

CARACTÉRISATION DE SOUCHES DE *BACILLUS* ENTOMOPATHOGENES ISOLEES AU SENEGAL ET ETUDE DE LEUR TOXICITE POUR LES VECTEURS DU PALUDISME

AÏDARA-KANE A., FONTENILLE D., LOCHOUARN L., COSMAO-DUMANOIR V. et LECADET M.

AÏDARA-KANE A., FONTENILLE D., LOCHOUARN L., COSMAO-DUMANOIR V. et LECADET M. - Caractérisation de souches de *Bacillus* entomopathogènes isolées au Sénégal et étude de leur toxicité pour les vecteurs du paludisme

Dakar-Médical, 1998, 43, 2, 170-173.

Accepté le 08 Juin 1998.

AÏDARA-KANE A., FONTENILLE D., LOCHOUARN L., COSMAO-DUMANOIR V. et LECADET M. - Screening of locally isolated entomopathogenic *Bacillus* in Senegal for toxicity to malaria vectors.

Dakar-Médical, 1998, 43, 2, 170-173.

Accepted June 08th, 1998.

Résumé :

Notre étude porte sur la recherche des nouvelles souches de *Bacillus* entomopathogènes susceptibles d'être utilisées dans la lutte contre les insectes vecteurs du paludisme au Sénégal.

194 souches de *Bacillus thuringiensis* et 9 souches de *Bacillus sphaericus* ont été isolées de l'environnement ou d'insectes. Le typage flagellaire, l'analyse du profil électrophorétique des protéines cristallines et les bioessais sur insectes ont permis d'isoler 27 souches actives sur moustiques (*Culex pipiens*, *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi*). Le paludisme étant un problème majeur de santé publique au Sénégal, la toxicité de ces souches a été recherchée vis à vis des 2 principaux vecteurs du paludisme au Sénégal, *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis*. Ceci nous a permis de mettre en évidence parmi ces 27 souches, 20 souches ayant un niveau d'activité comparable à celui de *Bacillus thuringiensis israelensis* qui est actuellement la souche la plus active sur moustiques. Ces souches ont des DL50 autour de 10⁻⁶ pour *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* et 70% d'entre elles sont du sérotype H14. Elles peuvent être retenues comme candidates à la lutte biologique contre les vecteurs du paludisme au Sénégal.

Mots-clés : *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, Delta endotoxine, Bioessais, Paludisme, Sénégal.

Summary :

A screening program developed in Senegal to isolate new strains of entomopathogenic *Bacillus* has led to the isolation of 194 strains of *Bacillus thuringiensis* and 9 strains of *Bacillus sphaericus* from various sites and insect samples. The characterization of these strains regarding their H serotype, their crystal composition and their toxicity against mosquitoes (*Culex pipiens*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*) has led to the isolation of 27 mosquitocidal strains. As malaria is an important public health problem in Senegal, these strains were more completely characterized looking for their toxicity against the two major malaria vectors in Senegal : *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*.

Key-words : *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, delta endotoxin, bioassays, malaria, Senegal.

INTRODUCTION

En l'absence de vaccin efficace et compte tenu de l'apparition de phénomènes de résistance aux médicaments chez de nombreux agents infectieux, la lutte anti-vectorielle est un complément intéressant pour combattre certaines maladies tropicales telles que le paludisme. La lutte biologique contre les insectes vecteurs de maladies présente de nombreux avantages par rapport aux insecticides chimiques parmi lesquels on peut citer l'absence de toxicité pour les organismes non cibles et pour l'environnement et l'apparition tardive voire l'absence de phénomènes de résistance.

Parmi les bactéries entomopathogènes, *Bacillus thuringiensis* (B.t.) et *Bacillus sphaericus* (B.s.) ont été les espèces les plus largement utilisées comme biopesticides. La souche de référence pour l'activité entomopathogène sur moustiques est *Bacillus thuringiensis israelensis* [10] dont l'activité insecticide repose sur la présence d'une inclusion cristalline appelée delta endotoxine ou « cristal » qui comprend 4 polypeptides majeurs : Cry4A, Cry4B, Cry11A et Cyt1A ayant des poids moléculaires respectifs de 125, 135, 68 et 28-kDa [5].

Le but de notre travail est de rechercher des souches de *Bacillus* entomopathogènes autochtones susceptibles d'être utilisées dans la lutte biologique contre les insectes vecteurs du paludisme au Sénégal. Les souches ont été isolées à partir du sol et d'insectes morts puis elles ont fait l'objet d'une caractérisation complète comprenant l'étude des protéines cristallines, le typage flagellaire et les bioessais sur moustiques.

MATERIEL ET METHODES

1. ISOLEMENT DES SOUCHES

Les échantillons de sol proviennent de différentes régions écologiques et géographiques du Sénégal. Les insectes ont été capturés au piège lumineux et proviennent essentiellement de la région du Sénégal Oriental et de Barkedji (zone sahélienne : 15° 17' Nord, 14° 53' Ouest)

Correspondance : AÏDARA-KANE A., Laboratoire de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

* Laboratoire de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal
** Laboratoire d'Entomologie Médicale, ORSTOM, Dakar, Sénégal
*** Unité des Bactéries Entomopathogènes, Institut Pasteur de Paris, France



a. Isolement des *Bacillus entomopathogènes* à partir d'insectes

Les insectes sont répartis par lots homogènes (Scarabaeidae, Staphilinidae, Scolytidae, Hymenoptera, Mordellidae, Microlépidoptères) d'environ 10 grammes. Le nombre d'insectes par lot est variable et dépend de la taille des insectes. Les lots sont séchés puis écrasés avec du sable stérile. Environ 3g de cette mixture sont suspendus dans 5 ml d'eau distillée stérile, incubés à température ambiante pendant au moins deux heures et filtrés sur une fine couche de coton hydrophile. Le filtrat est chauffé à 85°C pendant 10 minutes, étalé sur deux boîtes de milieu HCT (Hydrolysate de Caséine Tryptone) pour l'isolement de *Bacillus thuringiensis* [12] et deux boîtes de milieu MBS (Milieu *Bacillus sphaericus*) pour l'isolement de *Bacillus sphaericus* [11] qui sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 heures.

b. Isolement de *Bacillus entomopathogènes* à partir du sol

Pour isoler B.t. du sol qui est un produit plurimicrobien, nous utilisons la méthode sélective de Travers et al. [19]. 1g du prélèvement est ajouté à 10 ml de milieu HCT tamponné avec de l'acétate de sodium à la concentration finale 0,25 M, puis incubé à 30°C sous agitation. L'addition d'acétate de sodium à cette concentration empêche la germination des spores de B.t. contenues dans l'échantillon et favorise la germination des autres spores. Après décantation, la phase supérieure de la suspension est transférée dans un tube à essai, chauffée à 85°C pendant 10 minutes et ensemencée sur boîtes de milieu HCT gélosé. Une incubation pendant au moins 48 heures permet la germination des spores de B.t., la plupart des espèces indésirables ayant été éliminées.

Pour la recherche de *Bacillus sphaericus*, la sélection par l'acétate de sodium n'est pas nécessaire, le filtrat chauffé est étalé sur deux boîtes de milieu MBS.

2. CARACTERISATION DES SOUCHES

Après les observations microscopiques, seules les souches renfermant des inclusions cristallines sont retenues pour la suite des essais : détermination du sérotype, du profil électrophorétique des protéines et bioessais sur moustiques.

a. Observations microscopiques

L'aspect morphologique des bactéries, des spores et des cristaux est observé avec un microscope à contraste de phase.

Nous avons également utilisé la technique de coloration décrite par Sharif et al. [17] pour mettre en évidence les cristaux. Les frottis sont colorés avec une solution de bleu de Coomassie (0,25% bleu de Coomassie, 50% éthanol, 7% acide acétique) pendant 3 minutes, lavés à l'eau distillée, séchés et observés au microscope. Avec cette méthode, les cristaux libérés sont colorés en violet et se distinguent facilement des spores qui sont incolores et de forme ovale ou ronde selon l'espèce en cause; les cellules végétatives apparaissent comme des bâtonnets colorés en violet.

b. Tests sérologiques

Les antisera nécessaires pour le typage flagellaire ont été aimablement fournis par l'unité des bactéries entomopathogènes de l'Institut Pasteur de Paris. Ils ont été préparés selon la méthode décrite par de Barjac [1] et permettent d'identifier les sérovars de B.t. selon la classification de de Barjac et Franchon [3]. Des bactéries très mobiles, sélectionnées par passage en tubes de Craigie sont utilisées pour le typage flagellaire.

L'identification des antigènes H se fait par agglutination en tubes, ou en plaques ELISA pour la microméthode, en utilisant un bouillon de culture de 4 à 5 heures des bactéries sélectionnées en tubes de Craigie. 34 sérotypes de *Bacillus thuringiensis* et 48 sérotypes de *Bacillus sphaericus* sont recherchés.

c. Caractérisation des protéines cristallines par électrophorèse

Les souches de B.t. sont cultivées sur milieu HCT additionné de glucose à la concentration finale de 0,3%, et incubées pendant 3 à 4 jours sous agitation. Les cultures sont centrifugées à 10000 g pendant 15 minutes pour recueillir les spores et les cristaux. Les préparations spores + cristaux sont lavées avec du NaCl 0,5 M puis deux fois avec de l'eau distillée additionnée de phénylméthyl sulfonyle fluoride (PMSF) à la concentration finale 10^{-3} M afin d'éliminer les débris cellulaires et d'inactiver les protéases adsorbées [13].

La caractérisation des cristaux se fait par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) en utilisant un gel à 10% de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur selon la technique de Thomas et Ellar [18]. On inclut dans le gel des protéines de poids moléculaires connus. Les profils obtenus sont comparés à ceux de souches entomopathogènes connues.

d. Bioessais sur moustiques

Les premiers essais de toxicité sur moustiques ont été réalisés sur *Culex pipiens* (souche Montpellier), *Aedes aegypti* (souche Bora Bora) et *Anopheles stephensi* (souche ST15).

Nous avons ensuite réalisé avec les souches ayant montré une activité significative sur ces trois espèces, des bioessais sur *An. gambiae* (souche Bobo Dioulasso) et *An. arabiensis* (souche Dakar).

Les bioessais ont été réalisés avec la culture totale après libération des spores et des cristaux. 25 larves de moustiques sont introduites dans 150 ml de la dilution à tester selon la méthode décrite par de Barjac et Thlery [2]. *Aedes aegypti* et *Culex pipiens* sont pris au stade L4; *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* sont pris au stade L3. Chaque dilution est testée en double, ce qui permet d'avoir la mortalité sur 50 larves. Nous faisons une présélection en testant les dilutions 10^{-2} et 10^{-5} ; si on obtient 100% de mortalité à 10^{-5} , on continue les dilutions jusqu'à 10^{-7} . Un contrôle est réalisé avec de l'eau distillée. Les DL50 et DL90 (doses léthales entraînant respectivement la mort de 50% et 90% des larves initialement présentes) sont déterminées à l'aide d'un programme informatique. Elles sont comparées à celles de B.t.i. (souche 1884) qui est actuellement la souche la plus active sur moustiques.

RESULTATS

242 prélèvements de sol et 154 lots d'insectes ont été analysés et ont permis d'obtenir 203 isolats de *Bacillus entomopathogènes*. Les échantillons de sol ont permis d'obtenir 136 isolats de *B. thuringiensis* et 9 isolats de *B. sphaericus*. 58 isolats de *B. thuringiensis* ont été obtenus à partir d'insectes.

Sur les milieux utilisés *B. thuringiensis* se présente sous forme de larges colonies blanches au centre déprimé, de type plutôt rugueux. *B. sphaericus* se présente sous forme de petites colonies beiges ayant tendance à la confluence.

L'observation des souches de B.t. au microscope à contraste de phase montre des chaînettes de 2, 4 ou parfois 8 bactéries; chaque bactérie contenant à l'un des pôles une spore réfringente, ovale, non déformante et, éventuellement, à l'autre pôle une ou plusieurs inclusions présentant une réfringence plus discrète. Les cristaux observés sont le plus souvent losangiques, rarement sous d'autres formes: cubiques, rectangulaires, parallélépipédiques voire arrondis. Dans certains cas, nous avons observé une inclusion cristalline accolée à la spore et apparemment indissociable de celle-ci. *Bacillus sphaericus* renferme quant à lui une spore ronde subterminale déformante; certaines de nos souches renferment une ou plusieurs inclusions cristallines parasporales.

Après coloration, nous avons observé des cristaux colorés en violet aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des bactéries mais la forme des cristaux est moins nette qu'en contraste de phase.

Le typage flagellaire a pu être effectué pour 142 souches. La répartition de ces souches par sérotype, sérovar et source d'isolement est donnée au tableau I.

La détermination de l'antigène H n'a pu être réalisée pour 52 souches sur 194; parmi ces souches 36 sont autoagglutinables et 16 sont immobiles.

Au total 27 souches ont montré une activité significative sur moustiques mais à des niveaux différents. Les souches ayant une activité significative (tableau II) sur moustiques (DL50 comprise entre 10^{-6} et 10^{-4}) appartiennent le plus souvent au sérotype H14 (16/20), et plus rarement aux sérotypes H12 (1/20), H10a10b (1/20) et H7 (1/20). D'autres sérotypes ont montré une activité significative sur *Culex pipiens* et une activité moyenne à faible sur *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi* (DL50 comprise entre 10^{-4} et 10^{-3}); il s'agit des sérotypes H8a8b (n=2), H12 (n=2) et H10a10b (n=1). Notons que trois souches autoagglutinables se sont révélées très actives (n=1) ou moyennement actives (n=2) sur moustiques.

Les 9 souches de *Bacillus sphaericus* isolées appartiennent aux sérotypes H1 (n=6) et H5 (n=3). N'ayant pas présenté une activité vraiment significative sur moustiques malgré la présence d'inclusions, elles n'ont pas fait l'objet d'études plus poussées.

L'étude du profil électrophorétique des protéines cristallines par SDS-PAGE montre que les souches très actives sur moustiques ont un cristal composé des 4 polypeptides de 135, 125, 65 et 28 kDa déjà décrits chez *Bacillus thuringiensis israelensis*. Les souches moyennement actives ont seulement soit les polypeptides de 135 et 65 kDa soit les polypeptides de 125 et 28 kDa ou encore des constituants nouveaux. Les souches inactives ou faiblement actives ont un profil atypique avec des bandes multiples.

Tableau I :
Sérotypes, sérovirs et source d'isolement des souches de *Bacillus thuringiensis* sérotypables

sérotype/sérovar	sol	insectes	total
H7 / alzawai	19	7	26
H14 / israelensis	18	9	25
H12 / thompsoni	15	7	22
H17 / tohokuensis	12	4	16
H3a3b3c / kurstaki	10	2	12
H8a8b / morrisoni	4	8	12
H24 / neoneolenalis	7	4	11
H10a10b / darmstadtensis	4	4	8
H1 / thuringiensis	1	1	2
H11a11c / kuyushuensis	2	0	2
H13 / pakistani	2	0	2
H16 / dakota	1	1	2
H28 / montary	1	0	1
H20a20b / yunnanensis	1	0	1
Total souches sérotypables	95	47	142

Tableau II :
résultats des bioessais sur moustiques des souches montrant une activité

Sérotype	Sérovar	Cx. pipiens	Ae. aegypti	An. stephensi	Ae. gambiae	An. arabiensis	H10
H14	israelensis	+++	+++	+++	++	++	14
H14	israelensis	+++	+++	++	++	++	2
H12	thompsoni	+++	++	++	++	++	1
H12	thompsoni	+++	++	++	++	++	2
H10a10b	darmstadtensis	+++	+++	++	++	++	1
H10a10b	darmstadtensis	+++	+++	++	-	-	1
H7	alzawai	+++	+++	++	++	++	1
H8a8b	morrisoni	+++	++	++	++	++	2
AA'		+++	+++	+++	++	++	1
AA''		++	++	++	++	++	2

+++ : $10^{-6} < DL50 < 10^{-5}$ (DL50 exprimées en dilution de culture)

++ : $10^{-5} < DL50 < 10^{-4}$

+ : $5.10^{-5} < DL50 < 10^{-4}$

* : Auto-agglutinable

DISCUSSION

La lutte biologique contre les insectes a d'abord été appliquée au domaine agricole avec la lutte contre les insectes ravageurs des cultures. Ce n'est qu'avec la découverte, en Israël par Goldberg et Margalit [10], de *Bacillus thuringiensis israelensis* actif sur moustiques et simulies que cette bactérie a commencé à susciter de l'intérêt pour le domaine médical. L'utilisation la plus importante à grande échelle de B.t.i. pour la lutte anti-vectorielle a sans doute été celle faite dans le cadre du programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Est. En effet, à partir de 1975, B.t.i. a été utilisé pendant une dizaine d'années pour la destruction de populations larvaires de simulies impliquées dans la transmission de la maladie. *Bacillus sphaericus* est peu actif sur *Anopheles* et *Aedes*, mais il a été utilisé au Cameroun pour la destruction de larves de *Culex quinquefasciatus* vectrices de la filariose.

Au Sénégal des travaux antérieurs ont permis d'étudier les espèces d'anophèles distribuées dans l'ensemble du pays et de déterminer celles d'entre elles qui ont une importance épidémiologique dans certaines maladies telles que le paludisme ou la filariose de Bancroft [7].

Après de nombreuses missions de prospection et de suivi des populations d'*Anopheles* du complexe gambiae dans plusieurs régions du Sénégal, la détermination des espèces a été faite par la technique de PCR; le comportement trophique et les taux d'infestation par des *Plasmodium* ont également été étudiés par test ELISA [8, 14]. Si on veut préconiser des méthodes de lutte, éventuellement par des bactéries entomopathogènes, ces données sont nécessaires pour connaître l'importance vectorielle

de chaque espèce dans un contexte donné. Ces travaux ont montré que les principaux vecteurs du paludisme au Sénégal sont *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis*.

Notre étude a montré, à l'instar d'autres [6, 15], qu'il n'y a pas de corrélation absolue entre le sérotype et le pathotype [16] bien que le sérotype H14 soit le sérotype le plus souvent associé à une toxicité sur moustiques. Un certain nombre de nos souches (n=20) se révèlent être de bons candidats à la lutte biologique contre les 2 espèces d'*Anopheles* du complexe *gambiae* qui sont impliquées dans la transmission du paludisme au Sénégal à savoir *An. gambiae* et *An. arabiensis*.

Le clonage et l'expression des gènes codant pour les 4 polypeptides de B.t.I.; séparément ou en combinaison ont montré que ces polypeptides agissent en synergie [4,5] et que le délai d'apparition des phénomènes de résistance est inversement proportionnel au nombre de polypeptides entrant dans la composition de la delta endotoxine [9]. La découverte de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* entomopathogènes renfermant d'autres protéines cristallines permettrait par conséquent de lutter contre l'apparition de ces phénomènes de résistance aux biopesticides en «fabriquant» de nouvelles bactéries ayant dans leur génome tout un ensemble de gènes codant pour les différentes toxines et/ou en réalisant différentes combinaisons de ces toxines. C'est précisément le cas de certaines de nos souches qui, bien que faiblement ou moyennement actives, renferment dans leur cristal des polypeptides différents de ceux de la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*. Il serait intéressant de voir si l'expression de ces polypeptides dans une souche recombinante produisant des polypeptides de *Bacillus thuringiensis israelensis* renforcerait l'action de ces derniers en particulier vis à vis d'*An. gambiae* et/ou d'*An. arabiensis* ou, ce qui est également intéressant, allongerait le délai d'apparition des phénomènes de résistance.

CONCLUSION

Cette étude montre tout l'intérêt de la recherche de nouvelles souches de *Bacillus* entomopathogènes à partir du sol et des insectes morts. Il serait également intéressant d'envisager la recherche de *Bacillus* candidats à la lutte contre les moustiques vecteurs du paludisme au Sénégal à partir de cadavres d'*Anopheles arabiensis* et *An. gambiae*.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié de l'appui financier du Ministère français de la Coopération. Nous remercions B. Diako, A. Thiaw, H. Ripouteau et S. Hamon pour leur collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- De Barjac H.. Identification of H serotypes, in: «Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980». H. D. Burges Ed., Acad Press Inc., 1981, 34-43.
- De Barjac H. and Larget-Thiery I. Characterisation of IPS 82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H14 preparations. WHO/VBC/84, 1982, 892.
- De Barjac H. and Franchon E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, 1990, 35 : 233-240.
- Chang C., Yu Y. M., Dai S. M., Law S. K. and Gill S. S. High level Cry IVD and Cyt A gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20 kDa protein and the coexpressed gene products are synergistic to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59 : 815-821.
- Delécluse A., Bourgoïn C., Klier A. and Rapoport G. Deletion by in vivo recombination shows that the 28 - kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.*, 1991, 173 : 3374-3381.
- De Iucca A. J., Simonson I. J. G. and Larson A. D. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils in the United states. *Can. J. Microbiol.*, 1981, 27 : 865-870.
- Diagne N., Fontenille D., Konaté L., Faye O., Lamizana M.T., Legros F., Molez J.F., Trape J.F. Les Anophèles du Sénégal. Liste commentée et illustrée. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1994, 87 : 267-277.
- Fontenille D., Faye O., Konaté L., Sy N. and Collins F.H. Comparaison des techniques PCR et cytogénétique pour la détermination des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Sénégal. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1993, 68 : 239-240
- Georghiu G. P., Wirth M. C., Delécluse A. and Klier A. Potentiality for development of resistance to single vs. multiple toxins of *Bacillus* by mosquitoes. VIIth International Conference on *Bacillus*, Paris, France, 1993, abstr. L68.
- Goldberg L. H. and Margalit M. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito news*, 1977, 37: 355-358.
- Kalfon A., Larget-Thiery I., Charles J. F. and de Barjac H. Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. *Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1983, 18: 168-173.
- Lecadet M. M. and Dedonder R. Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. *Eur. J. Biochem.*, 1971, 23 : 282-294.
- Lecadet M.M., Chaufaux J., Riblier J. and Lereclus D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58 : 840-849.
- Lemasson J.J., Fontenille D., Lochouart L., Diall, Simard F., Ba K., Dlop A., Diatta M. and Molez J.F. Comparaison of behaviour and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera : Culicidae) in Barkedji, a sahelian Area of Senegal. *J. Med. Entomol.*, 1997, 34, 4 : 396-403
- Ohba M. and Aizawa K.. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in Japan. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986, 47 : 12-20.
- Ragni A., Thiery I. and Delécluse A. Characterisation of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H14 serotype. *Current Microbiol.*, 1996, 32 : 48-54.
- Sharif F.A. and Alaeddinoglu N. G. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Industrial Microbiology*, 1988, 3 : 227-229.
- Thomas W.E., and Ellar D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin : effects on insects and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell. Sci.*, 1983; 60 : 181-197.
- Travers R., Phillis S., Martin A. W and Reichelderfer C. F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53 : 1263-1266.