gargan TP, Bailey CL, Higbee GA, Gad A, El Said S. 1983. The effect of laboratory colonization on the vector-pathogen interactions of Egyptian *Culex pipiens* and Rift Valley fever virus. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 32 (5): 1154-1163.
- Geissbühler Y, Kannady K, Chaki P, Killeen, G. 2009. Microbial Larvicide application by a Large-Scale, Community-Based Program Reduces Malaria Infection Prevalence in Urban Dar Es Salaam, Tanzania. *PLoS ONE*. 4(3): e5107.
- Georghiou GP Y Wirth MC. 1996. Influence of Exposure to single versus multiple Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israeliensis* on Development of resistance in the Mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*. P. 1091-1101.
- Gheeta y Manonmani. 2007. Mosquito pupicidal toxin production by *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis*. *Biological Control*. 44 (2): 242-247.
- Gheeta y Manonmani Surfactin: a novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its pupicidal efficacy. 2010. *Letters in Applied Microbiology*. 51(4): 406-412. Octubre.
- Goéz-Rivillas Y, Taborda N, Díaz JF, Góngora A, Rodas JD, Ruíz J, Osorio J. Antibodies to West Nile virus in equines of Antioquia and meta, Colombia, 2005-2008. 2010. *Rev. Col. de Ciencias Pecuarias*. 23:462-470.
- Gómez-Dantés H, Ramsey J. 2009. Dengue in the Americas: Challenges for prevention and control. *Cad Saúde Publica*. 25. Sup 1:S19-S31.
- González RJ, Preest MR. 1999. Ionoregulatory specialization for exceptional tolerance of ion poor, acidic waters in the Neon tetra

(*Paracheirodon innesi*). *Physiological and Biochemical Zoology*  
Vol. 72, No. 2

- Griego VM, Spence KD. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* Spores by Ultraviolet and visible light. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 35: 906-910.
- Gubler DJ. 2004. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*;27(5):319-30.
- Hancock PA, Thomas MB, Godfray HCJ. 2008. An age structured model to evaluate the potential of novel malaria-control interventions: a case study of fungal biopesticide sprays. *Proc Biol Sci*. 276. 71-80.
- Hardin J, Jackson F. 2009. Applications of natural products in the control of mosquito-transmitted diseases. *African Journal of Biotechnology*. Vol 8 (25), pp7373-7378.
- Harbach R Y Howard TM. 2007. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae) *Journal of the European Mosquito Control Association European Mosquito Bulletin*, 23 (2007), 1-66. ISSN1460-6127.
- Harbach R. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*. 1668:591–638.
- Hatoum R, Labrie S, Fliss I. 2012. . Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. *Ron Microbiol*. 3: 421.
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. 2005. "Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease". *Emerging Infect. Dis*. 11 (8): 1167–73.
- Hemingway J y Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*. 45:371-91.
- Higa T y Parr J. 1994. Beneficial And Effective Microorganisms for a sustainable agriculture and environment. *International Nature Farming Research Center*.

Disponible en: [www.agriton.nl/higa.html](http://www.agriton.nl/higa.html)

- Higa, T. 1989. Effective Microorganisms: A Biotechnology for Mankind. First International Conference on Kyusei Nature Farming. University of the Ryukyus, Okinawa, Japan. Proceedings of the Conference. Thailand. Pg. 8 – 14.
- Hwang JS & Roam GD. 1994. Recovery and disposal of discarded tires in the Taiwan area. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 10 suppl:S52-5.
- Ibarra J, Rincón-Castro M, Galindo E, Patiño M, Serrano L, García R, Carrillo JA, Pereyra-Alfárez B, Alcázar-Pizaña A, Luna-Olvera H, Galán-Wong L, Pardo L, Muñoz-Garay C, Gómez I, Soberón M, Bravo A. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol 48, No 2. Pag 113 -120.
- Ingraham JI e Ingraham CA. 1998. Introducción a la Microbiología. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 713 p.
- Ishikawa E, Matsuki T, Kubota H, Makino H, Sakai T, Oishi K, Kushiro A, Fujimoto J, Watanabe K, Watanuki M, Tanaka R. 2013. Ethnic diversity of gut microbiota: Species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus *Bifidobacterium* in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects. *J Biosci Bioeng*. Publicación electronica disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23522670>
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Pascarella L, Parrella A. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *The Science of the total Environment*. 346(1-3):87-98.
- Jana BB y Chakrabarti L. 1997. Effect of manuring rate on in situ production of zooplankton *Daphnia carinata*. *Aquaculture*. Vol 156, Issues 1-2, Pág, 85-99.
- Jemec A, Tišler T, Drobne D, Sepčić C, Fournier D, Trebše P. 2007. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*. Vol 68, Issue 8, pág. 1408-1418.
- Joy TK, Arik JA, Corby-Harris V, Jhonson AA, Riehle MA. 2010. The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Gerontology*. Vol 45, 9. P. 685-690.

- Karimi O, Pena AS. 2003. Review Probiotics: Isolated bacteria strain or mixtures of different strains? Two different approaches in the use of probiotics as therapeutics. *Drugs Today*. 39(8):565-97.
- Kellen W, Clark TB, Lindegren J, Ho C, Rogoff M, Singer S. 2004. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 7, issue 4. P. 442-448.
- Khailova L, Mount-Patrick SK, Arganbright KM, Halpern M, Kinouchi T, Dvorak B. 2010. *Bifidobacterium bifidum* reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol*. 299(5): G1118-G1127.
- Knols B, Bukhari T, Farenhorst M. 2010. Entomopathogenic fungi as the next-generation control agents against malaria mosquitoes. *Future Microbiol*. 5 (3) 339-341.
- Knop NF, Asman SM, Reisen WK, Milby MM. 1987. Changes in the biology of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) associated with colonization under contrasting regimes. *Environ Entomol*. 16:405–414.
- Komar N, Clark GG. 2006. West Nile Virus Activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*. vol.19 no.2.
- Kolaczinski JH y Curtis CF. 2004. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 42, Issue 5, May 2004, Pag 697-706.
- Kramer DL. 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of fishes*. Vol 18, no.2
- Legner EF. 1995. Biological control of Diptera of medical and veterinary importance. *J Vector Ecol*. 20:59-120.
- LeBeaud D, Bashir F, King CH. 2011. Measuring the Burden of arboviral diseases: the spectrum of morbidity and mortality from four prevalent infections. *Population Health Metrics*. 9:1.
- Lester PJ, Pike AJ. 2003. Container surface area and water depth influence the populations dynamics of the mosquito *Culex pervigilans*



(Diptera: Culicidae) and its associated predators in New Zealand. *Journal of Vector Ecology*. 28 (2). Pag 267-274.

- Lilly DM y Stillvell RH. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147: 74 – 748.
- Liu N, Xu Q, Zhu F, Zhang L. 2006. Pyrethroid resistance in mosquitoes. *Insect Science*, 13: 159–166.
- Lorenz I, Beaty BJ, Aitken TH, Wallis GP, Tabachnick WJ. 1984. The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 33(4): 690- 694.
- Mahesh Kumar P, Murugan K, Kovendan K, Subramaniam J Amaresan D. 2012. Mosquito Larvicidal and pupicidal efficacy of *Solanum xanthocarpum* (Family: Solanaceae) leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against *Culex quinquefasciatus* Say (Dipter: Culicidae). *Parasitology Research*. 110(6):2541-2550.
- Marra P, Griffing S, Caffrey C, Kilpatrick A, McLean R, Brand C, Saito E, Dupuis A, Kramer L, Novak R. 2004. West Nile Virus and wildlife. *Bioscience*. 54, 393-402.
- Martens P, Hall L. 2000. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. *Perspectives*. Vol 6. No2. 103-109.
- Martin R, Langa S, Reviriego C, Marin ML, Xaus J, Fernandez L y Rodriguez JM. Universidad Complutense de Madrid. 2006. Capítulo 1: Bacterias Lácticas y Bifidobacterias como probióticos. En: Rodriguez JM. 2006. Microorganismos y salud: bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas. Editorial Complutense, S.A. Madrid.
- Mattar S, Komar N, Young G, Alvarez J, Gonzalez M. 2011. Seroconversion for West Nile and St Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.106 no.8
- McCaffery A, Nauen R. 2006. The Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): Public responsibility and enlightened industrial self-interest. *Outlooks on Pest Management*. Vol 17. No 1.11-14.
- McCafferty P, Provonsha A. 1983. Aquatic Entomology: The Fishermen's Guide and Ecologists' Illustrated Guide to Insects and Their Relatives (Crosscurrents), 448 p.

- Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano M, Parra B. 2006. Human and Mosquito Infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* Vol 74 no. 4. 678-683.
- Merritt RW, Dadd RH, Walker ED. 1992. Feeding behavior, natural food and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 349-376.
- Merenstein D, Murphy M, Fokar A, Hernandez RK, Park H, Nsouli H, Sanders ME, Davis BA, Niborski V, Tondu F, Shara NM. 2010. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Clin Nutr.* 64(7): 669–677.
- Miller BM, Bassler B. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology.* Vol 55. 165-199.
- Mireji PO, Keating J, Hassanali A, Mbogo CM, Nyambaka H, Kahindi S, Beier JC. 2007. Heavy metals in mosquito larval habitats in urban Kisumu and Malindi, Kenya, and their impact. *Ecotoxicol Environ Saf* 70: 147 – 153.
- Mittal PK. 2003. Biolarvicides in vector control: Challenges and prospects. *J Vector Borne Dis.* 40, 20-32.
- Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW, Rosenberg R. 2008. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Med* 5(3): e68. doi:10.1371
- Montoya-Lerma J, Solarte Y, Giraldo-Calderón G, Quiñones M, Ruiz-López F, Wilkerson R, González R. 2011. Malaria vector species in Colombia : a review. 2011. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.106 supl.1 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900028>
- Morales-Saldaña M. 2008. Evaluación de la actividad larvicida del Noni *Morinda citrifolia* Linneus (Rubiaceae) sobre el mosquito *Anopheles albimanus* Widemann (Diptera: Culicidae). *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle.* 9(1): 62-65.
- Mosquera M, Obregón R, Lloyd L, Orozco M, Peña A. 2010. Reflections on the extension of research education in health communication in the

programs of Dengue fever prevention and control. The case of Barranquilla (Colombia) *Investig. desarro.* vol.18 no.1.

- Munstermann LE. 1994. Unexpected Genetic consequences of colonization and inbreeding: Allozyme Tracking in Culicidae (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*. Volume 87, no 2. Pp 157 -164.
- Mulla MS, Darweseh HA, Zgomba M. 1990. Effect of some environmental factor son the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 15: 166- 175.
- Mukisa IM, Byaruhanga YB, Muyanja MBK, Aijuka M, Schüller RB, Sahlstrøm S, Langsrud T, Narvhus JA. 2012. Influence of Cofermentation by Amylolytic *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* Strains on the Fermentation Process and Rheology of Sorghum Porridge. *Appl Environ Microbiol.* 78(15): 5220–5228.
- Murugesan AG, Prabu S, Selvakumar C. 2008. Biolarvicidal Activity of Extracellular Metabolites of Keratinophilic Fungus *Trychophyton mentagrophytes* against Larvae of *Aedes aegypti* – a Major vector for Chikungunya and Dengue. *Folia Microbiol.* 54 (3), 213-216.
- Mwangangi JM, Kahindi SC, Kibe LW, Nzovu JG, Luethy P, Githure JI, Mbogo CM. 2011. Wide-scale application of Bti/Bs biolarvicide in different aquatic types in urban and peri-urban Malindi, Kenya. *Parasitol Res.* 108:1355-1363.
- Mwanziva C, Manjurano A, Mbugi E, Mweya C, Mkali H, Kivuyo MP, Sanga A, Ndaro A, Chambo W, Mkwizu A, Kitau J, Kavishe R, Dolmans W, Chilongola J, Mosha FW. 2011. Defining malaria burden from morbidity and mortality records, self treatment practices and serological data in Magugu, Babati District, northern Tanzania. *Tanzanian Journal of Health Research.* Vol 13. No 2
- Nair SC, Striepen B. 2011. What Do Human Parasites Do with a Chloroplast Anyway?. *PLoS Biol.* 9(8): e1001137.
- Neville CG, Some ES, Mung`ala OV, Muterni W, New L, Marsh K, Lengeler C, Snow RW. 1996. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Tropical Medicine & International Health.* 1(2): 139-46.

- Ocampo C y Wesson D. 2004. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71(4):506-13.
- Ocampo CB, Salazar-Terrerosa MJ, Minaa NJ, McAllister J, Brogdon W. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*. 118. 37–44.
- Oda T, Eshita Y, Uchida K, Mine M, Kurokawa K, Ogawa Y, Kato K, Tahara, H. 2002. Reproductive Activity and Survival of *Culex pipiens pallens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Japan at High Temperature. *Journal of Medical Entomology*. 39 (1): 185-190.
- Okumu FO, Knols BGJ, Fillinger U. 2007. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *MalariaJournal*. 6. 63.
- Omoya FO, Akinyosoye FA. 2011. Evaluation of larvicidal potency of some entomopathogenic bacteria isolated from insect cadavars on *Anopheles arabiensis* larvae in Nigeria. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research* 2 (3): 145, 148.

Disponibile en: <http://www.pharmscidirect.com/Docs/IJPBR-2011-03-59.pdf>

- OMS 2006. Report of the Scientific working group meeting on Dengue.
- O'Shaughnessy PT. 2008. Parachuting Cats and crushed eggs. The controversy over the use of DDT to control Malaria. *Am J Public Health*. 98(11): 1940–1948.
- Ospina MC, Diaz FJ, Osorio JE. 2010. Prolonged co-circulation of two distinct Dengue virus Type 3 lineages in the hyperendemic area of Medellin, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. Sep;83(3):672-8.
- Padilla JC, Álvarez G, Montoya R, Chaparro P, Herrera S. 2011. Epidemiology and Control of Malaria in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.106 supl.1 .
- Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David JP. 2010. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Management Science*. Vol 67. 122-128.
- Paskewitz, S. 2010. Species complexes: confusion in identifying the true vectors of malaria and other parasites. *Vector-Borne Diseases*: , The

Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks Ltd, London  
(Disponible en línea en <http://hstalks.com/bio>)

- Perich MJ, Rogers JT, Boobar LR. 1987. Efficacy of Arosurf MSF and formulations of *Bacillus thuringiensis* var *israeliensis* against *anopheles albimanus*: Laboratory bioassay. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 3(3):485-488.
- Perry M, Venners S, Barr D, Xu, X. 2007. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. *Reproductive Toxicology*. Volume 23, Issue 1, Pages 113-118.
- Pimentel D, Acquay H, Biltonen M, Rice P, Silva M, Nelson J, Lipner V, Giordano S, Horowitz A, D'Amore M. 1992. Environmental and Economic Cost of Pesticide Use. *BioScience*. Vol 42, N° 10, pp. 750-760.
- Prothero RM. 1977. Disease and mobility: a neglected factor in Epidemiology. *International Journal of Epidemiology*. Vol 6. 259-267.
- Rachou R, Lyons G, Moura-Lima M, Kerr A. 1965. Synoptic epidemiological studies of malaria in El Salvador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 14:1-62.
- Ragonha de Oliveira S; Baptista de Souza RTT; Santiago Nunes E; Melo de Carvalho CS; Cruz de Menezes G; Marcon JL; Roubach R; Akifumi Ono E; Gusmão Affonso E. 2008. Tolerance to Temperature, pH, ammonia and nitrite in cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, an Amazonian ornamental fish. *Acta Amaz*. vol.38 no.4
- Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K. 2008. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 102: 867-873.
- Ramírez VG, Alonso de Gorustovitch M, Gómez S, García N. 1999. Registros de *Culex* en un río urbano de Salta, Argentina. *IDESIA*. Vol 17.
- Raso J, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. 1998. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 44; 125-132.
- Ritchie S, Rapley S, Benjamin S. 2010. *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82(6):1053-9.

- Rivas F, Díaz LA, Cádenas VM, Daza E, Bruzon L, Alcalá A, De la Hoz O, Cáceres FM, Aristizabal G, Martínez JW, Revelo D, De la Hoz F, Boshell J, Camacho T, Calderón L, Olano VA, Villareal LL, Roselli D, Alvarez G, Ludwig G, Tsai T. 1997. Epidemic Venezuelan Encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. *J Infect Dis.* 175 (4). 828-832.
- Roberts D. 1996. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Breeding in Brackish Water: Female Ovipositional Preferences or Larval Survival?. *Journal of Medical Entomology.* Volume 33, Number 4, July 1996 , pp. 525-530(6)
- Rodrigo-Simón A, de Maagd RA, Avilla C, Bakker PL, Molthoff J, González-Zamora JE, Ferré J. 2006. Lack of Detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea* : A Toxicological, Histopathological, and Biochemical Analysis. *Appl Environ Microbiol.* 72 82). 1595-1603.
- Rodríguez C, Medici M, Mozzi F, Font de Valdez G. 2010. Therapeutic effect of *Streptococcus thermophilus* CRL 1190- fermented milk on chronic gastritis. *World J Gastroenterol.* 16(13):1622-1630.
- Rojas E. Accesado en 2013. Caracterización de criaderos de *Anopheles spp.* Del Noroccidente de Venezuela. *Ambiente Ecológico.* Disponible en: <http://www.ambiente-ecologico.com/revist56/erojas56.htm>.
- Rojas-Gil Y, y Brochero H. 2008. Hallazgo de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762), en el casco urbano del corregimiento de La Pedrera, Amazonas, Colombia. *Biomédica.* Vol 28 N°4.
- Rúa-Uribe G, Acosta Suarez C, Londoño V, Sanchez J, Rojo R, Bello Novoa B. 2011. Primera evidencia de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Medellín, Antioquia – Colombia. *Rev. Salud Pública de Medellín.* Vol 5. Enero-Junio 2011.
- Ruiz F, Quiñones ML, Erazo FH, Calle DA, Alzate JF, Linton YV. 2005. Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorynchus) benorrachi* and *An. (N.) oswaldoi* from southern Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Vol 100. No2.
- Sachs J y Malaney P. 2002. The Economic and social burden of Malaria. *Nature.* 416 (6881): 581.
- Sadanandane C, Boopathi Doss P.B, Jambulingam P, Zaim M. Efficacy of two formulations of the bioinsecticide Spinosad against *Culex quinquefasciatus* in India. 2009. *Journal of the American Mosquito Association.* 66-73.

- Salgado MD, Panqueba CD, Vega RM, Garzón M, Castro D. Mortalidad por Dengue Hemorrágico en niños en Colombia: más allá del choque. 2008. *Infectio*. Vol 12 -1.
- Santacoloma-Varon L, Chaves-Cordoba B, Brochero HL. 2010. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Rev Panameña de Salud Publica*. 27(1):66–73.
- Sardelis MR, Turell MJ, Dohm DJ, O`Guinn ML. 2001. Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 7(6):1018-22.
- SCD Probiotics. 2010. Case study summary Roatan Honduras. Disponible en:  
[http://www.scdprobiotics.com/v/vspfiles/assets/images/Vector\\_Control.pdf](http://www.scdprobiotics.com/v/vspfiles/assets/images/Vector_Control.pdf)
- SCD Probiotics. 2011. Página Web. Case Studies. Accesado el 12 de Diciembre de 2011. Disponible en :  
[http://www.scdprobiotics.com/SCD\\_Probiotics\\_Case\\_Studies\\_s/365.htm](http://www.scdprobiotics.com/SCD_Probiotics_Case_Studies_s/365.htm)
- Schofield CL. 1976. Acid Precipitation: effects on fish. *Ambio*. Vol. 5, No 5/6.
- Scholte EJ, Knols Bart, Takken W. 2005. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 91, Issue 9, .Pag, 43-49.
- Seawright JA, Kaiser PE, Narang SK. 1991. A unique chromosomal dimorphism in species-A and species-B of the *Anopheles quadrimaculatus* complex. *J Hered.*;82:221–227.
- Self LS, Pant CP. 1966. Insecticide susceptibility and resistance in populations of *Anopheles gambiae*, *Culex fatigans*, and *Aedes aegypti* in Southern Nigeria. *Bull World Health Organ*. 1966; 34(6): 960–962.
- Serafini M. 2001. NY State Department of Environmental Conservation. Comunicación Oficial. Consultado en Mayo 10 de 2013.  
Disponible en: [http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/aceticacid-etridiazole/bacillus\\_subtilis/bacillus\\_label\\_401.html](http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/aceticacid-etridiazole/bacillus_subtilis/bacillus_label_401.html)
- Shaalan E, Canyon D, Faried Younes M, Abdel-Wahab H, Abdel-Hamid M. 2005. A Review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment International*. Volume 31, issue 8, p 1149-1166.
- Shaw J, Pfrender M, Eads B, Klaper R, Callaghan A, Sibly R, Colson I, Jansen B, Gilbert D, Colbourne J. 2008. *Daphnia* as an emerging model

for toxicological genomics. *Advances in Experimental Biology*. Vol 2, Pág. 165-219.

- Sherratt TN, Church SC. 1994. Ovipositional preferences and larval cannibalism in the neotropical mosquito *Trichoprosopon digitatum* (Diptera: Culicidae). *Animal Behaviour*. Vol 48. Pag. 645-652.
- Shrivastava, S. Reddy PB, Singh S. 2011. Impact of Carbaryl on Blood Protein and Glucose Content of a Freshwater Fish *Heteropneustes fossilis*. *Nature, Environment and Pollution Technology*. Vol 10. 1. 67-68.
- Singh G, Prakash S. 2009. Efficacy of *Bacillus sphaericus* against larvae of malaria and filarial vectors: an analysis of early resistance detection. *Parasitology Research*. Vol 104, n.4, Pág. 763-766.
- SIVIGILA 2011a. Comportamiento de la Malaria en Colombia según los casos notificados al SIVIGILA durante 2010. Corte 2 febrero 2011. Grupo ETV, Instituto Nacional de Salud, Bogota, 5 pp.
- SIVIGILA 2011b. Sistema de vigilancia epidemiológica. *Boletín vigilancia de la malaria en Colombia 52*: 12.
- Soekiman, Soedarto, Machfudz, Subagyo, Adipoetro S, Yamanishi H, Matsamura T. 1984. Comparative studies on the biology of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a room condition. *ICMR Annals*, Vol 4 pages 143-152.
- Solano-Aguilar G, Dawson H, Restrepo M, Andrews K, Vinyard B, Urban JF. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of Sows and their Piglets. 2008. *Appl Environ Microbiol*. 74 (20):6338-6347.
- Styer LM, Carey JR, Wang JL, Scott TW. 2007. Mosquitoes do Senesce: departure from the paradigm of constant mortality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol 76. 111-117.
- Teo D, Ng LC, Lam S. 2009. Is dengue a threat to the blood supply?. *Transfusion Medicine*. 19(2):66-77.
- Thomas M. Clark, Benjamin J. Flis y Susanna K. Remold. 2004. pH tolerances and regulatory abilities of freshwater and euryhaline Aedine mosquito larvae. *Journal of Experimental Biology*. 207.



- Tikar S N, Mendki MJ, Sharma A K, Sukumaran D, Veer V, Prakash S, Parashar B D. Resistance Status of the Malaria Vector Mosquitoes, *Anopheles stephensi* and *Anopheles subpictus* Towards Adulticides and Larvicides in Arid and Semi-Arid Areas of India. 2011. *Journal of Insect Science* 11(85): 1-10. 2011 doi: 10.1673/031.011.8501.
- Tolle MA. 2009. Mosquito-borne Diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 39: 97-140.
- Van Dyk JC, Bouwman H, Barnhoorn IEJ, Bornman MS. 2010. DDT contamination from indoor residual spraying for malaria control. *Science of the total environment*. Vol 408. I 13. Pag. 2745-2752.
- Vallejo F, González A, Posada A, Restrepo A, Orduz S. 1999. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp Medellín by batch and fed batch culture. *Biotechnology Techniques*. Vol 13. 4. pag. 279-281.
- Vesga-Gómez C, Cáceres-Manrique F de M. 2010. Eficacia de la educación lúdica en la prevención del dengue en escolares. *Rev. Salud Publica*. Vol12. N°4.
- Villar LA. 2011. Dengue: un reto para el estado, la comunidad científica y el conjunto de la sociedad colombiana. *Infectio*. 15 (1) 5-7.
- Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS, Pinedo-Cancino V, Patz JA. 2006. The effect of deforestation on human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *Falciparum malaria* in the Peruvian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75: 3-11.
- Vittor AY, Pan W, Gilman R, Tielsch J, Glass G, Shields T, Sánchez-Lozano W, Pinedo V, Salas-Cobos Erit, Flores S, Patz J. 2009. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 81(1):5-12.
- Vyas N, Dua KK, Prakash S. 2007. Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organisms. *Parasitology Research*. 101(2): 385-90.
- WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.
- Welch EV. 1939. Insects Found on aircraft at Miami, Fla., in 1938. *Public Health Reports*. Vol 54. N° 14.

- Weaver RH. 1932. Studies on *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* II. Electrophoresis Studies. *J Bacteriol.* 24(1): 73–83.
- WHO. 2003. Factors that affect the success and failure of Insecticide Treated Net Programs for malaria control in SE Asia and the Western Pacific.

Disponible en: [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/itn\\_r62.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/itn_r62.pdf)

- WHO. 2009. Dengue Guidelines for Diagnosis, treatment, Prevention and Control.

Disponible en:




[http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

- WHO. 2011. Yellow Fever Fact Sheet N° 100.  
Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>
- Wilton, D. 1968. Oviposition site selection by the three-hole mosquito, *Aedes triseriatus* (SAY). *Journal of Medical Entomology*, Volume 5, Number 2, 10 June 1968 , pp. 189-194(6)
- Winch PJ, Leontsini E, Rigau-Perez JG, Ruiz-Perez M, Clark GG, Gubler DJ. 2002. Community-based dengue prevention programs in Puerto Rico: impact on knowledge, behavior, and residential mosquito infestation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 67(4):363-70.
- Wirth MC, Walton WE, Federici BA. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Restores Toxicity of *Bacillus sphaericus* Against Resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology.* 37(3):401-407.
- Woodbridge AF. 1994. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual Reviews Entomology.* 40: 443-74.
- Wolff M. Insectos de Colombia. Guía básica de Familias. 2006. Multimpresos Ltda.
- Xu-xia Zhou, Yuan-jiang Pan, Yan-bo Wang, Wei-fen Li. 2007. In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J Zhejiang Univ Sci B.* 8(9): 686–692. doi: 10.1631/jzus.2007.B0686.

- Yee D, Kesavaraju B, Juliano S. 2004. Larval feeding behavior of three co-occurring species of container mosquitoes. *J Vector Ecol.* December; 29(2): 315–322.
- Yee DA, Juliano SA. 2007. Abundance matters: a field experiment testing the more individuals hypothesis for richness-productivity relationships. *Oecologia.* 153(1):153-62.
- Yee DA, Kneitel JM, Juliano SA. 2010. Environmental Correlates of Abundances of Mosquito Species and Stages in Discarded Vehicle Tires. *J Med Entomol.* 47(1): 53–62.

## 11. Anexos

### ANEXO 1.

ANEXO 1.							
 					<b>Seguimiento de Experimentos Probióticos (Fisicoquímicos)</b>		
Tratamiento	pH Inicial	pH Final	Conductividad Inicial	Conductividad Final	Concentración O2 Inicial	Concentración O2 Final	
R1-10%							
R2-10%							
R3-10%							
R4-10%							
Control 10							
R1-12%							
R2-12%							
R3-12%							
R4-12%							
Control 12							
R1-14%							
R2-14%							
R3-14%							
R4-14%							
Control 14							
R1-16%							
R2-16%							
R3-16%							
R4-16%							
Control 16							

ANEXO 2



**Seguimiento de Experimentos Cultivos Probióticos**



Tratamiento	Larvas vivas	Larvas muertas	Pupas vivas	Pupas muertas	Adultos
R1-10%					
R2-10%					
R3-10%					
R4-10%					
Control 10					
R1-12%					
R2-12%					
R3-12%					
R4-12%					
Control 12					
R1-14%					
R2-14%					
R3-14%					
R4-14%					
Control 14					
R1-16%					
R2-16%					
R3-16%					
R4-16%					
Control 16					

**Lista de microorganismos probióticos  
presentes en el cultivo madre**

*Bacillus subtilis var natto*

*Bifidobacterium animalis*

*Bifidobacterium bifidum*

*Bifidobacterium longum*

*Lactobacillus acidophilus*

*Lactobacillus bulgaricus*

*Lactobacillus casei*

*Lactobacillus delbrueckii*

*Lactobacillus fermentum*

*Lactobacillus plantarum*

*Lactococcus lactis*

*Lactococcus lactus* subsp. *diacetylactis*

*Rhodopseudomonas palustris*

*Rhodopseudomonas sphaeroides*

*Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces thermophilus*