

Originalni naučni rad DOI: 10.5937/DDD26113P

LARVICIDNI POTENCIJAL ZEMLJIŠNIH IZOLATA *BACILLUS THURINGIENSIS* PROTIV KOMARACA *CULEX PIPIENS*

LARVICIDAL POTENTIAL OF SOIL ISOLATES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AGAINST *CULEX PIPIENS* MOSQUITOES

*Branislav Pešić*¹

Kratak sadržaj

Komarci iz kompleksa *Culex pipiens* imaju značajnu ulogu u prenosu patogena ljudi i životinja, zbog čega kontrola njihovih larvenih stadijuma predstavlja važan segment savremenih strategija biološkog suzbijanja. U ovom istraživanju ispitivan je larvicidni potencijal zemljišnih izolata bakterije *Bacillus thuringiensis* poreklom iz različitih prirodno-geografskih regija Slovenije. Iz ukupno 12 uzoraka zemljišta izolovano je 77 bakterijskih izolata, od kojih je 16 molekularno potvrđeno kao *B. thuringiensis*. Nakon procene sposobnosti sporulacije i prisustva kristalnih proteinskih inkluzija, devet izolata odabrano je za biotestove na larvama drugog larvenog stadijuma vrste *Culex pipiens*. Rezultati su pokazali izraženu varijabilnost larvicidne aktivnosti među ispitivanim izolatima. Najveću efikasnost ispoljili su izolati Bt-25, Bt-68 i Bt-70, koji su izazvali 100% smrtnost larvi, pri čemu je izolat Bt-70 dostigao potpun efekat već nakon 24 časa, uporedivo sa pozitivnom kontrolom. Statistička analiza potvrdila je visoko značajne razlike između tretmana (Kruskal–Wallis test, $p < 0,001$). Dobijeni rezultati ukazuju da lokalni zemljišni izolati *B. thuringiensis* predstavljaju značajan resurs za identifikaciju visoko aktivnih sojeva i osnovu za dalji razvoj bioloških larvicida namenjenih kontroli komaraca.

Ključne reči: *Bacillus thuringiensis*, biološka kontrola, *Culex pipiens*, larvicidi, kristalni proteini

Abstract

Mosquitoes of the *Culex pipiens* complex play an important role in the transmission of pathogens affecting humans and animals, which makes the control of their larval stages an important component of modern biological control strategies. This study investigated the larvicidal potential of soil isolates of *Bacillus thuringiensis* originating from different natural-geographical regions of Slovenia. A total of 77 bacterial isolates were obtained from 12 soil samples, of which 16 were molecularly confirmed as *B. thuringiensis*. After assessing sporulation capacity and the presence of crystal protein inclusions, nine isolates were selected for bioassays on

¹ Dr sci. vet. med. Branislav Pešić, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija

* e-mail kontakt osobe: branislav.pesic@kis.si

second-instar larvae of Culex pipiens. The results revealed pronounced variability in larvicidal activity among the tested isolates. The highest efficacy was observed in isolates Bt-25, Bt-68, and Bt-70, all of which caused 100% larval mortality, while Bt-70 achieved complete efficacy within 24 hours, comparable to the positive control. Statistical analysis confirmed highly significant differences among treatments (Kruskal–Wallis test, $p < 0.001$). The obtained results indicate that local soil isolates of B. thuringiensis represent an important resource for the identification of highly active strains and a basis for the further development of biological larvicides intended for mosquito control.

Keywords: *Bacillus thuringiensis, biological control, Culex pipiens, crystal proteins, larvicides*

UVOD

Komarci predstavljaju jednu od najznačajnijih grupa insekata sa aspekta javnog zdravlja, jer brojne vrste učestvuju u održavanju i prenosu patogena ljudi i životinja. U okviru te grupe, kompleks vrste *Culex pipiens* ima poseban značaj zbog široke rasprostranjenosti, ekološke prilagodljivosti i uloge u transmisiji različitih arbovirusa i drugih patogena, naročito u umerenim klimatskim područjima Evrope i Mediterana (Farajollahi i sar., 2011; Brugman i sar., 2018). Pored epidemiološkog značaja, masovna pojava larvi i adultnih formi komaraca predstavlja i ozbiljan ekološki i komunalni problem, zbog čega je razvoj efikasnih i održivih mera suzbijanja od velikog značaja.

Konvencionalna kontrola komaraca dugo se oslanjala na primenu hemijskih insekticida, ali njihova intenzivna i često neselektivna upotreba dovela je do brojnih ograničenja, uključujući razvoj rezistentnosti kod ciljanih populacija, negativan uticaj na neciljane organizme i rastuće regulatorne i ekološke zahteve za smanjenje njihove upotrebe (Benelli i Beier, 2017; Cholvi i sar., 2026). Zbog toga se sve više pažnje usmerava ka biološkim agensima koji omogućavaju selektivnije i ekološki prihvatljivije suzbijanje larvi komaraca u akvatičnim staništima.

Jedan od najvažnijih mikrobioloških agenasa u biološkoj kontroli insekata je bakterija *Bacillus thuringiensis* Berliner, sporogena, Gram-pozitivna bakterija iz zemljišta poznata po sposobnosti stvaranja parasporalnih kristala tokom sporulacije. Ovi kristali sadrže insekticidne proteine, prvenstveno Cry i Cyt toksine, koji nakon ingestije u digestivnom traktu osetljivih larvi dovode do poremećaja integriteta epitela srednjeg creva, paralizuje digestivnog sistema i uginuća insekta (Schnepf i sar., 1998; Palma i sar., 2014; Silva-Filha i sar., 2021). Upravo zbog visoke specifičnosti i efikasnosti prema određenim grupama insekata, *B. thuringiensis* zauzima centralno mesto u savremenim strategijama biokontrole.

Sojevi *B. thuringiensis* aktivni prema dipterama, naročito prema larvama komaraca, imaju poseban praktični značaj. Najpoznatiji među njima je *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), koji se već decenijama koristi kao standardni

biolarvicid u programima suzbijanja komaraca širom sveta. Njegova efikasnost zasniva se na kompleksnom delovanju više toksina, pre svega Cry4, Cry11 i Cyt proteina, što doprinosi visokoj larvicidnoj aktivnosti i istovremeno smanjuje verovatnoću razvoja rezistentnosti u prirodnim populacijama komaraca (Lacey, 2007; Silva-Filha i sar., 2021). Iako su komercijalni Bti preparati široko zastupljeni, potraga za novim lokalnim sojevima ostaje važna, jer prirodni izolati mogu posedovati različite profile toksina, različit nivo virulentnosti i potencijal za razvoj novih, lokalno prilagođenih biolarvicida (Ma i sar., 2023).

Zemljište predstavlja jedan od najvažnijih prirodnih rezervoara bakterije *Bacillus thuringiensis*, pa je izolacija autohtonih sojeva iz različitih tipova staništa često prvi korak u razvoju novih bioloških insekticida. Učestalost, diverzitet i insekticidni potencijal izolata mogu zavisiti od niza faktora, uključujući tip zemljišta, vegetacijski pokrivač, klimatske uslove i lokalnu mikrobnu zajednicu. Zbog toga istraživanja usmerena na prikupljanje i karakterizaciju lokalnih *Bt* izolata imaju i fundamentalni i primenjeni značaj, posebno u kontekstu održive zaštite bilja i kontrole vektora bolesti (Travers i sar., 1987; Benelli, 2016; Hong i sar., 2025).

U ovom radu ispitivan je larvicidni potencijal zemljišnih izolata *Bacillus thuringiensis* poreklom iz različitih prirodno-geografskih regija Slovenije. Uzorci zemljišta prikupljeni su iz obpanonske, predalpske, primorske, dinarsko-kraške i alpske regije, sa ciljem izolacije autohtonih sporogenih bakterija. Nakon morfološke i molekularne identifikacije izolata, izdvojeni su sojevi sa potvrđenom pripadnošću vrsti *B. thuringiensis* i sa prisutnim kristalnim proteinima, a zatim je ispitana njihova aktivnost prema larvama komarca *Culex pipiens* u laboratorijskim uslovima. Cilj istraživanja bio je da se proceni da li lokalni izolati *Bt* iz zemljišta Slovenije predstavljaju perspektivan izvor biološki aktivnih sojeva za potencijalnu primenu u kontroli komaraca.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje zemljišta

Uzorci zemljišta prikupljeni su na 12 lokaliteta raspoređenih u pet prirodno-geografskih regija Slovenije: obpanonskoj, predalpskoj, primorskoj, dinarsko-kraškoj i alpskoj regiji. Uzorkovanje je obavljeno na različitim tipovima zemljišta, uključujući obradive površine, vinograde, maslinjake, šumska staništa i livade. Uzorci su uzimani sterilnom lopaticom sa dubine od 5 do 10 cm, pri čemu je alat dezinfikovao 70% etanolom nakon svakog uzorkovanja. Prikupljeno zemljište je odlagano u sterilne ZIP kese, transportovano u ručnom hladnjaku na oko 4 °C i čuvano u laboratorijskom frižideru do dalje obrade. Lokaliteti uzorkovanja bili su: Ankaran, Podvrh, Kojsko, Koper, Cerovec, Studenec, Hruševica, Kočevje, Kamnik, Kranjska Gora, Maribor i Verače.

Izolacija bakterijskih sojeva iz zemljišta

Za izolaciju sporogenih bakterija iz zemljišta primenjena je modifikovana metoda po Travers i sar. (1987). Jedan gram zemljišta suspendovan je u 9 ml sterilnog fosfatnog pufera, homogenizovan vorteksiranjem, a zatim termički tretiran u vodenom kupatilu na 80 °C tokom 20 min, kako bi se eliminisale vegetativne forme bakterija i selektivno favorizovale sporogene vrste roda *Bacillus*. Nakon termičke obrade, 100 µL suspenzije zasejavano je na LB agar sa dodatkom ampicilina u koncentraciji od 100 µg/mL, a ploče su inkubirane 24 h na 30 °C.

Porasle kolonije podvrgnute su bojenju po Gramu radi potvrde gram-pozitivne, štapičaste morfologije tipične za rod *Bacillus*. Preparati su analizirani svetlosnim mikroskopom pri uveličanju 1000× uz primenu imerzionog ulja. Kao kandidati za *Bacillus thuringiensis* izdvojene su kolonije mlečno-bele do neprozirne boje, hrapave površine, nepravilnih ivica, ravne ili blago konveksne, uz mikroskopski potvrđenu gram-pozitivnu štapičastu morfologiju sa mogućom prisutnošću endospora. Na ovaj način iz uzoraka zemljišta dobijeno je ukupno 77 izolata, koji su dalje korišćeni za molekularnu identifikaciju i karakterizaciju.

Izolacija DNK i molekularna identifikacija izolata

Genomska DNK izolovana je iz svih bakterijskih izolata korišćenjem komercijalnog kompleta ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, SAD), prema uputstvu proizvođača. Kvalitet i koncentracija DNK provereni su spektrofotometrijski određivanjem odnosa A260/A280, a po potrebi i elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Izolovana DNK čuvana je na -20 °C do dalje analize.

Za molekularnu identifikaciju korišćen je 16S rRNA gen kao standardni filogenetski marker bakterija. PCR reakcije izvođene su u ukupnoj zapremini od 25 µL i sadržavale su 12,5 µL DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix, po 0,5 µM univerzalnih prajmera 27F i 1492R, 1–2 µL šablonske DNK i sterilnu dejonizovanu vodu do konačne zapremine. Uslovi amplifikacije obuhvatali su inicijalnu denaturaciju na 95 °C tokom 3 min, zatim 35 ciklusa denaturacije na 95 °C tokom 30 s, annealing na 55 °C tokom 30 s i elongaciju na 72 °C tokom 1 min, uz završnu ekstenziju na 72 °C tokom 7 min. PCR produkti provereni su elektroforezom u 1% agaroznom gelu, a očekivana veličina amplikona bila je oko 1500 bp.

Očišćeni PCR produkti poslani su na sekvenciranje u laboratoriju MacroGen Inc. Dobijene sekvence analizirane su vizuelnom inspekcijom elektroferograma u programu FinchTV, zatim obrađene i poravnate u softveru MEGA 12, a taksonomska identifikacija izvršena je BLAST analizom u okviru NCBI baze podataka. Na osnovu visoke identičnosti sekvenci sa referentnim zapisima, 16 izolata potvrđeno je kao *Bacillus thuringiensis*.

Sporulacija, detekcija kristalnih proteina i selekcija sojeva

Šesnaest molekularno potvrđenih izolata *B. thuringiensis* podvrgnuto je daljoj fiziološkoj karakterizaciji radi procene sposobnosti sporulacije i produkcije

kristalnih proteina. Sojevi su uzgajani na T3 sporulacionoj podlozi. Bakterije su inokulisane u tečnu T3 podlogu i inkubirane u termošejkeru na 30 °C tokom 72 h pri 120 rpm.

Nakon inkubacije izvršeno je određivanje broja spora serijskim razblaženjima u sterilnom fiziološkom rastvoru (0,85% NaCl), zasejavanjem po 100 µL odgovarajućih razblaženja na nutritivni agar i naknadnim određivanjem broja kolonija, izraženog kao CFU/mL. Prisustvo kristalnih proteinskih inkluzija proveravano je bojenjem sa Coomassie Brilliant Blue. Preparati su pripremani centrifugiranjem kultura, nanošenjem taloga na predmetna stakla, fiksacijom plamenom i bojenjem 0,1% rastvorom Coomassie Brilliant Blue R-250 u 40% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini tokom 5 min. Nakon ispiranja, preparati su posmatrani mikroskopom sa tamnim poljem. Karakteristični bipiramidalni kristali uočeni su kod devet izolata, koji su zatim odabrani za biotestove. Odabrani izolati bili su: Bt-6, Bt-13, Bt-20, Bt-25, Bt-26, Bt-28, Bt-46, Bt-68 i Bt-70.

Biotest na larvama komarca *Culex pipiens*

Larve komaraca *Culex pipiens* dobijene su iz prirodne populacije. U dvorištu Instituta postavljene su tri plastične posude sa vodom u koje je dodat suvi biljni materijal (seno) radi privlačenja ženki za polaganje jaja. Nakon pojave čunića jaja na površini vode, one su pažljivo sakupljane i prenošene u laboratoriju. Svaki čunić stavljen je u zasebnu posudu sa destilovanom vodom, a izležene larve hranjene su hranom za akvarijumske ribice SERA Vipan.

U biotestovima su korišćene larve drugog razvojnog stadijuma (L_2). Po 25 larvi postavljano je u plastične čaše sa po 200 ml destilovane vode. U svaku čašu dodavano je po 10 µL tečne suspenzije jednog od devet izabranih Bt izolata, pri koncentraciji od 1×10^8 ćelija/ml. Ogled je za svaki izolat postavljen u četiri ponavljanja, dok je negativnu kontrolu činila destilovana voda bez dodatka bakterijske suspenzije, a pozitivna kontrola je bila sa poznatim sojem *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Smrtnost larvi praćena je u intervalima od 24 h do trenutka prelaska larvi u stadijum lutke, nakon čega više nisu bile podložne dejstvu bakterijskih toksina.

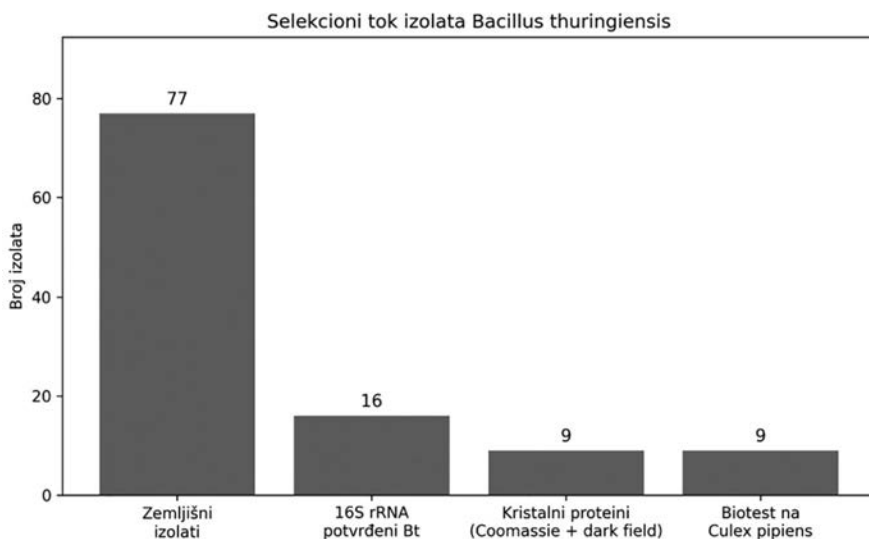
Morfološka determinacija larvi vršena je na jedinkama četvrtog larvenog stadijuma (L_4), na osnovu standardnih determinacionih ključeva za familiju *Culicidae*, uz praćenje dijagnostičkih karakteristika kao što su sifon i raspored seta na abdominalnim segmentima. Morfološka identifikacija dodatno je potvrđena molekularnom analizom primenom DNA barcodinga, amplifikacijom COI (cytochrome c oxidase subunit I) gena. U tu svrhu korišćeni su univerzalni prajmeri LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') i HCO2198 (5'-TA-AACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), čime je potvrđena pripadnost ispitivanih larvi vrsti *Culex pipiens*.

Statistička obrada podataka

Podaci o smrtnosti larvi *Culex pipiens* izraženi su kao procenat uginulih jedinki po ponavljanju, pri čemu je jedno ponavljanje predstavljala jedna eksperimentalna čaša sa 25 larvi. Za svaki tretman korišćena su četiri ponavljanja. Kumulativna smrtnost praćena je tokom 1., 2., 3., 5. i 7. dana nakon tretmana, a za statističku obradu korišćene su vrednosti finalne smrtnosti sedmog dana. S obzirom na to da podaci nisu zadovoljavali pretpostavke normalne raspodele i homogenosti varijansi, razlike između tretmana analizirane su neparametarskim Kruskal-Wallis testom. Jačina efekta procenjena je izračunavanjem epsilon-kvadrat (ϵ^2) koeficijenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD), a nivo statističke značajnosti postavljen je na $p < 0,05$.

REZULTATI

Iz ukupno 77 bakterijskih izolata dobijenih iz uzoraka zemljišta, molekularnom identifikacijom 16S rRNA gena potvrđeno je 16 izolata vrste *Bacillus thuringiensis*. Nakon ispitivanja sporulacije i prisustva kristalnih proteinskih inkluzija, devet izolata (Bt-6, Bt-13, Bt-20, Bt-25, Bt-26, Bt-28, Bt-46, Bt-68 i Bt-70) odabrano je za biotestove na larvama *Culex pipiens*. Tok selekcije izolata prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Selekcioni tok izolata

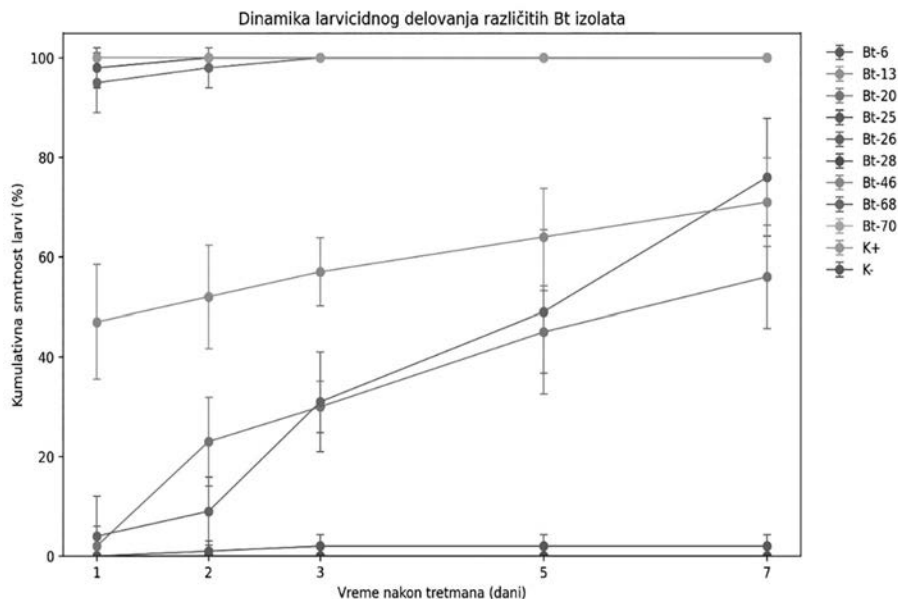
Biotestovi su pokazali izražene razlike u larvicidnoj aktivnosti između ispitivanih izolata. Najveću efikasnost pokazali su Bt-25, Bt-68 i Bt-70, koji su izazvali 100% smrtnost larvi do kraja ogleda, pri čemu su Bt-70 i pozitivna kontrola (*B. thuringiensis* var. *israelensis*) dostigli potpunu smrtnost već prvog dana. Izolat Bt-25 je prvog dana izazvao 98,0% smrtnosti, a Bt-68 95,0%, dok su oba dostigla 100% smrtnost najkasnije do trećeg dana. Izolati Bt-20, Bt-26 i Bt-46 pokazali su delimičnu do visoku larvicidnu aktivnost, sa finalnom smrtnošću od 56,0%, 76,0% i 71,0%, respektivno. Nasuprot tome, Bt-6, Bt-13 i Bt-28 nisu pokazali larvicidni efekat, slično negativnoj kontroli, kod koje je zabeležena minimalna prirodna smrtnost od 2,0%.

Statistička analiza pokazala je da su razlike između tretmana u finalnoj smrtnosti bile visoko značajne (Kruskal-Wallis test: $H=42,08$; $p<0,001$), što potvrđuje izraženu varijabilnost larvicidnog potencijala među ispitivanim zemljišnim izolatima *B. thuringiensis*. Dinamika kumulativne smrtnosti po danima prikazana je u Tabeli 1 i na Slici 2, gde se jasno izdvajaju brzo i potpuno efikasni izolati (Bt-25, Bt-68 i Bt-70), izolati sa srednjim efektom (Bt-20, Bt-26 i Bt-46), kao i neaktivni izolati (Bt-6, Bt-13 i Bt-28).

Tabela 1. Kumulativna smrtnost larvi *Culex pipiens* (%) po danima nakon tretmana različitim izolatima *Bacillus thuringiensis*

Tretman	1. dan	2. dan	3. dan	5. dan	7. dan
Bt-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bt-13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bt-20	2,0	23,0	30,0	45,0	56,0
Bt-25	98,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Bt-26	4,0	9,0	31,0	49,0	76,0
Bt-28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bt-46	47,0	52,0	57,0	64,0	71,0
Bt-68	95,0	98,0	100,0	100,0	100,0
Bt-70	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
K+	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
K-	0,0	1,0	2,0	2,0	2,0

Dobijeni rezultati ukazuju da među zemljišnim izolatima *B. thuringiensis* iz Slovenije postoje sojevi sa veoma izraženim larvicidnim potencijalom prema *Culex pipiens*, pri čemu se kao najperspektivniji izdvajaju Bt-25, Bt-68 i Bt-70.



Slika 2. Dinamika larvicidnog delovanja

DISKUSIJA

Dobijeni rezultati potvrđuju da među zemljišnim izolatima *Bacillus thuringiensis* postoje značajne razlike u larvicidnoj aktivnosti prema *Culex pipiens*. Ovakva varijabilnost je očekivana, jer insekticidni potencijal Bt sojeva zavisi od prisustva, kombinacije i ekspresije različitih Cry i Cyt toksina, koji određuju i spektar delovanja i brzinu uginuća larvi. Kod komaraca je naročito značajna grupa dipterocidnih toksina karakterističnih za *B. thuringiensis* var. *israelensis*, čije sinergističko delovanje omogućava visoku efikasnost i brzo ispoljavanje efekta.

U ovom istraživanju posebno su se izdvojili izolati Bt-25, Bt-68 i Bt-70, koji su izazvali potpunu smrtnost larvi, pri čemu je Bt-70 pokazao efekat uporediv sa pozitivnom kontrolom već u prva 24 h. Takav nalaz ukazuje da pojedini lokalni izolati mogu posedovati visok potencijal za dalju karakterizaciju i eventualnu primenu u biološkoj kontroli komaraca.

Sa druge strane, deo izolata u ovom radu nije pokazao aktivnost ili je ispoljio samo delimičan efekat. To je takođe u skladu sa literaturom, jer prisustvo kristalnih proteina samo po sebi ne mora značiti i visok nivo larvicidne aktivnosti prema dipterama. Razlike mogu biti posledica različitog toksinskog profila, količine sintetisanih toksina, njihove rastvorljivosti u digestivnom traktu larvi, kao i međusobnih sinergističkih ili antagonističkih odnosa među toksinima. Zbog toga bi sledeći korak u proceni najaktivnijih izolata trebalo da obuhvati detaljniju molekularnu karakterizaciju toksinskih gena, kvantifikaciju njihove ekspresije i određivanje letalnih koncentracija u standardizovanim bioesejima.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da među zemljišnim izolatima *Bacillus thuringiensis* poreklom iz različitih regija Slovenije postoje sojevi sa izraženim larvicidnim potencijalom prema *Culex pipiens*. Od ukupno 77 izolata iz zemljišta, 16 je molekularno potvrđeno kao *B. thuringiensis*, dok je devet izolata posedovalo kristalne proteine i bilo uključeno u biotestove. Kao najperspektivniji izdvojili su se izolati Bt-25, Bt-68 i Bt-70, koji su pokazali potpunu smrtnost larvi, pri čemu je Bt-70 delovao jednako brzo i efikasno kao pozitivna kontrola. Dobijeni rezultati ukazuju da lokalni Bt izolati predstavljaju značajan resurs za dalja istraživanja i potencijalni razvoj bioloških larvicida za kontrolu komaraca.

Zahvalnica

Ovaj rad je nastao u okviru projekta „*Isolation, molecular identification and bioassays of local strains of Bacillus thuringiensis for the development of biological insecticides*”, koji je finansiran od strane Razvojnog stebra financiranja (RSF) Kmetijskega Inštituta Slovenije i Javne agencije za znanstvenoraziskovalnu in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS). Autor izražava zahvalnost svim saradnicima koji su doprineli realizaciji istraživanja, kao i institucijama koje su omogućile sprovođenje eksperimentalnog rada.

LITERATURA

1. Benelli, G. (2016). Biological control of mosquito vectors: Past, present, and future. *Insects*, 7(4), 52.
2. Benelli, G., & Beier, J. C. (2017). Current vector control challenges in the fight against malaria. *Acta Tropica*, 174, 91–96.
3. Brugman, V. A., Hernández-Triana, L. M., England, M. E., Medlock, J. M., Mertens, P. P. C., Logan, J. G., Wilson, A. J., & Fooks, A. R. (2018). The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(2), 389.
4. Cholvi M, Moretti R, Osório HC, L'Ambert G, Seixas G, Kavran M, Michaelakis A, Stephanou AS, Antoniou CP, Martinou AF, Roiz D, Calvitti M, Bueno-Marí R. Present and Future of Mosquito-Borne Disease Control in Europe with a Specific Focus on the Mediterranean. *Insects*. 2026 Feb 27;17(3):254. doi: 10.3390/insects17030254. PMID: 41898916; PMCID: PMC13026866.
5. Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., & Marm Kilpatrick, A. (2011). "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1577–1585.
6. Hong, G., Wang, J., Hu, X., Liu, J., & Chen, X. (2025). Microbiological control for mosquito larvae: Current progress and future perspectives. *Virulence*, 16(1), 245–268.
7. Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2 Suppl), 133–163.
8. Ma, X., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, J., Zhu, Y., & Li, P. (2023). New native *Bacillus thuringiensis* strains induce high insecticidal action against *Culex pipiens pallens* larvae and adults. *BMC Microbiology*, 23, 100.
9. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., & Vargas-Osuna, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325.

10. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775–806.
11. Silva-Filha, M. H. N. L., Berry, C., & Federici, B. A. (2021). Bacterial toxins active against mosquitoes: Mode of action and resistance. *Insects*, 12(6), 523.
12. Travers, R. S., Martin, P. A. W., & Reichelderfer, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1263–1266.