

---

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4* EN AISLADOS DE *Bacillus thuringiensis* Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA EN LARVAS DE *Aedes aegypti*

---

Fabián Galvis Serrano

## RESUMEN

Los insecticidas químicos pueden ser tóxicos y causar la degradación del medio ambiente; en consecuencia, el control biológico de insectos representa una alternativa con bajo impacto ecológico. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas, que produce cristales parasporales de naturaleza proteica, compuesta por delta endotoxinas que son tóxicas para un alto número de insectos y son biodegradables e inocuas para otras especies. En el presente trabajo se aislaron, a partir de muestras de suelo, 13 cepas nativas de *B. thuringiensis* identificadas mediante medios selectivos

y el sistema BBL CRYSTAL. En la caracterización molecular utilizando cebadores específicos para la identificación de los genes *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4*; ocho aislados presentaron el gen *cry3* y dos aislados el gen *cry4*. Estos dos últimos aislados se utilizaron en un bioensayo en larvas de *Aedes aegypti* para determinar su efecto tóxico, mostrando que en el ensayo preliminar de toxicidad el aislado BtUDES2 presentó una letalidad del 56,67%. En la apreciación de la concentración letal del mismo aislado, se determinó una concentración letal media de 11,4333ng·ml<sup>-1</sup> y concentración letal total de 17,1542ng·ml<sup>-1</sup>.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4* GENES IN *Bacillus thuringiensis* ISOLATES AND DETERMINATION OF ITS BIOINSECTICIDE ACTIVITY IN *Aedes aegypti* LARVAE

Fabián Galvis Serrano

## SUMMARY

Chemical insecticides can be toxic and cause environmental degradation. Therefore, biological control of insects represents an alternative of low ecological impact. *Bacillus thuringiensis* is a spore-forming Gram-positive bacterium that produces parasporal crystals of a proteic nature, formed by delta endotoxins that are toxic to a large number of insects and are biodegradable and innocuous to other species. In the present work 13 native strains of *B. thuringiensis* were isolated from soil samples and identified by selective methods and the BBL CRYSTAL method. In the molecular characterization utilizing

specific primers for the identification of *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4* genes, eight isolates presented the *cry3* gene and two presented the *cry2* gene. These two latter isolates were used in a bioassay on *Aedes aegypti* larvae to determine their toxic effect, showing that the preliminary toxicity essay of the BtUDES2 isolate presented a lethality of 56.67%. When determining the lethal concentration of this same isolate, an average lethal concentration of 11.4333ng·ml<sup>-1</sup> and a total lethal concentration of 17.1542ng·ml<sup>-1</sup> were found.

---

## Introducción

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por la infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus, transmitidos al hombre por el mosquito *Aedes* sp. La infección viral causa un espectro de manifestaciones clínicas, desde una enfermedad febril leve hasta un cuadro hemor-

rágico severo y fatal (Chávez, 2007). La incidencia del dengue ha aumentado exponencialmente en los últimos años a escala mundial, y la reducción del vector continúa siendo la única alternativa viable para el control de la enfermedad (Gato *et al.*, 2008).

El empleo de insecticidas químicos ha permitido de forma rápida y eficiente disminu-

ir los problemas causados por insectos que actúan como vectores de enfermedades o como plagas, provocando daños considerables en cultivos agrícolas de interés económico. Sin embargo, el uso irracional y excesivo de químicos genera problemas como la contaminación del ambiente, la pérdida de efectividad de los insecticidas y la reducción

de la biodiversidad, entre otros (Bernal, 2011).

*Bacillus thuringiensis* es la bacteria entomopatógena más usada como biopesticida contra vectores de enfermedades humanas (dengue, malaria, fiebre amarilla, filariasis), en la protección de especies vegetales y agricultura comercial. *B. thuringiensis* tiene diversas ventajas que derivan

---

**PALABRAS CLAVE / *Aedes aegypti* / *Bacillus thuringiensis* / Bioinsecticida / Genes *cry* / PCR /**

Recibido: 10/03/2012. Modificado: 19/02/2013. Aceptado: 20/02/2013.

**Fabián Galvis Serrano.** Biólogo, Universidad Industrial de Santander, Colombia. Magister en Producción Vegetal, Universidad Experimental

del Táchira, Venezuela. Profesor, Universidad de Santander, Colombia. Dirección: Grupo de Investigación BIOGEN, Universidad Francisco de Pau-

la Santander, Avenida 4 con Calle 10N, Urbanización El Bosque, Cúcuta, Colombia. e-mail: fgs999@hotmail.com

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES *cry1*, *cry2*, *cry3* e *cry4* EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* E DETERMINACIÓN DA SUA ATIVIDADE BIOINSETICIDA EM LARVAS DE *Aedes aegypti*

Fabián Galvis Serrano

## RESUMO

Os inseticidas químicos podem ser tóxicos e causar a degradação do meio ambiente; em consequência, o controle biológico de insetos representa uma alternativa com baixo impacto ecológico. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva formadora de esporas, que produz cristais parasporais de natureza proteica, composta por delta endotoxinas que são tóxicas para um alto número de insetos e são biodegradáveis e inócuas para outras espécies. No presente trabalho foram isolados, a partir de amostras de solo, 13 cepas nativas de *B. thuringiensis* identificadas através de meios selectivos e o sistema

BBL CRYSTAL. Na caracterização molecular utilizando cebadores específicos para a identificação dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3* e *cry4*; oito isolados apresentaram o gen *cry3* e dois isolados o gen *cry4*. Estes dois últimos isolados se utilizaram em um bioensaio em larvas de *Aedes aegypti* para determinar seu efeito tóxico, mostrando que no ensaio preliminar de toxicidade o isolado BtUDES2 apresentou 56,67% de letalidade. Na apreciação da concentração letal do mesmo isolado, se determinou uma concentração letal média de 11,4333ng·ml<sup>-1</sup> e concentração letal total de 17,1542ng·ml<sup>-1</sup>.

principalmente de su alta especificidad contra los insectos susceptibles, su inocuidad hacia el medio ambiente, la entomofauna benéfica y demás organismos vivos, incluyendo el hombre, además de una incidencia escasa de fenómenos de resistencia. *B. thuringiensis* representa ~90% del mercado de biopesticidas, el cual asciende a 600×10<sup>6</sup> USD (López-Pazos y Cerón, 2010).

*B. thuringiensis* produce toxinas insecticidas de tipo proteico que son sintetizadas durante la esporulación y se depositan como inclusiones cristalinas paraesporales (Sauka y Benintende, 2008). La acción de las endotoxinas comienza cuando la larva consume la toxina contenida en el cristal y ésta ataca la pared del intestino, que comienza a romperse y finalmente la larva muere por septicemia. *B. thuringiensis* var. *israelensis* sintetiza las proteínas Cry IVA, Cry IVB, Cry 11A y Cyt 1A, que resultan tóxicas individualmente para varios géneros de mosquitos (Gato et al., 2008).

La resistencia presentada por los insectos blanco y la poca persistencia de los biopreparados en el medio, sugieren la realización de investigaciones que permitan la identificación de nuevos aislados nativos de *B. thuringiensis* con mayor toxicidad y mayor permanencia. La determinación bioquímica no es una herramienta lo suficientemente

específica en la identificación, mientras que las técnicas moleculares permiten la caracterización de microorganismos logrando su determinación a nivel inter o intraespecífico (Fernández et al., 2010).

*B. thuringiensis* pertenece al grupo *B. cereus* que también incluye a *B. anthracis* y *B. mycoides*. Las relaciones taxonómicas entre miembros de este grupo no está clara y las diferencias entre *B. thuringiensis* y *B. cereus* son muy pocas, basándose únicamente en la producción de proteína cristal insecticida por parte de *B. thuringiensis* (Drobniowski, 1994).

En el presente estudio se realizó un bioensayo de toxicidad en larvas de *A. aegypti* con *B. thuringiensis* identificados con genes *cry4* por PCR y aislados a partir de muestras de suelo.

## Métodos

### Toma de muestras

Se recolectaron muestras de suelo procedentes de zonas boscosas o rurales poco intervenidas, de pastizales y rizosferas de árboles, en los municipios de Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano y Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia. En cada caso se tomó 200g de suelo extraído a una profundidad de 5-10cm; de cada muestra se registró *in situ* la localización y las características físicas del sitio de muestreo, y *ex situ* se

determinó pH y textura del suelo. Las muestras fueron secadas a 24°C durante 24h.

### Aislamiento de *B. thuringiensis*

Se utilizó el método descrito por Carreras en el 2009, con algunas modificaciones: 500mg de suelo en 10ml de agua destilada estéril fueron incubados a 65°C por 30min con agitación vigorosa. Se sembraron 100µl de las muestras en medio LB solido (10g triptona, 10g NaCl, 5g extracto de levadura y 15g agar por litro) y se incubaron a 28-30°C durante 24h. Se examinaron las colonias crecidas y se seleccionaron por su aspecto y morfología mediante observación al microscopio estereoscópico. Se determinó la forma bacilar, distensión del esporangio, localización y morfología de la spora mediante observación con tinción diferencial de verde malaquita. Para la revisión del cristal paraesporal se utilizó la tinción diferencial de verde malaquita.

### Caracterización mediante BBL® CRYSTAL®

Se realizó la identificación bioquímica utilizando BBL CRYSTAL Gram Positivo/GP (Becton Dickinson).

### Identificación molecular

Para la obtención del ADN de los aislados y controles positivos (*B. thuringiensis* var.

*israelensis*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y *B. thuringiensis* var. *san diego*) se utilizó el UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit de MoBio. En la identificación molecular por PCR se emplearon los cebadores CJI-1 tgtagaagaggagctctateca y CJI-2 tatcggtttctgggaagta para genes *cry1* (Bozlağan et al., 2010); *cry2A* taaagaaagtggggagtctt y *cry2B* aactccatcggtattttag para genes *cry2* (Sauka et al., 2005); CJIII20 ttaaccgttttcgcagaga y CJIII21 tccgcacttctatgtgtccaag para genes *cry3* (Öztürk et al., 2008); y *cry4BspeF* cgttttcaagacctaataatataatacc y *cry4BspeR* cggtgtatctatgtc-taatctgt para genes *cry4* (Ibarrá et al., 2003). Las muestras de ADN fueron amplificadas en un volumen final de 50µl conteniendo 1X buffer para PCR, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP, 1U de Taq polimerasa (Bioline), 1µM de cada primer y 2µl de ADN. Las condiciones de la amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5min seguida de 30 ciclos de 95°C por 1min, 60°C por 30s y 72°C por 1min; y una extensión final a 72°C por 7min. Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

### Bioensayo

Se determinó el efecto tóxico de los aislados de *B. thuringiensis* sobre *A. aegypti* con el siguiente procedimiento:

**Cría de larvas *A. aegypti*-Rockefeller.** Colocar huevos en agua de clorada en bandejas esmaltadas de 25×40cm; utilizar comida para pollos como dieta y mantener a 26 ±2°C por un fotoperiodo de 12/12h. No exceder una población de 700 larvas por bandeja. Entre los cinco y siete días se obtienen larvas en tercer o cuarto estadio con 4-5mm de longitud.

**Ensayo preliminar de toxicidad (EPT).** Depositar 10 larvas en tercer estadio en recipientes de plástico con 100ml de agua, por triplicado para cada aislamiento y control; adicionar 1ml de los aislados cultivados en medio T3 (Carreras, 2009). Repetir el bioensayo en tres momentos diferentes para corregir variaciones en el desarrollo del insecto, condiciones locales o procedimientos experimentales (Martínez, 2004). La lectura de la mortalidad se registra a las 24 y 48h. Si se presenta una mortalidad >20% en el testigo, el bioensayo es anulado (OMS, 2005).

**Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).** Los aislados que presentaron mortalidad >50% en el EPT, fueron sometidos a un segundo ensayo en tres momentos diferentes para establecer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) con el método de peso seco propuesto por la OMS (2005). Los resultados de mortalidad para determinar CL<sub>50</sub> fueron evaluados con el programa Probit.

## Resultados

### Identificación con medios selectivos y pruebas bioquímicas

Las 45 muestras de suelo recolectadas en los municipios de Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano y Villa del Rosario, Norte de Santander, presentaron una textura predominante arcillosa-arenosa y un pH entre 4,5 y 9,7.

En el aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de las muestras de suelo se selec-

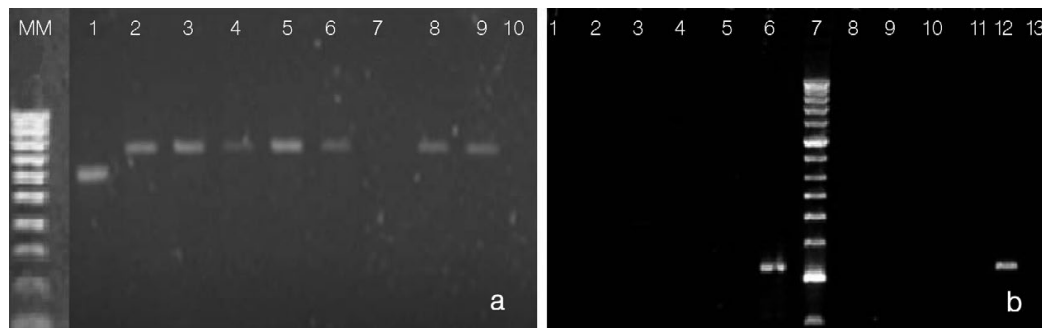


Figura 1. Identificación mediante PCR de genes *cry3* y *cry4*.

a: identificación por PCR de genes *cry3* utilizando los cebadores CJIII20 y CJIII21. Líneas 1-7: aislados de *B. thuringiensis*; líneas 8 y 9: controles positivos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y *B. thuringiensis* var. *san diego*; línea 1: marcador de peso molecular *Hyperladder IV* de Bioline®. Se observa en la línea 1 una banda de ~652pb; y en las líneas 2-6 y 8-9 una banda de ~733pb.

b: identificación de genes *cry4* utilizando los cebadores *cry4BspeF* y *cry4BspeR*. Líneas 1-6 y 8-13: aislados de *B. thuringiensis*, línea 7: marcador de peso molecular *Hyperladder II* de Bioline®. Se observa en las líneas 6 y 12 una banda de ~321pb.

cionaron 151 colonias por presentar la siguiente morfología: colonia mediana a grande, plana, de borde irregular lobulado y/o arborescente, consistencia blanda, aspecto opaco/mate, pigmentación blanco cremoso. De estas se escogieron 72 colonias por ser bacilos Gram positivos, de las cuales 13 presentaron esporas de forma cilíndrica u ovoide no deformante del cuerpo del bacilo en posición terminal o subterminal, y con la presencia del cristal. Estos 13 aislados fueron procesados para su identificación bioquímica y molecular. Mediante el sistema BBL CRYSTAL Gram Positivo/GP se identificaron los 13 aislados como *B. cereus*.

### Identificación molecular

En el análisis molecular mediante PCR se logró determinar genes *cry* en 10 de los 13 aislados. En la identificación de los genes *cry3* usando los cebadores CJIII20 y CJIII21 se observó un producto de 652pb en un aislado y de 733pb en siete aislados y dos controles positivos (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* y *B. thuringiensis* var. *san diego*; Figura 1a), siendo la amplificación la esperada según Öztürk *et al.* (2008). En la identificación de los genes *cry4* con los cebadores

*cry4BspeF* y *cry4BspeR* se reconocieron dos aislados y el control positivo *B. thuringiensis* var. *israelensis*, amplificando una banda de 321pb (Figura 1b), que corresponde a lo esperado según Ibarra *et al.* (2003). No se observó amplificación en la identificación de los genes *cry1* y *cry2*.

### Bioensayo

Para la realización del bioensayo se utilizaron los aislados de *B. thuringiensis* con genes *cry4* caracterizados por PCR, denominados en esta investigación como BtUDES1 y BtUDES2. Las toxinas CryIV de *B. thuringiensis* presentan efecto tóxico contra dípteros (Fernandez-Luna *et al.*, 2009; Wirth *et al.*, 2010).

**Ensayo preliminar de toxicidad.** El aislado BtUDES2 reportó toxicidad en los tres ensayos realizados con valores entre 40 y 73,33% de mortalidad, con una media de 56,66% y con una desvia-

ción estándar de 13,59. La muerte de las larvas se evidenció por el ennegrecimiento de la parte inferior del abdomen, causada por la desintegración de las paredes del intestino (Rodríguez, 2008).

**Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).** Reportes de la OMS (2005) indican que los preparados de *B. thuringiensis* var. *israelensis* utilizados como biocontroladores de *Aedes* sp., contienen aproximadamente una CL<sub>50</sub> de 10ng·ml<sup>-1</sup>. En el bioensayo de toxicidad se determinó una CL<sub>50</sub> de 11,4333ng·ml<sup>-1</sup> (Tabla I), es decir que para alcanzar un 50% de mortalidad en los insectos es necesario una dosis de 11,4333ng·ml<sup>-1</sup> del bioinsecticida. También se calculó una CL<sub>100</sub> de 17,1542ng·ml<sup>-1</sup>.

## Discusion

Se realizaron aislamientos a partir de muestras de suelo, de acuerdo a lo descrito por Casmuz *et al.* (2010), quienes

TABLA I  
VALORES ESTADÍSTICOS DE LAS CONCENTRACIONES LETALES AL 50% (CL<sub>50</sub>) DEL AISLADO BTUDES2 SOBRE LARVAS DE *A. aegypti*

Aislado	CL <sub>50</sub> (ng·ml <sup>-1</sup> )	IC	x <sup>2</sup>	b
BtUDES2	11,433	0,196-0,338	1,729	0,267

IC: Intervalos de confianza (95%), x<sup>2</sup>: chi-cuadrado, b: pendiente.

sugirieron que el hábitat normal de *B. thuringiensis* es el suelo. Se encontró que el número de aislados positivos de *B. thuringiensis* fue bajo (13 aislados) en relación al número de muestras tomadas en diferentes municipios de Norte de Santander (45 muestras). Esto es probablemente debido a que las características de los suelos donde fueron tomadas las muestras no sean las apropiadas para el aislamiento de *B. thuringiensis*, provocado tal vez por la intervención del hombre en la incorporación de productos químicos que desestabilizan la microbiota del suelo, o posiblemente debido a características naturales del suelo, que actúan de manera antagónica en la permanencia de *B. thuringiensis* en el ambiente.

Por otra parte, Travers *et al.* (1989) determinaron la distribución y abundancia de aislados de esta especie en los cinco continentes, y encontraron que los suelos de Asia eran extraordinariamente ricos en *B. thuringiensis*. Esto indica que el número de aislados depende más de la región muestreada que del método utilizado para el aislamiento del microorganismo, explicando la posible causa del bajo número de aislados obtenidos en este trabajo.

*B. cereus* y *B. thuringiensis* son bioquímicamente idénticos, diferenciándose únicamente en la producción del cristal parasporal. El sistema BBL CRYSTAL no incluye a *B. thuringiensis* en su base de datos, y los aislados fueron identificados como *B. cereus*. Debido a la identificación del cristal paraesporal en los aislados se confirma que estos corresponden a *B. thuringiensis*.

La identificación específica de los genes *cry* de *B. thuringiensis* puede ser utilizada como una herramienta de caracterización molecular para establecer la toxicidad del microorganismo en un determinado orden de insectos. Se conoce que los genes *cryI* se relacionan con la toxicidad en lepidópteros, los genes *cry2*

son tóxicos en lepidópteros y dípteros (Rosales-Reyes *et al.*, 2003), los genes *cry3* contra coleópteros y los genes *cry4* contra dípteros. (López-Pazos y Cerón, 2010). En este trabajo se logró la identificación de genes *cry3* y *cry4* en 10 aislados de *B. thuringiensis*. Cerón *et al.* (1995) diseñaron y utilizaron los cebadores CJIII20 y CJIII21, identificando diferentes genes *cry3* con un rango de productos entre 652 y 733pb. Los genes identificados fueron *cry3A* con 703pb (Y00420); *cry3B* y *cry3C* con 709pb (X17123 y M98794); *cry3Cgall*, *cry3Cb* y *cry3Cc* con 694 (M64478, U04367 y U04368); *cry3D8* con 718pb (X59797); *cry3F* con 652pb (U04366); y *cry3G* con 733pb (U04365).

Los aislados BtUDES1 y BtUDES2 identificados por PCR con genes *cry4*, son potenciales biocontroladores de dípteros y coleópteros. Estos insectos son plagas que generan enormes pérdidas en cultivos de interés agronómico y vectores de enfermedades en humanos. El empleo de estos biocontroladores disminuiría el uso de insecticidas químicos que no son selectivos y que ocasionan daños en el ambiente.

En el ensayo cualitativo de toxicidad se utilizó 1ml del cultivo completo final de los aislados BtUDES1 y BtUDES2, sin necesidad de determinar su concentración, debido a que el objetivo principal del EPT es probar de manera rápida aislados nativos de *B. thuringiensis* cuya actividad tóxica es desconocida, en poblaciones estandarizadas de insectos. Este ensayo reportó una toxicidad en el aislado BtUDES2 con un promedio de 56,67% de letalidad en las tres réplicas. El aislado BtUDES2 se seleccionó para la determinación de la CL<sub>50</sub>, estableciéndose un valor de 11,4333ng·ml<sup>-1</sup>, que concuerda con lo propuesto por la OMS, que dispone que los preparados *B. thuringiensis* var. *israelensis* tienen una CL<sub>50</sub> para larvas de *A. aegypti* de ~10ng·ml<sup>-1</sup> en agua.

Los aislados de *B. thuringiensis* con genes *cry3* identificados por PCR en este estudio son potenciales controladores de insectos plaga del orden Coleóptera, como *Hypothenemus hampei* (broca del café), *Apriona germari*, *Holotrichia parallela*, *Diabrotica virgifera* (López-Pazos y Cerón, 2010).

## REFERENCIAS

- Bernal E (2011) Comparación socioeconómica de las empresas agrarias de producción ecológica y convencional en Aragón, España: Problemas y oportunidades. *Mundo Agr.* 11(2).
- Bozlağan I, Ayvaz A, Ozturk F, Acik L, Akbulut M, Yilmaz S (2010) Detection of the *cryI* gene in *Bacillus thuringiensis* isolates from agricultural fields and their bioactivity against two stored product moth larvae. *Turk. J. Agric. For.* 34: 145-154.
- Carreras B (2009) Determination of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates autochthonous in Cuba. *Fitosanidad* 13: 109-116.
- Casmuz A, Juárez M, Socías M, Murúa M, Prieto S, Medina S (2010) Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 69: 209-231.
- Cerón J, Ortiz A, Quintero R, Güereca L, Bravo A (1995) Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 3826-3831.
- Chávez E (2007) Enfermedades tropicales en Bolivia: fiebre amarilla y dengue. *Rev. Bol. Pediatr.* 46: 36-45.
- Fernández A, García de la Fuente C, Saéz A, Valdezate S (2010) Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En *Procedimientos en Microbiología Clínica. Proc. Microbiol. Clin.* 37: 3-26.
- Fernández L, Martínez C, Lira E, Chen J, Evans A, Hernández S, Lanz H, Bravo A, Gill S, Soberón M (2009) Cloning and epitope mapping of CryIIAa-binding sites in the CryIIAa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* 48: 8899-8907.
- Gato R, Díaz M, Bruzón R, Menéndez Z, González A, Hernández Y (2008) Estudio de resis-

tencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Rev. Cub. Med. Trop.* 60: 74-77.

- Ibarra JE (2003) Diversidad de *Bacillus thuringiensis* y su implicación en el rango de toxicidad (Conferencia Inaugural). *Mem. XXV Congr. Nac. Entomología.* Sociedad Chilena de Entomología. Talca, Chile. p. 1.
- López-Pazos S, Cerón J (2010) Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. *NOVA* 8: 183-194.
- Martínez C, Porcar M, López A, Escudero I, Pérez J, Caballero P (2004) Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol. Exper. Applic.* 111: 71-77.
- Nariman A (2007) Detection of *cry* genes in local *Bacillus thuringiensis* isolates. *Aust J. Bas. Appl. Sci.* 4: 461-466.
- Öztürk F, Acik L, Ayvaz A, Bozdoğan B, Suludere Z (2008) Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from soil and testing the bioactivity of isolates against *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Turk. J. Biochem.* 33: 202-208.
- Rodríguez M (2008) *Estudio de la Resistencia a Insecticidas en Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Tesis. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kori. La Habana; Cuba. pp 10-12.
- Rosales T, Salcedo R, Ibarra J, Barboza E (2003) Identificación de los Genes *cry* en cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con potencial insecticida. *Acta Univers.* 3(2).
- Sauka D, Benintende G (2008) *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Arg. Microbiol.* 40: 124-140.
- Travers RS, Martin PA (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *App. Env. Microbiol.* 55: 2437-2442.
- Wirth M, Walton W, Federici B (2010) Evolution of resistance to the *Bacillus sphaericus* Bin toxin is phenotypically masked by combination with the mosquitoicidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*. *Env. Microbiol.* 12: 1154-1160.
- WHO (2005) *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. World Health Organization. Ginebra. Suiza. 41 pp.