Научная статья
УДК 579.852.11:57.047
DOI: 10.37102/0869-7698_2022_225_05_8

Антибиотическая активность метаболитов *Bacillus thuringiensis* в отношении бактерий и грибов

А.А. Артемов

Артемов Александр Александрович
аспирант, младший научный сотрудник
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия
arsanya@mail.ru
http://orcid.org/0000-0003-1156-9713

Аннотация. Проведено детальное изучение антибиотического действия метаболитов штаммов *B. thuringiensis* на патогенные бактерии/грибы различных таксономических групп. Осуществлена оценка антибиотической активности водорастворимых метаболитов и белков параспоральных кристаллов штаммов *B. thuringiensis* в отношении патогенных бактерий/грибков и плесневых грибов. Подобраны условия культивирования исследуемых штаммов для продукции антибиотических субстанций. Обнаружена антибиотическая активность метаболитов *B. thuringiensis* в отношении микроорганизмов кишечной группы *Salmonella thyphimurium* 2606, *Shigella sonnei* 32 и *Escherichia coli* ATCC 25922, фитопатогенного штамма *Xantomonas malvacearum*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и ингибирующее и замедляющее действие на рост *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*, а также тест-штаммов грибов. Полученные данные позволяют прогнозировать создание на их основе антибиотических препаратов таргетированного действия на патогенные микроорганизмы конкретной таксономической принадлежности.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, *Bt*, антибиотическая активность, дельта-эндотоксин, параспоральные белки, ПСБ

Для цитирования: Артемов А.А. Антибиотическая активность метаболитов *Bacillus thuringiensis* в отношении бактерий и грибов // Вестн. ДВО РАН. 2022. № 5. С. 102–110. http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_8.

© Артемов А.А., 2022

Original article

Antibiotic activity of *Bacillus thuringiensis* metabolites against intestinal bacteria and fungi

A.A. Artemov

Alexander A. Artemov
Post-graduate student, Junior Researcher
State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia
arsanya@mail.ru
http://orcid.org/0000-0003-1156-9713

Abstract. A detailed study of the antibiotic effect of metabolites of *B. thuringiensis* strains on pathogenic bacteria/fungi of various taxonomic groups was carried out. The antibiotic activity of water-soluble metabolites and proteins of parasporal crystals of *B. thuringiensis* strains against pathogenic bacteria/fungi and molds was assessed. The cultivation conditions of the studied strains for the production of antibiotic substances were selected. Antibiotic activity of *B. thuringiensis* metabolites against microorganisms of the intestinal group *Salmonella thyphimurium* 2606, *Shigella sonnei* 32 and *Escherichia coli* ATCC 25922, phytopathogenic strain *Xantomonas malvacearum*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and inhibitory and retarding effect on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, as well as test strains of fungi was revealed. The data obtained make it possible to predict the creation on their basis of antibiotic preparations with targeted action on pathogenic microorganisms of a specific taxonomic affiliation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Bt*, antibiotic activity, delta-endotoxin, parasporal proteins, PBP

For citation: Artemov A.A. Antibiotic activity of *Bacillus thuringiensis* metabolites against intestinal bacteria. *Vestnik of the FEB RAS.* 2022;(5):102–110. (In Russ.). http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_8.

Введение

Экологической безопасности агропромышленных технологий в мире уделяется все больше внимания [1, 2]. Внедряется практика обновления требований к химическим препаратам вследствие нацеленности на снижение их отрицательного влияния на окружающую среду [3]. Практикуется также их частичная замена биологическими агентами аналогичного действия, в частности бактериальными инсектицидами [4]. Однако в России данная тенденция не прослеживается. Напротив, начиная с 2010 г. здесь отмечается рост производства пестицидов, в том числе в 2020 г. – на 30,4 % [5, 6].

Биопрепараты создаются в основном посредством культивирования микроорганизмов без дополнительной очистки действующих продуцируемых клетками компонентов, из них 90 % коммерческих инсектицидных средств разработано на основе *Bt* (аэробной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis)* [7]. Поэтому готовый продукт содержит побочные компоненты (споры, клетки, токсины). Предотвратить загрязнение продукции и окружающей среды последними позволяет создание средств на основе очищенных биологически активных веществ. Промышленное производство антибиотиков основано

на выращивании микроорганизмов – продуцентов антибиотических субстанций в строго определенных условиях [8]. Так, штаммы аэробной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt,* открыт Ишиватари Сигетане, 1902 г.) выделяют в процессе роста белковые дельта-эндотоксины с молекулярной массой 30–130 кДа [9]. Представителями *Bt* продуцируют дельта-эндотоксины, которые выделены в кристаллическом виде. Соединения относятся к семейству гомологичных белков с избирательным инсектицидным действием, неактивных в отношении теплокровных организмов [10]. Спорово-кристаллические субстанции *Bt* на 90–95 % составляют рынок биопрепаратов против насекомых [11], а очищенные дельта-эндотоксины практически не применяются. Описано действие штаммов *Bt* против фитопатогенных бактерий и грибов [12], а также антимикробная активность растворов дельта-эндотоксинов *Bt* [13].

Цель настоящей работы – детальное изучение антибиотического действия метаболитов штаммов *B. thuringiensis* на патогенные бактерии/грибы различных таксономических групп.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *Bt* и штаммы для анализа их антагонистической активности. *Исследуемые штаммы Bt*: типовые штаммы – 3 подвида *Bt* ssp. *Galleriae* B-1275*, Bt* ssp. *Kurstaki* B-1276*, Bt* ssp. *Finitimus* B-1274; атипичные штаммы – *Bt* B-1272 и *Bt* B-1273, выделенные из образцов термальных полей Долины гейзеров (Камчатка) с неустановленным серотипом. *Тестовые культуры, в отношении которых проводилась оценка антибиотической активности*: патогенные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* B-1295*, Staphylococcus aureus* B-1266*, Proteus mirabilis* 392; представитель нормальной микрофлоры кишечника *Enterococcus faecium* 7171; тест-штаммы бактерий – *Salmonella thyphimurium* 2606, *Shigella sonnei* 32*, Bacillus subtilis* 6644*, E. Coli* 6645 (рекомендованы Государственной фармакопеей РФ для определения антибиотических свойств лекарственных препаратов); фитопатогенный штамм *Xanthomonas malvacearum* B-137; возбудитель кандидоза *Candida albicans*; плесневые грибы *Penicillium* sp. F-6, *Verticillium lecani* F-8*, Trichoderma viride* F-9, *Chrysonilia sitophila* 4.

Исследованные штаммы поддерживаются в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ГНЦ ВБ «Вектор». Причины выбора плесневых грибов, используемых в работе: 1) виды, относящиеся к несовершенным грибам *Fungi imperfecti,* вызывают порчу хлеба: *Chrysonilia sitophila* (N. Montagne, A. Léveillé в 1848 г.), а *Penicillium* (Link, 1809 г.) выделен в процессе работы из пораженного плесенью лука; 2) *Verticillium lecani* (Zimmerman, 1899) – энтомопатогенный гриб, применение которого обеспечивает эффективную защиту культур закрытого грунта от тепличной белокрылки/широкого спектра видов тлей (взят для тестирования совместного его использования с *Bt*); 3) *Trichoderma viride* (Pers, 1794) конкурирует в субстрате за питание с другими грибами, способен тормозить развитие мицелия конкурентов своими выделениями и питаться непосредственно их мицелием, проявляя явные патогенные свойства. Кроме патогенных бактерий в качестве тест-культуры использован *Enterococcus faecium* (Orla-Jensen, 1919) штамм 7171, входящий в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта человека. Отсутствие бактерии в кишечнике опасно из-за повышения вероятности гибели от инфекции, но при избыточной активности данный энтерококк может выступать причиной различных заболеваний. Штамм *Proteus mirabilis* (Hauser, 1885) – условно-патогенный возбудитель инфекций мочеполовых органов, приводящих к развитию простатита, цистита, пиелонефрита.

В ходе работы для субкультивирования бактериальных культур использовали рыбно-пептонный агар (РПА) НПО «Микроген» МЗ РФ; жидкую/агаризованную среду LB «Difco», США (pH 7,0–7,2). Дрожжи/плесневые грибы выращивали на среде Сабуро (г/л): пептон – 10, глюкоза – 40, агар – 18 (pH 5,4). При наработке биомассы *Bt* культивирование

проводили на термостатированой качалке КТ 104 (Россия) с использованием жидкой среды LB и картофельной среды (КС) с pH 7,0–7,2: пептон – 0,1 %, K_2HPO_4 – 0,04 %; агар – 1,9 %, картофельный отвар – до 1 л, с добавлением глюкозы и $MnSO_4$ в объеме 0,5 и 0,1 % соответственно.

Антимикробные свойства водорастворимых секретируемых метаболитов штаммов *Bt* определяли методом отсроченного антагонизма [14]. Для оценки антибиотических свойств культуральной жидкости (КЖ) клетки штаммов *Bt* культивировали в жидкой среде LB или КС при 30 °С в течение 36–48 ч. Далее КЖ освобождали от клеток/спор центрифугированием и ультрафильтрацией с применением нитроцеллюлозных фильтров (диаметр пор 0,22 мкм). Антибиотическую эффективность КЖ *Bt* (водорастворимых метаболитов) и специально очищенных растворов δ-эндотоксинов оценивали, применяя метод «колодцев» [15] (табл. 1).

Таблица 1

Применение метода «колодцев» для оценки антибиотической активности

Этап методики	КЖ	Растворы дельта-эндотоксинов
Подготовка	Тестируемые культуры засевали на агаровые пластины, в которых проделывали лунки и вносили в них 50–100 мкл стерилизованной фильтрованием КЖ или растворы бактериальных белковых токсинов, предварительно очищенных от клеточной биомассы. Концентрация последних составляла 50–60 мкг/мл (определена на спектрофотометре СФ-46, Россия, при 280 нм)	
Анализ антибиотической активности	Инкубацию выполняли при 30–37 °С в течение 24–72 ч, далее определяли степень подавления роста тестовых культур	Инкубацию выполняли при 30 °С 24 ч. Далее оценивали диаметр зон подавления роста тестовых культур в сравнении с контролем, в котором использовали чистый 1/15 М фосфатный буфер (pH 7,8), примененный ранее для растворения белковых токсинов

Для приготовления растворов белков параспоральных включений культуры выращивали 2–4 сут. на термостатированной качалке в колбах объемом 500 мл со 100–200 мл КС (200 об./мин, при 30 °С). Выполняли фазово-контрастное микроскопирование КЖ с целью подсчета количественного соотношения вегетативных/спорулирующих клеток. При значительном преобладании последних, а именно при наличии сформированных зрелых спор и параспоральных включений, КЖ центрифугировали для удаления супернатанта. Промывку биомассы выполняли дистиллированной водой, 1 М NaCl и трехкратно дистиллированной водой, клетки осаждали на центрифуге JA-21 (Beckman, USA) в течение 20 мин при скорости 8000 об./мин, температуре 2–4 °С. Схема экстрагирования параспоральных включений и активации белковых токсинов с последующим их выделением представлена на рис. 1. Известно, что параспоральные протоксины трансформируются в токсины под действием протеиназ, которые соединены с решеткой параспоральных кристаллов [16].

Рис. 1. Схема экстрагирования параспоральных включений и активации белковых токсинов с последующим их выделением

Последний этап выделения параспоральных белков (ПСБ) занимал 30 мин, осаждение проводили на центрифуге JA-21 (Beckman, USA), ресуспендирование – в 1/15 М-фосфатном буфере (pH 7,8).

Электрофоретические исследования белков КЖ проводили по методу Laemmli [17], протеиновые фракции сравнивали с маркерами молекулярной массы (Bio-Rad, США). Фракции компонентов КЖ получали посредством гель-хроматографии на Fractogel HW 50F в 0,15 М NaCl. Объем пробы – 300 мкл. Скорость элюции 0,3 мл/мин. Фракции собирали каждые 3 мин.

Результаты и их обсуждение

Предварительное исследование антибиотической активности штаммов *Bt* В-1274, В-1272, В-1273 методом отсроченного антагонизма показало, что наиболее выраженный ингибирующий эффект наблюдается в связи с отсутствием ростовой активности *Candida albicans.* В отношении последнего слабовыраженное антибиотическое влияние штамма *Bt* В-1275 наблюдали только в самом начале штриха (ослабление на 15 мм). В отношении *E. faecium, S. aureus* наблюдалось только некоторое ослабление роста на 22 и 2,5 мм штриха для штамма В-1275 соответственно и на 25 мм – в отношении первой культуры для В-1274. Относительно кишечной группы бактерий штаммы *Bt* были более эффективны. Выяснено, что метаболиты, продуцируемые *Bt* В-1272 и *Bt* В-1273, подавляют рост трех микроорганизмов кишечной группы – *Salmonella thyphimurium* 2606, *Shigella sonnei* 32 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Рост фитопатогена *Xantomonas malvacearum* В-137 и культуры *Bacillus subtilis* ATCC 6633 угнетается культурами *Bt* В-1274 и В-1275 соответственно. Последний штамм также проявляет антибиотическую активность в отношении *Salmonella thyphimurium* 2606 и *Shigella sonnei* 32 (табл. 2).

Таблица 2

Антибиотическое действие метаболитов *Bt*

Штамм *Bt*	*S. thyphimurium* 2606	*S. sonnei* 32	*E. coli* ATCC 25922	*B. subtilis* ATCC 6633	*X. malvacearum* В-137
В-1274	–	–	+	–	+
В-1275	+	+	–	+	–
В-1272	+	+	+	–	–
В-1273	+	+	+	–	–

Примечание: +/– – наличие/отсутствие зоны угнетения роста. Серым цветом выделены результаты с наличием зоны угнетения роста.

Диффузионным методом «колодцев» установлено наличие антибиотического действия метаболитов *Bt*, растворенных в КЖ, на штаммы плесневых грибов. Все используемые в работе культуры *Bt* устраняют рост мицелия *T. Viride* F-9 и значительно угнетают таковой у гриба *V. Lecanii* F-8. В случае плесневого гриба *Penicillium* sp. F-6 только штамм *Bt* В-1276 полностью ингибирует ростовую активность тестовой культуры в результате продуцирования метаболитов с фунгицидной активностью.

Фракционирование КЖ после культивирования штаммов *Bt* выполнялось для разделения антибиотических продуцируемых белков посредством гель-хроматографии (одного из наиболее простых/воспроизводимых фракционных методов). Показано, что профили элюции компонентов (рис. 2), различаясь в деталях, схожи между собой у всех пяти исследуемых штаммов. При сравнении электрофореграмм белковых компонентов КЖ штаммов *Bt* (рис. 3) видно, что для конкретного штамма характерен особый набор белков. Установлено, что по молекулярным массам секретируемые метаболиты сосредоточены в пределах 10–75 кДа. При культивировании штаммов *Bt* в среде LB процесс споруляции/образования кристаллов белков происходит с низкой скоростью или отсутствует, а в среде КС

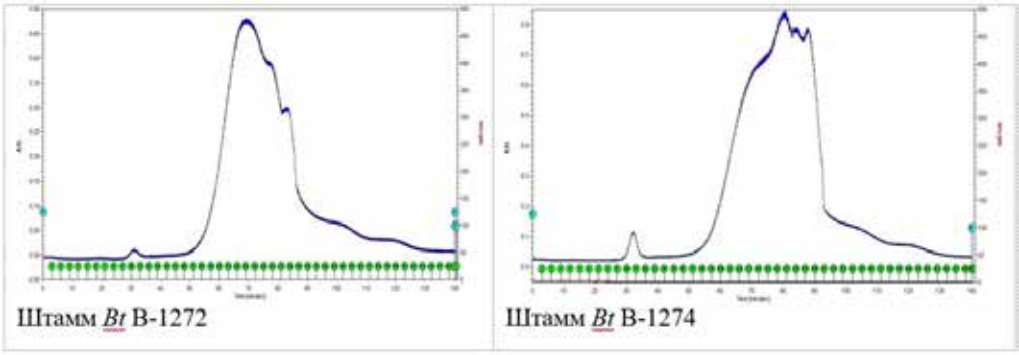

Рис. 2. Профили элюции секретируемых компонентов КЖ штаммов *Bt* на Fractogel TSKHW 50F в 0,15 М NaCl, 0,05 М трис- HCl, pH 7,4, зарегистрированные по поглощению света в ультрафиолетовой области при длине волны 280 нм

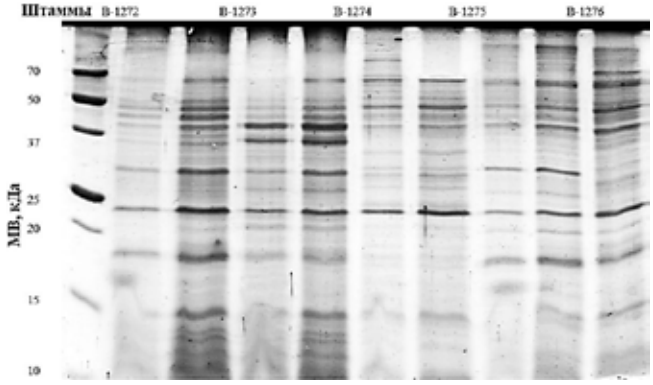

Рис. 3. Электрофореграмма белков штаммов *Bt,* секретируемых в культуральную среду. Примечание: для всех образцов, кроме В-1276, взято по две пробы различного объема. МВ – молекулярный вес

вышеуказанные явления наблюдаются уже на вторые сутки, что согласуется с известными литературными данными [16]. Схема культивирования штаммов *Bt* в жидких питательных средах для определения антибиотической активности растворов параспоральных белков представлена на рис. 4.

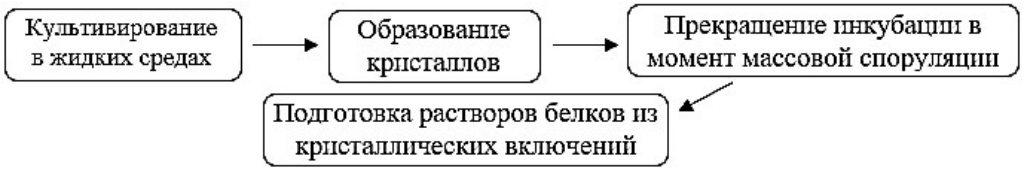

Рис. 4. Схема культивирования штаммов *Bt* в жидких питательных средах для определения антибиотической активности растворов параспоральных белков

Выявлено, что штаммы *Bt* В-1274 и *Bt* В-1275 на обеих средах образуют морфологически сходные кристаллы, а В-1272 и В-1273 на среде КС – не только одиночные компактные кристаллические образования, как при культивировании на РПА и LB, но и гроздья/цепочки разных конфигураций и размеров (рис. 5).

Штаммы *Bt* в дальнейшем культивировали на среде КС в связи с более эффективным образованием кристаллов белка до достижения 95–100 % споруляции, далее готовили растворы ПСБ (см. раздел «Материалы и методы»). В результате тестирования

Рис. 5. Морфология кристаллов параспоральных включений штаммов *Bt* в зависимости от среды культивирования. КС – картофельная среда

антибиотической активности по диффузионному методу «колодцев» выявлено, что рост плесневых грибов в опытных вариантах в сравнении с контролем был угнетен (табл. 3), в зоне нанесения растворов белков был замедлен процесс споруляции.

Таблица 3

Определение антибиотической активности растворов ПСБ штаммов *Bt*

Тест-штамм	Контроль роста	Растворы ПСБ пяти штаммов
V. lecani F-8, *Penicillium* sp. F-6, *T. viride* F-9	+++	++
C. albicans	+++	+++
P. mirabilis, *M. smegmatis*	++	+
E. faecium, *M. lysodekticus*	+++	±
S. aureus	+++	10*

*Диаметр зоны лизиса, мм.

Примечание: рост +++ типичный активный, ++ умеренный (споруляция подавляется в зоне нанесения растворов ПСБ), + ослабленный, ± следовый тест-штамма. Рост оценивали по всей поверхности агара. Серым цветом помечены данные по наиболее выраженной антибиотической активности.

В случае *Chrysonilia sitophila* 4 и *S. aureus* через 7 сут. наблюдения четко просматривались зоны их лизиса вокруг лунок с растворами ПСБ для всех штаммов *Bt*. Культуры *M. Smegmatis / P. mirabilis* и *E. Faecium* / *M. lysodekticus* характеризовались соответственно более слабым ростом и его полным отсутствием в сравнении с контрольным высевом. При исследовании роста большинства тестовых культур сходный результат получен для всех исследуемых штаммов. Только при исследовании роста *C. sitophila* 4 для пяти штаммов *Bt* выявлены различные результаты: В-1274 – (+); В-1276 – 20; В-1275 – 22; В-1272 – 20; В-1273 – (+). Контроль роста – (+++).

Заключение

Таким образом, наличие избирательности антагонистической активности ПСБ и водорастворимых метаболитов исследуемых штаммов *Bt* по отношению к штаммам бактерий, дрожжей и грибов позволяет прогнозировать создание на их основе антибиотических препаратов таргетированного действия на патогенные микроорганизмы конкретной таксономической принадлежности. Показано, что водорастворимые метаболиты КЖ штаммов *Bt* проявили антибиотическую активность относительно микроорганизмов кишечной группы *Salmonella thyphimurium* 2606, *Shigella sonnei* 32 и *Escherichia coli* АТСС 25922. Угнетение роста фитопатогенной бактерии *Xantomonas malvacearum* В-137 и *Bacillus subtilis* АТСС 6633 отмечено при исследовании противомикробной активности штаммов *Bt* В-1274 и *Bt* В-1275 соответственно. Последний проявлял также антибиотическую активность относительно патогенов *Salmonella thyphimurium* 2606 и *Shigella sonnei* 32.

Выявлены фракции КЖ, компоненты которых проявили выраженную антимикробную активность, направленную наиболее эффективно относительно плесневых грибов. Выявлено ингибирующее действие растворов ПСБ штаммов *Bt* В-1272 и *Bt* В-1273 на рост тест-штаммов *S. aureus* и *C. albicans*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Дусыева Я.О. Экологические проблемы в области правового регулирования агропромышленного комплекса в Российской Федерации // Молодой ученый. 2018. № 4 (190). С. 89–93.
2. Савкин В.И. Экологическая безопасность как приоритетное направление развития АПК России // Национальные интересы: приоритеты и безопасность. 2008. № 10. С. 31–35.
3. Гашко Е.С., Почтовик Е.С., Гучева Н.В. Способы снижения остаточного содержания пестицидов в зерне // Молодой исследователь Дона. 2017. № 6 (9). С. 13–21.
4. Chattopadhyay P., Banerjee G., Mukherjee S. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system // 3 Biotech. 2017. Vol. 7, N 1. P. 60.
5. Захаренко В.А. Рынок пестицидов в России и перспективы его развития // Защита и карантин растений. 2014. № 11. С. 3–6.
6. Рынок минеральных удобрений и средств защиты растений // Дайджест ключевых публикаций в СМИ. 2020. № 6. 28 с.
7. Авдеенко И.А., Сочинская О.Н. Биоинсектициды в сельском хозяйстве // Науч.-метод. электрон. журн. «Концепт». 2016. Т. 11. С. 896–900. http://e-koncept.ru/2016/ (дата обращения: 15.08.2016).
8. Романов Г.А. Генетическая инженерия растений и пути решения проблемы биобезопасности // Физиол. растений. 2000. Т. 47, № 3. С. 343–353.
9. Каменёк Л.К. Выделение и очистка кристаллов эндотоксина *Bacillus thuringiensis* // Микробиологические методы борьбы с вредителями растений: науч.-техн. бюл. Новосибирск, 1980. Вып. 2 (36). С.14–15.
10. Каменёк Л.К. Структура, свойства и механизм действия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* // Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений: сб. ст. Новосибирск, 1987. С. 42–57.
11. Каменёк Л.К. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*: строение, свойства и использование для защиты растений // Автореф. дис. … д-ра биол. наук. М., 1998. 40 с.
12. Смирнов О.В., Гришечкина С.Д. Изучение действия биопрепаратов на основе *Bacillus thuringiensis* на фитопатогенные грибы // Вестн. защиты растений. 2010. № 1. С. 27–35.
13. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учебник. 6-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. 430 с.
14. Егоров Н.С. Биотехнология: проблемы и перспективы. М.: Высш. шк., 1987. 159 с.
15. Юдина Т.Г., Бурцева Л.И. Действие дельта-эндотоксина четырех подвидов *Bacillus thuringiensis* на различных прокариот // Микробиология. 1997. Т. 66, № 1. С. 25–31
16. Честухина Г.Г., Залунин И.А., Костина Л.И., Котова Т.С. и др. Протеиназы, связанные с кристаллами *Bac. thuringiensis* // Биохимия. 1978. Т. 43, вып. 5. С. 857–864.
17. Маршелл Р.К., Инглис А.С. Определение состава белковых олигомеров. Получение мономеров и полипептидных цепей // Практическая химия белка: сб. ст. / пер. с англ.; под ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. С. 15–81.

REFERENCES

1. Dusyeva Ya.O. Ecological problems in the field of legal regulation of the agro-industrial complex in the Russian Federation. *Young scientist*. 2018;(4(190)):89-93. (In Russ.).
2. Savkin V.I. Ecological safety as a priority direction of development of the agro-industrial complex of Russia. *National interests: priorities and safety*. 2008;(10):31-35. (In Russ.).
3. Gashko E.S., Postman E.S., Gucheva N.V. Ways to reduce the residual content of pesticides in grain. *Young researcher of the Don*. 2017;(6(9)):13-21. (In Russ.).
4. Chattopadhyay P., Banerjee G., Mukherjee S. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. *3 Biotech*. 2017;7(1):60.
5. Zakharenko V.A. The market of pesticides in Russia and the prospects for its development. *Protection and quarantine of plants*. 2014;(11):3-6. (In Russ.).
6. The market of mineral fertilizers and plant protection products. *Digest of key publications in the media*. 2020;(6):28. (In Russ.).
7. Avdeenko I.A., Sochinskaya O.N. Bioinsecticides in agriculture. *Scientific and methodological electronic journal "Concept"*. 2016;11:896-900. (In Russ.).
8. Romanov G.A. Genetic engineering of plants and ways to solve the problem of biosafety. *Plant Physiology*. 2000;47(3):343-353. (In Russ.).

9. Kamenek L.K. Isolation and purification of *Bacillus thuringiensis* endotoxin crystals. *Microbiological methods of plant pest control*. Scientific and technical bulletin. Novosibirsk, 1980;(2(36)):14-15. (In Russ.).

10. Kamenek L.K. Structure, properties and mechanism of action of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin. In: *Entomopathogenic bacteria and their role in plant protection*. Novosibirsk; 1987. P. 42-57. (In Russ.).

11. Kamenek L.K. Delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis*: structure, properties and use for plant protection. Abstract of the thesis. dis. … Doctors of Biological Sciences. M.; 1998. 40 p. (In Russ.).

12. Smirnov O.V., Grishechkina S.D. Study of the effect of biological preparations based on *Bacillus thuringiensis* on phytopathogenic fungi. *Bulletin of Plant Protection*. 2010;(1):27-35. (In Russ.).

13. Egorov N.S. Fundamentals of the doctrine of antibiotics: Textbook. 6th ed., revised. and additional M.: Publishing House of Moscow State University; Nauka; 2004. 430 p. (In Russ.).

14. Egorov N.S. Biotechnology: Problems and prospects. M.: Higher school; 1987. 159 p. (In Russ.).

15. Yudina T.G., Burtseva L.I. The effect of delta-endotoxin of four subspecies of *Bacillus thuringiensis* on various prokaryotes. *Microbiology*. 1997;66(1):25-31. (In Russ.).

16. Chestukhina G.G., Zalunin I.A., Kostina L.I., Kotova T.S. et al. Proteinases associated with Bac crystals thuringiensis. *Biochemistry*. 1978;43(5):857-864. (In Russ.).

17. Marshall R.K., Inglis A.S. Determination of the composition of protein oligomers. Obtaining monomers and polypeptide chains. *Sat. Practical protein chemistry / per. from English* / ed. A. Darbre. M.: Mir; 1989; P. 15-81. (In Russ.).