

Controlling *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) Using Several *Lysinibacillus Sphaericus* Isolates Endogenic to Indonesia

Ika Indayati & Hari Purwanto*

Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Article History

Received : February 26th, 2021

Revised : March 12th, 2021

Accepted : March 20th, 2021

Published : March 26th, 2021

*Corresponding Author:

Hari Purwanto,

BiologTropika, Fakultas
Biologi, Universitas Gadjah
Mada, Yogyakarta, Indonesia;
Email:

hari.purwanto@ugm.ac.id

Abstract: Mosquito-borne diseases include tropical diseases such as malaria, filariasis, dengue fever, chikungunya, yellow fever and cerebral fever are still major health problems in Indonesia and on a global scale. Various methods have been used to overcome this, including controlling vector mosquitoes using the entomopathogenic microbial *Lysinibacillus sphaericus*. This study aims to identify bacterial isolates collected based on the 16S rRNA gene and to carry out the pathogenicity test of the bacterial isolates collected on *Cx. quinquefasciatus* larvae. Bacterial isolates used in this study were collected from root soil, bird droppings and guano. The identification of the type of bacteria was carried out based on the 16S rRNA gene fragment. Based on the results of the 16S RNA sequence analysis of isolates 229C, 6B4, 6.2 and 4D21, it was found that the four isolates were included in the *L. sphaericus* species with similarity scores ranging from 97% to 100%. The pathogenicity of bacteria was measured based on the mortality of *Cx. quinquefasciatus* larvae to know whether it has pathogenicity equal to or higher than strain 1593. The pathogenicity test results of 6 isolates 15.4, 229C, 1593, 6B4, 6.2 and 4D21 showed that isolate 15.4 has the highest larval mortality rate, so it is potentially used as a biological agent to control disease vector mosquitoes.

Keywords: *Culex quinquefasciatus*, *Lysinibacillus sphaericus*, pathogenicity test, Indonesia

Pendahuluan

Nyamuk dapat berperan sebagai vektor penyakit pada manusia dan hewan. Penyakit yang ditularkan nyamuk termasuk penyakit tropis seperti malaria, filariasis, demam berdarah, chikungunya, demam kuning dan demam otak (Basavaraj *et al.*, 2014). Salah satu cara pengendalian vektor ini adalah dengan penggunaan insektisida. Namun, penggunaan insektisida yang kurang bijaksana akan menimbulkan resistensi vektor, resurgensi hama, munculnya vektor kedua, terbunuhnya organisme bukan sasaran (parasitoid, predator dan serangga berguna lainnya) dan pencemaran lingkungan.

Penemuan bakteri *L. sphaericus* telah membuka peluang untuk penggunaannya sebagai bio-agen potensial dalam program pengendalian nyamuk (Poopathi dan Abidha 2010, Poopathi *et al.*, 2002, Poopathi dan

Tyagi, 2002). Bakteri ini menghasilkan protein yang sangat beracun untuk larva nyamuk. Patogenisitas bakteri *L. sphaericus* terhadap larva nyamuk disebabkan oleh beberapa jenis toksin. Pada fase vegetatif berbagai isolat bakteri *L. sphaericus* menghasilkan mosquitocidal toxin (Mtx). Mtx1 pertama kali ditemukan pada strain SSII-1 yang memiliki patogenisitas rendah terhadap nyamuk (Thanabalu *et al.*, 1991). Kemudian pada tahun 1996 pada strain yang sama ditemukan toksin Mtx2 yang tidak memiliki kesamaan struktural dengan Mtx1 (Thanabalu *et al.*, 1996). Pada tahun yang sama ditemukan pula Mtx3 pada strain SSII-1 tersebut (Liu *et al.*, 1996). Ketiga toksin tersebut relatif tidak patogenik terhadap larva nyamuk dan ditemukan di banyak strain baik yang memiliki patogenisitas rendah maupun tinggi. Kemudian terdapat kristal paraspora saat bakteri telah melakukan sporulasi, kristal tersebut tersusun dari protein

biner yang disebut BinA dan BinB (Baumann et al., 1988; Hindley et al., 1987). Toksin biner tersebut sangat conserved, hingga dari lima varian yang diketahui, hanya terdapat enam variasi asam amino di antara varian satu dengan varian lainnya (Hire et al., 2009). Akibatnya, penggunaan bakteri *L. sphaericus* secara terus menerus mudah menimbulkan resistensi (Oliveira et al., 2004, Wirth et al., 2000, Rao et al., 1995) sehingga diupayakan pencarian terhadap isolat-isolat baru yang menghasilkan toksin dan lebih adaptif terhadap kondisi lingkungan setempat.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi beberapa isolat yang secara morfologis diduga merupakan strain *L. sphaericus* yang diperoleh dari beberapa tanah, tanah perakaran dan kotoran burung menggunakan analisis sekuen gen 16S rRNA, serta menguji patogenesisnya terhadap larva *Cx. quinquefasciatus*.

Bahan dan Metode

Perbanyakkan *Lysinibacillus sphaericus*

Perbanyakkan bakteri dilakukan dengan menggunakan medium bulu ayam. Medium bulu ayam (Poopathi & Abidha, 2007) dibuat dengan mengumpulkan limbah bulu ayam dari tempat pemotongan ayam lokal, kemudian limbah bulu ayam dicuci dan dikeringkan pada suhu ruang. Setelah kering, bulu ayam diblender hingga halus. 100 g berat kering bulu ayam direbus masing-masing menggunakan beaker glass dengan 1 L air selama 15 menit. Hasil rebusan didinginkan kemudian disaring dan kemudian disesuaikan pH nya hingga 7,5 menggunakan NaOH 1 N. pH diukur menggunakan pH meter. Medium bulu ayam dimodifikasi dengan penambahan garam yang terdiri dari 1 mg/L CaCO₃; 1 mg/L MgSO₄; 0,1 mg/L FeSO₄; 0,1 mg/L MnSO₄, dan 0,1 mg/L ZnSO₄. Medium disterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit di autoclave. Medium kemudian dituang di Erlenmeyer flask untuk inokulasi bakteri.

Uji Patogenesis Isolat Bakteri

Uji patogenesis bakteri *L. sphaericus* dilakukan terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* instar keempat awal. Uji patogenesis menggunakan 6 isolat bakteri dengan konsentrasi masing-masing 0,1 µl, 0,5

µl, 1 µl, 5 µl, 10 µl dan 50 µl ditambahkan ke dalam gelas plastik yang telah diisi 100 ml akuades steril dan 25 ekor larva nyamuk instar keempat. Kematian larva dihitung pada 24 jam dan 48 jam setelah perlakuan. Setiap perlakuan di ulang tiga kali. Setiap seri bioassay melibatkan enam konsentrasi; dan setiap konsentrasi diuji dalam empat cup berisi 25 larva instar awal keempat per ulangan, diulang tiga kali dalam waktu yang berbeda (WHO, 2005). Sebagai kontrol positif dilakukan pengujian dengan *L. sphaericus* strain 1593 dan sebagai kontrol negatif dilakukan pengujian dengan air tanpa inokulum. Setelah kematian larva diketahui, selanjutnya jumlah kematian larva dicatat. Selanjutnya, pengamatan ini dilanjutkan selama 7 hari untuk melihat sublethal effect. Larva yang mati dan yang masih hidup setiap hari diambil dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x.

Analisis sekuens 16 S rRNA DNA

Karakterisasi molekular isolat *L. sphaericus* diawali dengan tahap reisolasi koleksi isolat *L. sphaericus*, perbanyakkan, purifikasi, dan preparasi sampel sekuensing. Proses isolasi DNA hingga sekuensing genom bakteri *L. sphaericus* dilakukan di MicrobesNG, Birmingham, UK. Tiga beads dicuci dengan buffer ekstraksi yang mengandung lisozim dan RNAase A, kemudian diinkubasi selama 25 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya proteinase K dan RNAase A ditambahkan dan diinkubasi selama 5 menit pada 65°C. DNA genom dimurnikan menggunakan volume yang sama dari beads SPRI dan diresuspensi dalam buffer EB.

Data Analysis

Penyusunan Contigs

Genom yang telah disekuensing dengan menggunakan sistem *Illumina HiSeq 2000* dipotong menggunakan *Trimmomatic 0.30* dengan *a sliding window quality cutoff Q15* (Bolger et al., 2014), kemudian disusun atau dirakit secara de novo menggunakan SPAdes versi 3.7 (Bankevich et al., 2012) dan Celera Assembler sebagai koreksi eror sekuensing pada hasil bacaan yang panjang (Hernandez-Santana et al., 2016).

Anotasi Genom

Anotasi genom dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi elemen fungsional di sepanjang sekuen genom, dilakukan menggunakan RAST server (Overbeek *et al.*, 2014; Hernandez-Santana *et al.*, 2016; Jeong *et al.*, 2013), dan Prokka 1.11 (Seemann, 2014). Pada penelitian ini akan dibatasi pengolahan data pada identifikasi jenis bakteri dengan analisis sekuens 16 S rRNA. Sekuen 16S rRNA yang diperoleh dari hasil sekuensing genom dianalisis menggunakan Nucleotide BLAST (Madden, 2013) pada web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Rekonstruksi filogram (pohon filogenetik) pada penelitian ini menggunakan metode Neighbor-Joining dengan nilai bootstrap 1000 kali dengan model Kimura 2- Parameter (K2P) pada program MEGA10.

Uji Patogenesis

Patogenesis dinyatakan dengan LC50 dan LC90 yang dihitung dengan metode Probit Analysis (Finney, 1971) menggunakan program SPSS 16.0. Jika kematian pada kontrol antara 5-20% maka analisis Probit dikoreksi dengan Formula Abbot (WHO, 2005).

Hasil dan Pembahasan

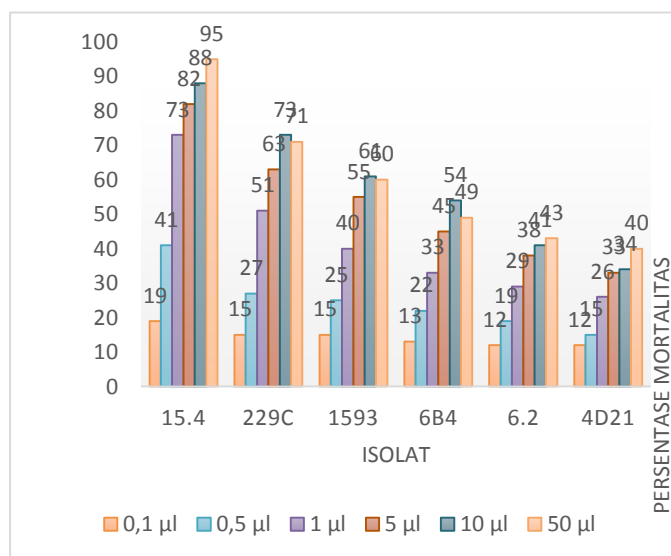
Analisis sekuens 16 S rRNA DNA

Sekuen 16S rRNA yang diperoleh dari hasil sekuensing genom dianalisis menggunakan Nucleotide BLAST (Madden, 2013) pada web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hasil analisis Nucleotide BLAST berupa similaritas dan identity yang menunjukkan kemiripan sampel dengan spesies yang ada di database GenBank. Hasil analisis Nucleotide BLAST yang didapatkan selanjutnya digunakan untuk memprediksi spesies dari sampel yang diteliti. Empat sekuen isolat yang diperoleh dicari padanannya menggunakan online Nucleotide BLAST pada web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hasil analisis online Nucleotide BLAST berupa nilai *query cover* dan nilai similaritas yang ditunjukkan dengan nilai identity. Semakin tinggi nilai parameter ini menunjukkan semakin mirip urutan basa sampel dengan database (Aprilyanto dan Sembiring, 2016). Hasil analisis online Nucleotide BLAST yang diperoleh disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil analisis online Nucleotide BLAST pada Tabel 4 diperoleh hasil bahwa keempat isolat termasuk dalam spesies *L. sphaericus*. BLAST similarity scores berkisar antara 97% sampai 100%. Rekonstruksi pohon filogeni gen 16S rRNA menggunakan software MEGA10 dengan menggunakan data sekuen pembandingan dari kelompok *in group* dan *out group* yang di unduh dari NCBI (Gambar 1).

Uji Patogenesis Isolat Bakteri

Uji patogenesis 6 isolat bakteri *L. sphaericus* dilakukan terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* instar keempat awal. Uji patogenesis menggunakan kisaran konsentrasi masing-masing 0,1 µl, 0,5 µl, 1 µl, 5 µl, 10 µl dan 50 µl ditambahkan ke dalam gelas plastik yang telah diisi 100 ml akuades steril dan 25 ekor larva nyamuk instar keempat. Kematian larva dihitung pada 24 jam dan 48 jam setelah perlakuan. Kisaran konsentrasi ini diambil untuk mendapatkan persentase kematian sebanyak 50% dan 90% (LC₅₀ dan LC₉₀). Hasil pengamatan mortalitas larva dikalkulasikan selama 48 jam disajikan pada Gambar 2 sebagai berikut:

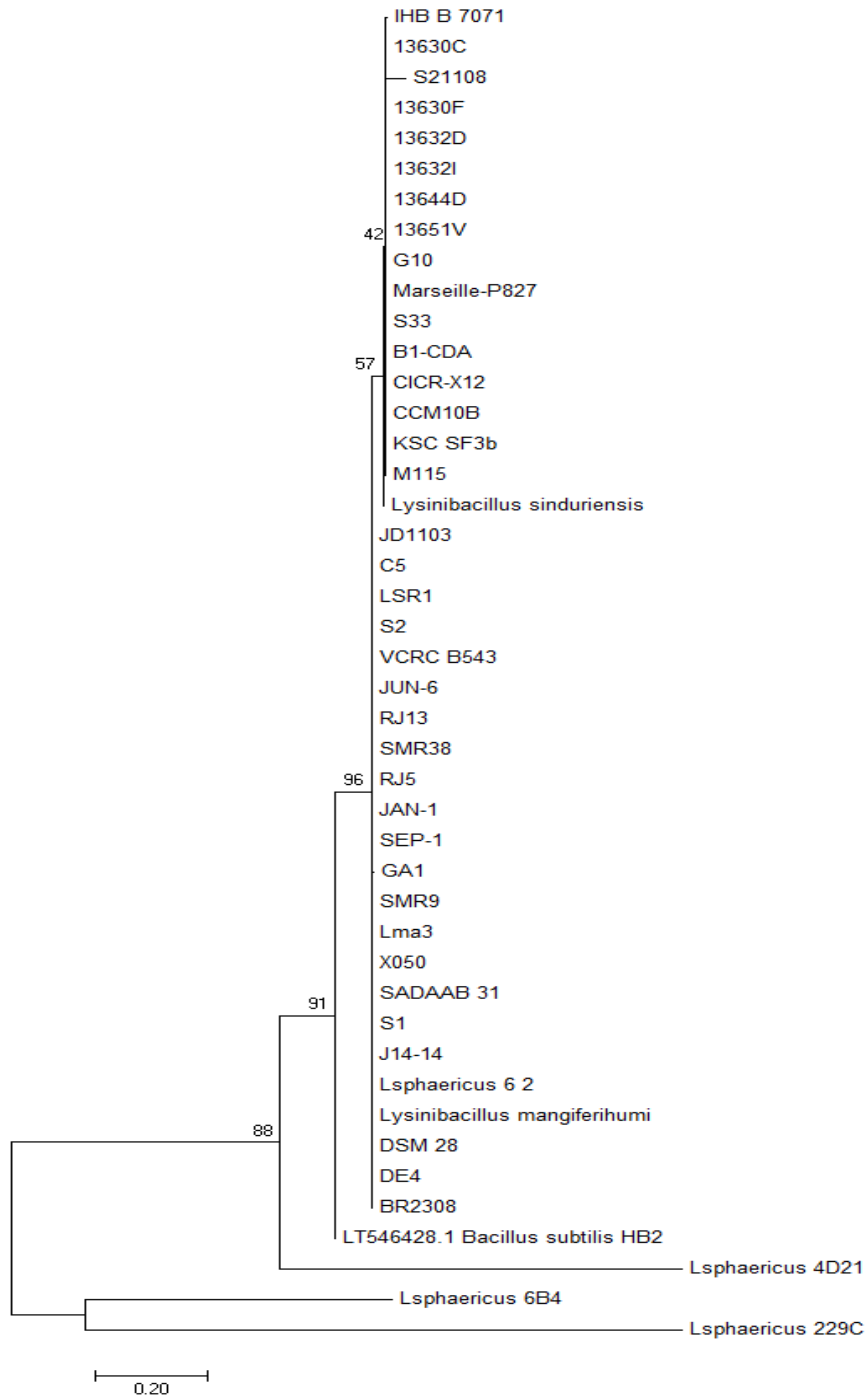


Gambar 2. Persentase mortalitas larva *C. quinquefasciatus* selama 48 jam pengamatan

Berdasarkan Gambar 2, persentase mortalitas larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* yang dikalkulasikan selama 48 jam menunjukkan bahwa isolat 15.4 dengan konsentrasi 50µl menghasilkan persentasi kematian terbesar 95% dibandingkan isolat lain dengan konsentrasi yang sama, dimana isolat 229C memiliki persentase kematian larva 71% pada konsentrasi 50µl, isolat

Tabel 1. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA

| Sampel | Sekuens terdekat di GeneBank | Accesion Number | Query Cover | Identity | Author |
|-------------|------------------------------|-----------------|-------------|----------|-------------------------------|
| Isolat 6B4 | <i>L. sphaericus</i> 13651V | EU741101.1 | 100% | 100,00% | Solano <i>et al.</i> , (2009) |
| Isolat 229C | <i>L. sphaericus</i> S21108 | KF956671.1 | 100% | 99,54% | Suyal <i>et al.</i> (2014) |
| Isolat 4D21 | <i>L. sphaericus</i> JAN-1 | KF453777.1 | 97% | 99,12% | Ding <i>et al.</i> (2016) |
| Isolat 6.2 | <i>L. sphaericus</i> X050 | KJ698650.1 | 98% | 99,86% | Liu <i>et al.</i> (2014) |



Gambar 1. Rekonstruksi pohon filogeni gen 16S rRNA pada *L. sphaericus*

1593 dengan persentase 60%, isolat 6B4 memiliki persentase kematian larva 49%, isolat 6.2 pada 43% dan isolat 4D21 dengan persentase kematian terendah 40%.

Berdasarkan data kematian larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* yang diperoleh dari hasil uji patogenesis dengan menggunakan 6 isolat, maka dapat dihitung nilai LC₅₀ dan LC₉₀ dengan menggunakan probit analisis. Hasil perhitungan LC₅₀ dan LC₉₀ disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai LC₅₀ dan LC₉₀ (µl FWC/100ml media uji) bakteri *L. sphaericus* terhadap larva nyamuk *C. quinquefasciatus* larva instar IV setelah 48 jam perlakuan

| Isolat | LC ₅₀ | Lower fiducial limit | Upper fiducial limit | LC ₉₀ | Lower fiducial limit | Upper fiducial limit |
|--------|------------------|----------------------|----------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| 15.4 | 0,6 | 0,0 | 4,3 | 13,7 | 0,7 | 290,7 |
| 229C | 2,2 | 0,6 | 7,5 | 216,9 | 36,1 | 47822,9 |
| 1593 | 5,6 | 3,5 | 9,9 | 1738,8 | 466,7 | 14070,4 |
| 6B4 | 16,9 | 8,9 | 43,4 | 13690,3 | 2024,8 | 385946,4 |
| 6.2 | 62,2 | 23,9 | 341,2 | 155152,1 | 9810,4 | 35483915,7 |
| 4D21 | 158,07 | 46,9 | 1719,2 | 663752,4 | 24306,5 | 695055469,6 |

Dari Tabel 2. dapat dilihat bahwa LC₅₀ dari isolat 15.4 sebesar 0,591739 µl FWC /100ml media uji; isolat 229C sebesar 2.371166 µl FWC /100ml media uji; isolat 1593 sebesar 5,765992 µl FWC /100ml media uji; isolat 6B4 sebesar 16,84554 µl FWC /100ml media uji; isolat 6.2 sebesar 58,1649 µl FWC /100ml media uji; dan isolat 4D21 sebesar 141,3647 µl FWC /100ml media uji. Sedangkan LC₉₀ dari isolat 15.4 sebesar 13,830089 µl FWC /100ml media uji; isolat 229C sebesar 218,1493 µl FWC /100ml media uji; isolat 1593 sebesar 1556,048 µl FWC /100ml media uji; isolat 6B4 sebesar 10786,685 µl FWC /100ml media uji; isolat 6.2 sebesar 106733,81 µl FWC /100ml media uji; dan isolat 4D21 sebesar 439377,69 µl FWC /100ml media uji.

Identifikasi Molekular menggunakan Sekuens 16S rRNA DNA *L. sphaericus*

Berdasarkan hasil analisis online Nucleotide BLAST pada Tabel 1 diperoleh hasil bahwa keempat isolat termasuk dalam spesies *L. sphaericus*. BLAST similarity scores berkisar antara 97% sampai 100%. Rekonstruksi pohon filogeni gen 16S rRNA pada *L. sphaericus*

antara isolat *L. sphaericus* dilakukan dengan data pembandingan yang diperoleh dari GenBank hasil BLAST. Hasil analisis filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida gen mitokondria 16S rRNA (Gambar 1) memperlihatkan bahwa terbentuk beberapa clade, dimana isolat 6.2 berada jauh dari isolat 4D21, 6B4 dan 229C. Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut sangat berbeda, didukung dengan perbedaan protein toksin yang terdapat pada masing-masing isolat, dimana hanya pada isolat 6.2 terdapat toksin Mtx, sedangkan pada isolat 229C dan 4D21 hanya terdapat protein S-layer, HemolysinA dan HemolysinD.

Rekonstruksi filogram (pohon filogenetik) pada penelitian ini menggunakan metode Neighbor-Joining dengan nilai bootstrap 1000 kali dengan model Kimura 2- Parameter (K2P) pada program MEGA10. Metode Neighbor-Joining merupakan metode rekonstruksi pohon yang menggunakan jenis data status karakter dan dengan cara rekonstruksi dengan kriteria pencarian optimal. Metode ini menggunakan data urutan nukleotida atau asam amino sebagai data yang digunakan dalam rekonstruksi filogeni dengan mengevaluasi probabilitas serta jumlah substitusi pada setiap situs karakter dalam suatu sekuens. Prinsip utama metode ini adalah menentukan topologi pohon, panjang cabang, dan model kekerabatan yang memaksimalkan probabilitas untuk mengobservasi jajaran urutan yang dimiliki (Aprilyanto dan Sembiring, 2016).

Uji Patogenesis Isolat Bakteri

Uji patogenesis 6 isolat bakteri *L. sphaericus* dilakukan terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* instar keempat awal. Pada Gambar 2 terlihat bahwa untuk isolat 15.4, 6.2 dan 4D21 semakin tinggi konsentrasi inokulum, semakin tinggi pula persentase kematian larva. Sedangkan untuk isolat 229C, 1593 dan 6B4 terdapat penurunan beberapa persen angka kematian larva. Pada Gambar 2 juga didapatkan hasil persentase kematian kontrol negatif sebesar 1,3%. Hal tersebut menunjukkan bahwa kondisi larva sebelum perlakuan dalam keadaan baik sehingga dapat memperkecil kemungkinan adanya faktor lain yang dapat mempengaruhi kematian larva dalam pengujian. Apabila kematian pada kontrol negatif lebih dari 20% maka pengujian tersebut dinyatakan gagal

dan harus mengulangi kembali percobaan tersebut (World Health Organization, 2005).

Perbedaan patogenesis tiap isolat diduga berhubungan dengan jumlah spora masing-masing isolat setelah perbanyakan. Pada penelitian ini kematian larva juga dipengaruhi protein toksin masing-masing isolat bakteri. Isolat bakteri uji mungkin tidak memproduksi protein yang bersifat toksik atau hanya memproduksi protein toksin dengan toksisitas yang rendah terhadap larva *C. quinquefasciatus*. Menurut Poopathi dan Abidha (2010), faktor yang menentukan toksisitas yang berbeda adalah spesifitas reseptor protein sel epitel midgut dan bukan pada proses penyerapan atau pemrosesan toksin. Adanya reseptor pada permukaan sel target menjadi spesifitas dari serangga tersebut. Protein toksin BinA dan BinB mengikat pada reseptor spesifik di batas sel epitel midgut yang menyebabkan terbentuknya lubang sehingga terjadi gangguan keseimbangan osmotik, lisis sel, dan menyebabkan kematian serangga.

Nilai LC_{50} dan LC_{90} adalah satuan yang menyatakan konsentrasi suatu produk yang mampu membunuh 50% dan 90% dari organisme uji (Yamamoto dan Aronson, 1983). Isolat yang memiliki patogenesis paling baik adalah yang membutuhkan konsentrasi bakteri paling sedikit dalam membunuh 50% dan 90% larva dalam waktu pendedahan paling cepat. Dari Tabel 5. isolat 15.4 memiliki nilai LC_{50} dan LC_{90} yang paling kecil selama pendedahan 48 jam dibandingkan isolat lain, sehingga diantara isolat *L. sphaericus* yang memiliki patogenesis paling baik adalah isolat 15.4.

Kesimpulan

Hasil analisis sekuen 16S RNA isolat 229C, 6B4, 6.2 dan 4D21 menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut termasuk dalam spesies *L. sphaericus* dengan *similarity scores* berkisar antara 97% sampai 100%. Hasil uji patogenesis 6 isolat 15.4, 229C, 1593, 6B4, 6.2 dan 4D21 menunjukkan bahwa isolat 15.4 memiliki tingkat mortalitas larva paling tinggi sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai agensia hayati untuk mengendalikan nyamuk vektor penyakit.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini difasilitasi oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) melalui program bantuan dana penelitian thesis program magister 2020. Kami mengucapkan terima kasih kepada kolega kami dan seluruh pihak, MicrobesNG, serta staff Laboratorium Entomologi Fakultas Biologi UGM, Laboratorium Mikrobiologi Pusat Antar Universitas Pascasarjana UGM, serta Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM.

Referensi

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. Doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Basavaraj S. K., A. Prabhuraj., P. K. Dhakephalkar., S. Hegde & R. S. Giraddi. (2014). Characterization of *Lysinibacillus sphaericus* C3-41 strain isolated from northern Karnataka, India that is toxic to mosquito larvae. *Journal of Biological Control*, 28(1):24–30. <http://www.informaticsjournals.com/index.php/jbc/article/view/14934>
- Baumann, L., Broadwell, A. H. & Baumann, P. (1988). Sequence Analysis of the Mosquitocidal Toxin Genes Encoding 514 and 419 Kilodalton Proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170: 2045–2050. Doi: 10.1128/jb.170.5.2045-2050.1988
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Hindley, J. & Berry, C. (1987). Identification, cloning and sequence analysis of the

- Bacillus sphaericus* 1593 41.9 kD larvicidal toxin gene. *Mol Microbiol.* 1: 187–194. Doi: 10.1111/j.1365-2958.1987.tb00511.x.
- Hire, R. S., Hadapad, A. B., Dongre, T. K. & Kumar, V. (2009). Purification and characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* BinA protein. *J. Invertebr. Pathol.* 101:106–111. doi: 10.1016/j.jip.2009.03.005
- Jeong, H., Da-Eun J., Young-Mi S. Seung-Hwan P., & Soo-Keun C. (2013). Genome Sequence of *Lysinibacillus sphaericus* Strain KCTC 3346^T. *Genome Announc.* 1(4):e00625-13. doi: 10.1128/genomeA.00625-13
- Liu, J. W., Porter, A. G., Wee, B. Y. U. & Thanabalu, T. (1996). New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2174–2176. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167996/>
- Poopathi S, & Abidha S. (2010). Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *J Physiol Pathophysiol.* 3:22-38. <https://academicjournals.org/journal/JPAP/article-full-text-pdf/ED79882634>
- Poopathi S, & Tyagi BK. (2002). Studies on *Bacillus sphaericus* toxicity related resistance development and biology in the filariasis vector, *Culex quinquefasciatus* from South India. *J Appl Entomol Zool.* 37: 365 –371. <https://doi.org/10.1303/aez.2002.365>
- Poopathi S, Mani TR, Rao DR, & Kabilan L. (2002). Evaluation of synergistic interaction between *Bacillus sphaericus* and a neem based biopesticide on Bsph susceptible *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Insect Sci Appl.* 22:303–306. <https://doi.org/10.1017/S1742758400020932>
- Oliveira, U. M. F., Silva-filha, M. H. & Nielsen-leroux, C. (2004). Inheritance and Mechanism of Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *J Med Entomol.* 41:58-64. doi: 10.1603/0022-2585-41.1.58
- Rao, D. R. et al. (1995). Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11: 1–5. PMID: 7616173
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 30(14):2068-2069. doi:10.1093/bioinformatics /btu153
- Thanabalu, T., Hindley, J., Jackson-Yap, J. & Berry, C. (1991). Cloning Sequencing and Expression of a Gene Encoding a 100- Kilodalton Mosquitocidal Toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J Bacteriol.* 173: 2776–2785. doi: 10.1128/jb.173.9.2776-2785.1991
- Thanabalu, T. & Porter, A. G. A. (1996). *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. *Gene.* 170: 85–89. doi: 10.1016/0378-1119(95)00836-5
- Wirth, M. C., Federici, B. A. & Walton, W. E. (2000). Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl Env. Microbiol.* 66: 1093–1097. Doi: 10.1128/aem.66.3.1093-1097.2000