На правах рукописи

ЛЕВИНА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

ОСОБЕННОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО АГЕНТА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Специальность: 03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Казань, 2005

Работа выполнена на кафедре общей и биологической химии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования Ульяновский государственный университет

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Л.К. Каменёк

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
О.Н. Ильинская
доктор биологических наук, профессор
Д.А. Васильев

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный аграрный университет

Защита состоится « 2 » *июня* 2005 года в *13.00* часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ГОУ Казанский государственный университет имени В.И.Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «_____» _____ 2005 года

Учёный секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук А.Н. Аскарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние десятилетия особо остро стоит проблема экологической безопасности технологий, применяемых в агропромышленном комплексе для повышения урожайности и улучшения качества продукции. Одним из решений данной проблемы является ужесточение требований к химическим препаратам и частичная замена их биологическими средствами. В России, однако, при очевидном сокращении объёмов производства пестицидов (с 215 тыс. тонн в 1985 году до 9,7 тыс. тонн в 2000 году) внедрение в сельскохозяйственную практику альтернативных технологий крайне невелико (не более 0,5% от общего объёма использования пестицидов) (Захаренко, 2003; Монастырский, 2003). Применяемые на сегодняшний день биопрепараты производятся преимущественно на основе целых культур микроорганизмов и содержат помимо действующего начала примесь спор, вегетативных клеток, токсинов, что нежелательно с экологической точки зрения. В этой связи особенно перспективно создание средств на основе выделенных и очищенных биологически активных веществ.

Одним из таких агентов являются кристаллические дельта-эндотоксины, продуцируемые аэробной спорообразующей бактерией *Bacillus thuringiensis*. Дельта-эндотоксины представляют собой семейство гомологичных белков, оказывающих избирательное действие на насекомых и практически неактивных в отношении теплокровных организмов (Bravo, 1997). На сегодняшний день рынок биопрепаратов на 90-95% представлен спорово-кристаллическими комплексами *B.thuringiensis* (Вершинина, Алимова, 2000). Создание препаратов на основе чистого эндотоксина позволило бы обеспечить снижение токсической нагрузки на агроценозы.

Некоторые штаммы *B.thuringiensis* описаны как активные против фитопатогенных бактерий и грибов (Marrone et al., 1999; Кандыбин, Смирнов, 1999; Смирнов, 2000; Климентова, 2001). Антимикробная активность показана также для дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis* (Егоров и соавт., 1990; Юдина, Егоров, 1996; Юдина, Бурцева, 1997; Климентова, 2001; Тюльпинева, 2003). Вышеизложенное позволяет рассматривать кристаллические белки в качестве перспективного агента защиты растений от бактериозов. Это, однако, требует детального изучения антибиотической активности дельта-эндотоксинов и их эффективности против бактериозов культурных растений.

Цель и задачи исследования.

Целью работы явилось установление и анализ антибиотического действия дельта-эндотоксина *B.thuringiensis* на фитопатогенные бактерии различных таксономических групп, а также оценка особенностей фитозащитной активности этого агента.

В соответствии с обозначенной целью нами были поставлены следующие задачи:

1. установить чувствительность некоторых грамположительных и грамотрицательных фитопатогенных бактерий к дельта-эндотоксинам *B.thuringiensis*;

2. исследовать действие эндотоксинов на респираторную активность тест-культур и окислительный синтез АТФ бактериальными клетками;

3. оценить влияние состава питательной среды на восприимчивость бактерий к действию дельта-эндотоксина *B.thuringiensis*;

4. изучить роль сукцинатдегидрогеназы как одного из ключевых ферментов дыхательной цепи в эндотоксин-резистентности бактерий (на примере рода *Pseudomonas*);

5. в лабораторно-вегетационных опытах показать антибиотическое действие дельта-эндотоксинов на возбудителей бактериозов огурца, овса и фасоли;

6. изучить влияние эндотоксинов на развитие растений и их устойчивость к заболеваниям (на примере проростков овса).

Научная новизна результатов исследований. Впервые установлено ингибирующее действие дельта-эндотоксина на рост пяти штаммов фитопатогенных бактерий в условиях олиготрофности. Показано, что грамположительные бактерии высокочувствительны к низким концентрациям дельта-эндотоксинов. Однако для этих культур характерен вторичный рост. Развитие грамотрицательных бактерий подавлялось только в присутствии высоких концентраций раствора кристаллов, вместе с тем вторичного роста культур в этом случае не происходило.

Показана зависимость активности окислительных систем фитопатогенных бактерий от качественного состава питательной среды. Впервые проведено изучение влияния дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis subsp.kurstaki*, штамм Z-52 на респираторную активность бактериальных клеток в различных условиях инкубирования: в олиготрофной синтетической среде, евтрофной среде Сабуро, в олиготрофной среде, лимитированной по ионам Cu (II).

Установлено угнетающее влияние эндотоксина на потребление неорганического фосфата бактериальными клетками, свидетельствующее о подавлении этим агентом окислительного синтеза АТФ.

Показано, что устойчивые к действию эндотоксинов диссоцианты *P.syringae* обладают повышенной активностью сукцинатдегидрогеназы по сравнению со средней активностью фермента, характерной для данных культур.

Установлена способность дельта-эндотоксинов подавлять бактериозы растений (овса, огурца, фасоли) и оказывать иммунизирующее действие (на овес).

Практическая значимость работы. Полученные результаты, демонстрирующие антибактериальное и фитопротективное действие дельта-эндотоксинов

B.thuringiensis, могут быть использованы при создании средств защиты растений и технологии их практического применения.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Всероссийской научно-практической конференции “Проблемы плодородия почв на современном этапе развития” (Пенза, 2002), VII и VIII Пущинской Международной школе-конференции молодых учёных “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2003; 2004), V Международной конференции “Математическое моделирование физических, экономических, технических и социальных систем и процессов” (Ульяновск, 2003), Региональной научно-практической конференции молодых учёных “Актуальные проблемы современного здравоохранения и экологии” (Ульяновск, 2003), Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных “Региональные проблемы народного хозяйства” (Ульяновск, 2004), XIII Международной конференции “Ферменты микроорганизмов: структура, функции и применение” (Казань, 2005).

Публикации. По материалам конференций опубликовано 14 работ.

Структура и объём диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальных глав, выводов и приложения общим объёмом 172 страницы компьютерного набора. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 28 рисунками. Список литературы включает 265 наименований, в том числе 134 наименования на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве продуцента дельта-эндотоксинов использовали штамм *B.thuringiensis subsp.kurstaki* Z-52, полученный из ВНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов (г. Москва).

Тест-объектами служили фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, штамм 8628; *Corynebacterium sepedonicum*, штамм 1; *C.michiganense*, штамм 7; *C.insidiosum*, штамм 14; *Pseudomonas syringae pv.striafaciens*, штамм 9; *P.syringae pv.lachrymans*, штамм 23; *P.syringae pv.pisi*, штамм 16, *P.syringae pv.tomato*, штамм 1. Культуры получены из коллекции кафедры фитопатологии МСХА им. Тимирязева и Всероссийского института сельскохозяйственной микробиологии (г. Пушкин).

В работе использовали стандартную среду РПА для поддержания культуры *B.thuringiensis* и тест-бактерий, среду Сабуро для изучения респираторной активности микроорганизмов в евтрофных условиях; синтетическую среду Старра, модифицированную добавлением $FeSO_4$ (0,005%) *(среда №1)*, среду №1 лимитированную по Cu^{2+} *(среда №2)* и среду ПДГ (пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза по 0,1%.) для исследования восприимчивости бактерий к эндотоксину в олиготрофных усло-

виях; РПА с добавлением Na_2S и среду №1 с добавлением Na_2S для исследования окислительной активности бактерий в присутствии восстановителей.

Споры *B.thuringiensis* и кристаллы дельта-эндотоксинов разделяли с помощью хлороформа. Кристаллы растворяли в 0,05 М NaOH при 20°С, pH растворов снижали до 7,8 осторожным титрованием 0,1 н HCl.

Электрофоретическое разделение компонентов кристаллов проводили на ацетоцеллюлозных пластинах в гиппуратном буфере (pH 8,6). Белковые фракции окрашивали раствором пунцового С. Денситометрирование осуществляли при 540 нм.

Количественную оценку антибактериальной активности эндотоксинов определяли методом диффузии в агар. За *условную единицу* антибактериальной активности (ЕА) принимали количество белка эндотоксинов (мг/диск), дающее зону подавления роста индикаторного штамма диаметром 6 мм. Величину, обратную соответствующей дозе представляли в *единицах активности в 1 мг эндотоксинов* (удельная антибиотическая активность, ЕА/мг).

Качественное определение развития терминальной оксидазы тест-бактерий проводили по скорости окраски колоний в присутствии тетраметил-р-фенилендиамина, используя бактериальные культуры, выращенные на различных типах питательных сред.

Влияние токсина на респираторную активность тест-культур оценивали манометрически (Манометрические методы…, 1951). Влияние эндотоксина на потребление неорганического фосфата из питательной среды тест-бактериями исследовали по методу Самнера (1989).

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) бактериальных клеток определяли фотометрически по реакции восстановления феррицианида калия сукцинатом (Биохимические исследования…, 1990).

Влияние дельта-эндотоксина на угловатый бактериоз огурца, бурый бактериоз овса и бактериальный ожог фасоли изучали в лабораторных условиях на искусственном инфекционном фоне. Опыт проводили по схеме: а)интактные растения; б)инфекционный фон; в)здоровые растения, обработанные токсином; г)инфицированные растения, обработанные токсином. Поражение растений бактериозом оценивали по универсальной пятибалльной шкале (Ефимов и соавт., 1979).

Влияние дельта-эндотоксина на развитие растений исследовали на проростках овса. Растения в течение различных промежутков времени инкубировали в присутствии дельта-эндотоксина (0,3%). Контролем служило проращивание в дистиллированной воде; в присутствии 2,4-ДНФ (0,3%); в присутствии растворов, используемых для выделения эндотоксинов: KOH (pH=7,5-8,0), KCl (0,03%). Учет результатов проводили в течение трех дней с интервалами в 24 часа, оценивая следующие показатели: количество корней у проростков, длина корней, степень развития зоны кор-

невых волосков, длина колеоптиля. Оценивалась также доля растений с теми или иными признаками в каждом варианте и доля нормальных и ненормальных по всем показателям проростков (Методические указания…, 1968).

Иммунизирующее влияние дельта-эндотоксинов исследовали на примере овса. Опыт проводили по схеме: а)30-минутная обработка проростков дельта-эндотоксинами с последующим двухсуточным выдерживанием в чашках Петри; б)двухсуточное инкубирование в присутствии эндотоксинов; в)проращивание в воде. Затем проростки промывали стерильной дистиллированной водой, инфицировали *P.syringae pv.striafaciens* и осуществляли доращивание. Контролем служили интактные растения. Учёт проводили по пятибалльной шкале (Ефимов и соавт., 1979).

Все результаты обрабатывали статистически. В таблицах приведена оценка достоверности результатов по критерию Стьюдента и величина наименьшей существенной разности (НСР), рассчитанная по результатам однофакторного дисперсионного анализа с учетом соответствующего уровня значимости.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Дельта-эндотоксины как фактор антибиотической активности *B.thuringiensis*. Электрофоретическая картина разделения дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis* оказалась сопоставима с результатами, полученными другими авторами (Честухина и соавт., 1977; Залунин и соавт., 1979). В исследуемом растворе преобладала фракция с Mr 130-140 кДа (49,3-51,7%). Вслед за ней располагалась целая группа полос различной интенсивности, молекулярный вес белков которой варьировал в пределах 65-80 кДа. По данным денситометрии общее содержание этих компонентов в растворе составляет около 45%. Наконец, около 3-10% приходится на долю белка с Mr 60-65 кДа. Следует отметить, что в некоторых случаях в следовых количествах в пробах обнаруживали компонент с Mr около 5-10 кДа.

Анализ литературных данных указывает на то, что белок, имеющий Mr 60-65 кДа, является, скорее всего, компонентом кубоидных кристаллов. Как известно, доля таких включений в спорово-кристаллических комплексах составляет обычно 8-10%. Высокомолекулярная фракция является, вероятно, компонентом ромбовидных кристаллов, преобладающих в культуре подвида *kurstaki*.

Особый интерес вызывает обнаруженные в растворе кристаллов фракции с Mr 65-80 кДа и 5-10 кДа. Появление таких белков связывают с ограниченным протеолизом компонента с Mr 130-140 кДа при участии ферментов бактериального происхождения (Залунин и соавт., 1979).

Нами была проведена оценка антибактериальной активности раствора кристаллов в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры (табл.1). Как показали результаты исследований, фитопатогенные бактерии проявляли чув-

ствительность к дельта-эндотоксинам в олиготрофных условиях (среды №1 и ПДГ). В условиях роста на евтрофном РПА и олиготрофной среде, дефицитной по Cu^{2+} (среда №2) бактерии не были восприимчивы к эндотоксинам.

Грамположительные коринебактерии оказались более восприимчивы к действию эндотоксинов, на газоне этих тест-культур, как правило, формировались зоны ингибирования роста большего диаметра, чем на газоне грамотрицательных псевдомонад. Следует, однако, отметить, что после нейтрализации белка кристаллов (5-6 суток) происходил слабый вторичный рост бактериальных клеток вблизи дисков даже при использовании раствора эндотоксинов высокой концентрации.

Грамотрицательные псевдомонады проявляли чувствительность только к относительно высоким концентрациям эндотоксинов. Но при этом после нейтрализации белка кристаллов вторичный рост бактерий не наблюдался. Среди грамотрицательных бактерий наиболее чувствительным к эндотоксину оказался штамм *P.syringae pv.striafaciens* 9, а среди грамположительных – *C.insidiosum* 14 (табл.1).

Таблица 1

Антибактериальное действие различных концентраций дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis subsp.kurstaki* Z-52

Концентрация эндотоксина (мг/мл)	Диаметр зон подавления роста (мм) тест-микроорганизмов				
	P.pisi 16	*P.striafaciens* 9	*P.lachrymans* 23	*C.insidiosum* 14	*C.michiganense* 7
0,03	0	0	0	9,13±0,87	7,38±0,26
0,04	0	6,00±0,89	5,50±0,77	10,25±0,49	8,00±0*
0,08	5,00±0*	8,50±0,43	7,00±0*	12,25±1,17	8,38±0,50
0,15	7,00±0*	9,13±0,30	7,38±0,43	14,90±1,20	9,00±0*
0,23	7,40±0,60	10,00±0,89	7,75±0,38	16,00±1,75	9,25±0,45
0,30	7,63±0,76	11,00±1,25	8,50±0,45	17,00±0,32	9,50±0,52
0,38	9,13±0,68	13,38±0,43	9,63±0,43	17,00±0*	9,63±0,50
0,75	13,25±1,39	14,00±0,63	11,00±0,89	17,25±0,32	9,75±0,45
1,50	13,88±1,37	16,13±1,04	12,88±0,83	18,20±0,96	10,00±0*
2,25	15,00±0,63	15,50±0,89	15,38±0,43	19,00±0,75	10,56±0,43
3,00	15,00±0,45	16,00±0,75	15,25±0,38	19,50±0,36	10,94±0,49
$НСР_{05}$	0,694	0,598	0,451	0,506	0,316
ЕА/мг	1,1±0	3,3±1,0	2,8±0,9	7,6±0,8	6,3±0,5
Вторичный рост	–	–	–	+	+

Примечание: * - величина стандартного отклонения (абсолютной ошибки средней) менее 0,01 мм.

2.2. Влияние дельта-эндотоксинов на окислительный синтез АТФ бактериальными клетками. Выявленное антибиотическое действие дельта-эндотоксинов

B.thuringiensis, зависящее от условий культивирования микроорганизмов, ставит вопрос о природе данного явления. Анализ литературных данных указывает на то, что кристаллические белки являются цитостатиками, вызывающими деэнергизацию клеток-мишеней. Один из возможных механизмов деэнергизирующего действия эндотоксинов, как полагают, заключается в разобщении окислительного фосфорилирования и дыхания (Каменёк, 1998). Вполне вероятно, что антибактериальное действие этих агентов будет во-многом определяться особенностями энергетического обмена тестируемых бактерий.

В лабораторных условиях нами была проведена оценка влияние качественного состава питательной среды на активность окислительных систем фитопатогенных бактерий.

Таблица 2

Активность окислительных систем тест-бактерий
в различных условиях культивирования

Условия культивирования	Длительность формирования окраски колоний в присутствии тетраметил-р-фенилендиамина, с.		
	P.lachrymans 23	*P.striafaciens* 9	*C.sepedonicum* 1
РПА, log-фаза	20-30	10-20	20-30
Среда №1, log-фаза	45-60	45-60	45-60
Среда №2, log-фаза	–	–	–
РПА, стационарная фаза	60 и дольше	60 и дольше	60 и дольше
Среда №1 + Na_2S, log-фаза	10	5-10	10
РПА + Na_2S, log-фаза	–	–	–

Примечание: знак “ – ” указывает на отсутствие окрашивания колоний.

Результаты проведённых экспериментов показали, что состав питательной среды оказывает существенное влияние на развитие и свойства окислительных систем тест-микроорганизмов. Так, на сбалансированной евтрофной среде РПА в логарифмическую фазу развития для бактерий свойственны высокоактивные терминальные оксидазы (табл.2). На это указывает быстро развивающаяся окраска колоний в присутствии тетраметил-р-фенилендиамина.

Напротив, в случае роста микроорганизмов на среде №1 клетки характеризуются низкой оксидазной активностью. В этом случае отчётливая окраска колоний формировалась в течение 45-60 с. Затяжная тест-реакция свидетельствует о том, что окисление субстратов клетками происходит менее интенсивно, чем в условиях роста на РПА. Низкая активность окислительных систем была характерна также для стареющей культуры (стационарная фаза) в условиях роста на РПА.

Следует отметить, что в олиготрофных условиях бактерии оказались способны формировать устойчивые к ингибиторам дыхательные цепи. Как показали результа-

ты наших наблюдений, при росте на среде №1 с добавлением Na_2S отчётливая окраска колоний в присутствии тетраметил-р-фенилендиамина формировалась в течение 10 с, то есть значительно быстрее, чем это требуется для положительной реакции. Напротив, при добавлении Na_2S к среде РПА бактерии не индуцировали цитохромоксидаз, о чём свидетельствует отсутствие характерного окрашивания колоний. Следует отметить, что бактерии так же не обладали цитохромоксидазной активностью при культивировании на олиготрофной среде, лимитированной по Cu^{2+} (среда №2). Вероятно, это свидетельствует о неспособности микроорганизмов синтезировать гемовые оксидазы в условиях роста на несбалансированных средах.

Приведённые данные свидетельствуют о высокой лабильности окислительных систем бактерий, что вероятно в свою очередь отражает адаптацию микроорганизмов к возможным изменениям естественных условий. Таким образом, большой интерес представляет изучение восприимчивости окислительных систем к действию эндотоксинов при инкубировании бактерий в различных питательных средах.

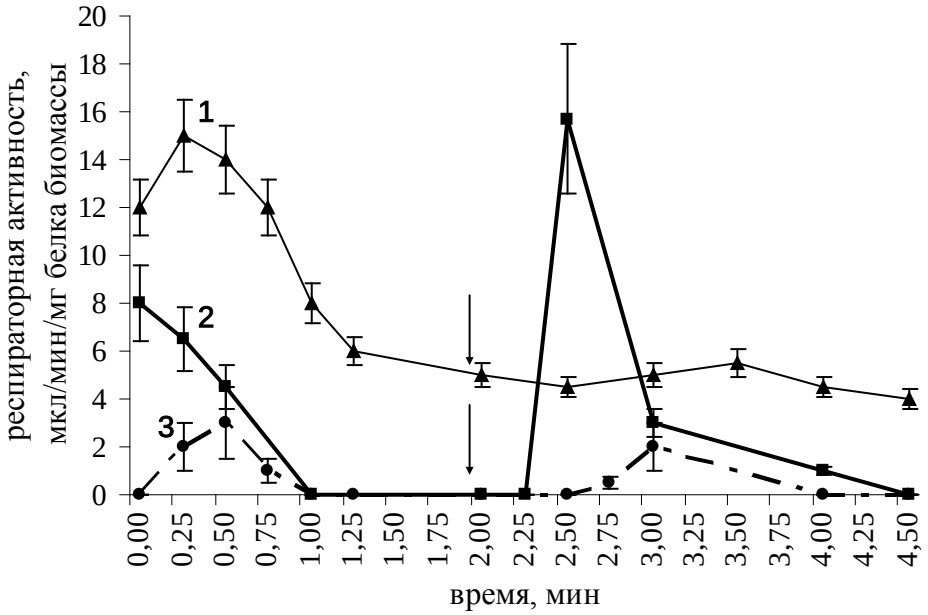

Рис.1. Влияние дельта-эндотоксинов (0,015%) на респираторную активность *C.sepedonicum* в различных условиях инкубирования: **1**-в среде Сабуро; **2**-в среде №1; **3**-в среде №2. Стрелками обозначено время добавления раствора эндотоксинов.

Известно, что в первые минуты воздействия разобщающих агентов происходит компенсаторное стимулрование респираторной активности чувствительных клеток. Аналогичные симптомы должно иметь и действие на бактерии дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis*. Как оказалось, раствор эндотоксинов концентрации 0,015% провоцирует резкое увеличение скорости потребления кислорода бактериями при их инкубировании в олиготрофных условиях (среда №1) (рис.1). Напротив, в евтрофных условиях (среда Сабуро), а также при инкубировании в среде, дефицитной по Cu^{2+} (среда №2) характерного стимулирующего действия эндотоксинов на дыхание тест-культур не наблюдали.

Полученные результаты согласуются с литературными данными о влиянии веществ-разобщителей на окислительную активность бактериальных клеток (Трутко и соавт., 1980; Меденцев и соавт., 1985; Акименко, 1989). Авторы полагают, что условия, оптимальные для роста, соответствуют log-фазе развития культуры, характеризующейся активностью дыхательных цепей (III состояние по Чансу), высокой скоростью синтеза и гидролиза АТФ и, как следствие, низким значением (или отсутствием) дыхательного контроля. В этом случае влияние разобщителей на бактериальные клетки не выражено.

Напротив, в условиях снижения активности окислительных систем при одновременном падении гидролиза АТФ бактериальные дыхательные цепи переходят в "контролируемое" состояние (IV состояние), что сопровождается проявлением чувствительности бактерий к деэнергизирующим агентам. Инкубирование бактерий в олиготрофных условиях, очевидно, соответствует этому. Следует отметить, что в условиях ингибирования цитохромного участка цепи переноса электронов (например, при лимитировании питательной среды по Cu^{2+}) активизируется дыхание, обусловленное функционированием оксидаз негемовой природы. Такие оксидазы, являющиеся FeS-белками, шунтируют дыхательную цепь на уровне Co-ферментного цикла, подавляя функцию, по крайней мере, двух пунктов сопряжения и, следовательно, не участвуют в генерации энергии. Полагают, что несопряженное дыхание нечувствительно к разобщителям.

На основании объёмов кислорода, потреблённого в течение 2, 5 и 15 минут, была рассчитана степень влияния эндотоксинов на дыхательную активность микроорганизмов (табл.3).

Таблица 3

Степень влияния дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis* на дыхание бактериальных клеток

Штаммы тест-бактерий	Процент поглощения кислорода от нормы через … мин			$НСР_{05}$
	2 мин	5 мин	15 мин	
C.sepedonicum 1	131,74±12,74	108,87±19,35	93,75±13,02	6,53
C.insidiosum 14	134,02±13,57	103,89±15,55	90,32±13,62	3,34
P.lachrymans 23	139,30±10,54	122,54±9,26	107,08±6,93	5,25
P.pisi 16	181,38±9,95	147,47±12,53	130,89±15,08	8,36
P.tomato 1	173,84±10,89	127,52±14,55	110,32±14,60	19,73
P.striafaciens 9	149,82±9,58	123,70±7,17	103,17±14,61	11,82
A.tumefaciens 8628	123,47±11,26	106,81±14,76	104,29±14,77	7,52

Приведённые данные свидетельствуют о том, что эффект начального стимулирования поглощения кислорода постепенно затухает. Через пятнадцать минут воздействия эндотоксинов у некоторых тест-микроорганизмов имело место незначительное угнетение дыхательной активности по сравнению с контролем. В наибольшей степени этот эффект был характерен для коринебактерий. Аналогичная тенденция наблюдалась у штаммов *P.syringae pv.tomato* 1, *P.syringae pv.striafaciens* 9, *A.tumefaciens* 8628, о чём свидетельствует величина абсолютной ошибки средней. В отношении штамма *P.syringae pv.lachrymans* 23 незначительное угнетение потребление кислорода было отмечено лишь в отдельных случаях, а дыхательная активность штамма *P.syringae pv.pisi* 16 была существенно выше нормы.

Анализ литературных данных указывает на то, что эффект угнетения потребления кислорода, наблюдающийся в некоторых случаях, может быть вызван нарастающей во времени деэнергизацией клеток. Полагают, что окислительные системы, являясь энергозависимыми, требуют для своей активности определённого клеточного фонда АТФ, который в свою очередь активно гидролизуется в ходе разобщения (Каменёк, 1998). Кроме того, эффект ингибирования может быть следствием гибели некоторой доли тестируемых клеток. Глубина угнетения дыхания, таким образом, отражает степень чувствительности культуры к действию эндотоксинов. Действительно, как следует из сравнения данных таблиц 1 и 3, угнетение респираторной активности в большей степени было свойственно представителям рода *Corynebacterium,* восприимчивым к низким концентрациям дельта-эндотоксинов. Напротив, патовары *P.syringae,* рост которых подавлялся лишь достаточно высокими концентрациями эндотоксинов, характеризовались затяжным усилением дыхания. Следует отметить, что ранее с помощью световой микроскопии была продемонстрирована устойчивость *A.tumefaciens*, штамм 8628 к действию эндотоксинов *B.thuringiensis* (Климентова, 2001). В наших исследованиях для этой культуры было характерно сравнительно низкое стимулирование дыхания в течение первых двух минут воздействия эндотоксинов. Затем дыхательная активность *A.tumefaciens* снижалась до значений, характерных для нормы.

Таким образом, начальное усиление респираторной активности бактерий может являться следствием разобщающего влияния дельта-эндотоксинов. В этом случае оно должно сопровождаться снижением окислительного синтеза АТФ и, соответственно, потребления неорганического фосфата бактериальными клетками.

Исследования показали (табл.4), что в присутствии эндотоксинов уже через 15 мин инкубирования отмечается существенное угнетение потребления бактериями из питательной среды неорганического фосфата. Следует отметить, что степень ингибирующего влияния зависела от конечной концентрации эндотоксинов в инкубационной среде. Так, потребление фосфата штаммом *P.syringae pv.lachrymans* 23 в при-

сутствии эндотоксинов концентрации 0,03% и 0,06% составило соответственно в среднем 38,24 и 9,08 процентов от нормы.

Анализ динамики потребления бактериальными клетками неорганического фосфата показал, что ингибирующее действие эндотоксинов максимально в первые 15 мин исследования, а затем эффект влияния постепенно снижается. Вполне вероятно, что последующее увеличение потребления фосфата из питательной среды может отражать высокую потребность клеток в АТФ в результате деэнергизации и, возможно, усиление синтеза АТФ в ходе субстратного фосфорилирования.

Угнетение потребления неорганического фосфата бактериальными клетками на фоне усиления их респираторной активности, очевидно, свидетельствует о разобщающем влиянии дельта-эндотоксинов на эти тест-объекты.

Таблица 4

Влияние дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis subsp.kurstaki*, штамм Z-52
на потребление неорганического фосфата патоварами *P.syringae*

Конц. эндотоксина (%)	Тест-бактерии	Потребление Рнеорг из питательной среды бактериальными клетками в присутствие эндотоксинов через …мин, % от нормы				$НСР_{05}$
		15	30	45	60	
0,03	*P.lachrymans* 23	38,24±7,71	85,44±6,26	84,78±3,93	94,99±1,35	5,03
	P.pisi 16	45,70±9,37	86,09±9,37	86,88±4,97	95,72±4,18	7,03
	P.striafaciens 9	41,18±17,60	82,38±5,34	87,04±6,72	99,56±0,42	9,57
0,06	*P.lachrymans* 23	9,08±3,40	64,69±8,05	77,90±0,89	94,18±2,88	6,20
	P.pisi 16	15,16±8,92	42,53±11,24	75,94±1,61	93,25±5,34	10,29
	P.striafaciens 9	8,09±2,40	61,32±12,44	69,79±7,28	91,16±3,69	7,70
$НСР_{05}$		11,85	8,48	9,65	3,46*	

Примечание: * - показатель существенности частных различий рассчитан для уровня значимости 0,10 ($НСР_{10}$).

2.3. Специфика функционирования окислительных систем эндотоксиноустойчивых вариантов *Pseudomonas syringe*. В ходе исследования антибактериального действия эндотоксина диффузионным методом было показано, что низкие концентрации раствора кристаллов оказывают стимулирующее влияние на рост клеток. Это приводит к формированию областей усиленного роста, расположенных вслед за зонами лизиса. Известно, что зоны усиленного роста образуют бактериальные клетки, менее восприимчивые к токсину (R-варианты) (Юдина и соавт.,1996). Для исследования возможных причин индивидуальной устойчивости фитопатогенных бактерий к действию дельта-эндотоксина мы проанализировали активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) R-диссоциантов трех патоваров *P.syringae*.

Как показали результаты эксперимента, активность СДГ бактериальных клеток, полученных из зон усиленного роста, значительно выше активности фермента, характерной для исходных штаммов (табл.5). Так, у *P.syringae pv.striafaciens* 9 активность СДГ R-диссоциантов составила 37,8±3,9 нМоль сукцината/мин/мг белка клеток, в то время как в контроле эта величина оказалась существенно ниже. Сходные результаты были получены и для других патоваров *P.syringae*.

Таблица 5

Активность СДГ эндотоксиноустойчивых вариантов патоваров *P.syringae* в сравнении со средней активностью фермента в культуре

Варианты	Активность СДГ тест-бактерий (нМ/мин·мг)		
	P.striafaciens 9	*P.lachrymans* 23	*P.pisi* 16
Область усил. роста	37,8±3,9***	33,3±7,8***	52,3±7,8*
Исходный штамм (контроль)	21,3±6,7	14,2±5,8	35,7±13,8

Примечание: * – различия по сравнению с контролем существенны при $p<0,05$; *** – $p<0,001$.

В последнее время активно изучается диссоциация микробных популяций под влиянием факторов среды. Результаты таких исследований указывают на различия в устойчивости диссоциантов одного вида к действию физических и химических факторов. Вместе с тем, реакция одинаковых типов клеток к внешним воздействиям, как правило, сходна даже у разных видов микроорганизмов (Милько, Егоров, 1986; Милько, Никитенко, 1998; Максимов и соавт., 1999). Так, например, показано, что R-варианты приобретают селективное преимущество в оптимальных для роста условиях. В свою очередь М-диссоцианты преобладают в культуре при снижении аэрации, при превышающих оптимум и заниженных температурах, при недостатке азотного, углеродного и фосфорного питания.

Приведённые данные могут отчасти объяснить повышенную восприимчивость бактериальных культур к эндотоксинам *B.thuringiensis* в олиготрофных условиях и устойчивость в условиях роста на богатых органических средах. Вполне вероятно также, что любые факторы, контролирующие рост культур и обеспечивающие адаптивное преимущество М-диссоциантов, могут способствовать усилению антибактериальной активности дельта-эндотоксинов.

2.4. Влияние эндотоксинов на бактериозы растений. Характер антимикробной активности дельта-эндотоксина налагает некоторые ограничения на его возможное практическое использование для защиты растений от бактериозов. Нами были проведены лабораторно-вегетационные исследования фитозащитного действия этого агента.

Результаты проведённых экспериментов показали способность токсина подавлять бактериозы растений в фазу вегетации. Наиболее эффективным оказалось использование раствора кристаллов против угловатой пятнистости огурца (табл.6). В этом случае биологическая эффективность использования дельта-эндотоксинов составила 95,43±4,14%. В результате обработки растений наблюдали достоверное снижение ($p<0,05$) распространения заболевания с 90,00±5,16% до 20,00±10,33%, развития – с 44,87±4,84% до 2,28±2,06%.

Таблица 6

Влияние дельта-эндотоксина *B.thuringiensis subsp. kurstaki* Z-52 на угловатый бактериоз огурца

Вариант опыта	Распространение, %	Развитие, %	Степень выравненности, %					Биол. эффективность, %
			0	0,1	1	2	3	
1	11,67±9,55	0,39±0,32	88,33±12,38	11,67±8,95	0	0	0	–
2	5,00±4,47	0,17±0,15	95,00±4,46	5,00±4,46	0	0	0	36,29±35,00
3	90,00±5,16	44,87±4,84	10,00±6,71	6,67±5,48	48,33±4,34	20,00±0	15,00±5,82	–
4	20,00±10,33	2,28±2,06	80,00±13,42	16,67±14,51	4,33±3,30	0	0	95,43±4,14
$НСР_{05}$	11,18	3,58	8,94	10,72	3,41	2,50	3,35	44,07

Варианты опыта: 1 – интактные растения (контроль), 2 – условно здоровые растения, обработанные раствором эндотоксинов, 3 – инфицированные растения (инфекционный фон), 4 – инфицированные растения, обработанные эндотоксином.

Показателем, наглядно иллюстрирующим фитозащитный эффект обработки растений раствором эндотоксинов, является выравненность образцов по степени бактериоза. Исследования показали, что после обработки проростков огурца токсином происходит резкое снижение в опытной группе доли больных растений: большая часть пораженных проростков относилась к категории устойчивых (0,1 балл); растений второго и третьего баллов поражения в этом варианте обнаружено не было.

Необходимо отметить, что раствор дельта-эндотоксинов снижал основные показатели заболевания и на естественном инфекционном фоне. Однако ввиду сравнительно низкого естественного поражения растений в большинстве случаев фитозащитный эффект оказался недостоверным, а величина биологической эффективности составила в среднем 36,29%, что существенно ниже аналогичного показателя, определённого на искусственном инфекционном фоне (табл.6).

В отношении бурого бактериоза овса биологическая эффективность дельта-эндотоксинов составила на искусственном инфекционном фоне 64,86±2,09% (табл.7). При этом раствор кристаллов снижал распространение заболевания на 44%, а развитие – на 56%. После обработки раствором эндотоксинов в выборке достоверно уменьшалась доля растений третьего балла поражения и увеличивалась доля здоровых и устойчивых проростков. На фоне естественного поражения овса бактериозом биологическая эффективность дельта-эндотоксинов оказалась еще выше.

Таблица 7

Влияние дельта-эндотоксина *B.thuringiensis subsp. kurstaki* Z-52
на поражение овса бурым бактериозом

Вариант опыта	Распространение, %	Развитие, %	Степень выравненности, %					Биол. эффективность, %
			0	0,1	1	2	3	
1	21,50±9,48	2,21±0,97	78,50±3,00	16,50±1,76	5,00±2,09	0	0	–
2	10,00±4,20	0,33±0,08	90,00±4,37	10,00±2,71	0	0	0	84,62±15,39
3	98,00±1,88	86,77±2,51	2,00±1,45	3,00±1,19	11,50±1,76	2,00±1,45	81,50±1,76	–
4	54,00±1,53	30,42±1,39	46,00±1,53	18,00±1,88	8,00±1,88	2,50±2,11	25,50±1,15	64,86±2,09
$НСР_{05}$	3,90	4,59	3,69	3,48	2,61	2,18	1,46	2,27

Варианты опыта: 1 – интактные растения (контроль), 2 – условно здоровые растения, обработанные раствором эндотоксинов, 3 – инфицированные растения (инфекционный фон), 4 – инфицированные растения, обработанные эндотоксином.

Активность эндотоксинов в отношении бактериального ожога фасоли на искусственном инфекционном фоне была сравнительно невысокой. В ходе обработки проростков отмечали снижение распространения бактериоза всего на 9% (табл.8). В большей степени фитозащитное влияние дельта-эндотоксинов проявлялось в снижении развития болезни (в среднем на 28%). Как показывает анализ степени выравненности образцов, раствор кристаллов снижает долю проростков третьего балла поражения, однако наряду с этим в выборке достоверно увеличивается процент растений 1-2 баллов.

Таким образом, на искусственном инфекционном фоне эндотоксины лишь сдерживают бактериальный ожог фасоли, но не оказывают существенного оздоравливающего эффекта. Напротив, в случае естественного поражения растений раствор кристаллов резко увеличивал долю здоровых образцов, растений 2-3 баллов поражения в выборке обнаружено не было (табл.8).

Таблица 8

Влияние дельта-эндотоксина *B.thuringiensis subsp. kurstaki* Z-52 на поражение фасоли полосатым бактериозом

Вариант опыта	Распространение, %	Развитие, %	Степень выравненности, %					Биол. эффективность %
			0	0,1	1	2	3	
1	45,63±14,60	16,15±6,49	54,37±14,60	21,87±6,78	8,13±5,97	8,75±1,96	6,88±4,50	–
2	30,00±7,95	3,62±1,76	70,00±7,52	21,25±4,39	8,75±5,44	0	0	75,87±12,94
3	97,50±3,21	85,96±4,73	2,50±2,03	3,75±3,01	5,62±3,67	12,50±7,86	75,63±9,74	–
4	88,12±6,39	57,31±5,75	11,87±6,39	14,37±4,20	11,25±1,96	28,13±8,47	34,38±9,47	33,31±5,46
$НСР_{05}$	7,06	4,63	7,06	6,70	4,85	6,72	7,78	11,96

Варианты опыта: 1 – интактные растения (контроль), 2 – условно здоровые растения, обработанные раствором эндотоксинов, 3 – инфицированные растения (инфекционный фон), 4 – инфицированные растения, обработанные эндотоксином.

В ходе оценки влияния дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis* на бактериозы в некоторых случаях отмечалось незначительное угнетение роста растений, обработанных эндотоксинами. Так как действие на растение является одной из важнейших характеристик биопрепаторов, нами было проведено исследование влияния дельта-эндотоксинов на основные морфометрические характеристики проростков овса. Учитывая возможный разобщающий механизм цитопатического действия раствора кристаллов, мы сравнили полученные результаты с эффектом воздействия 2,4-ДНФ на проростки.

Было обнаружено, что в присутствии ДНФ развитие проростков прекращается, все оцениваемые показатели не изменялись в ходе всего исследования (табл.9). Столь выраженный эффект не оказывало даже длительное воздействие дельта-эндотоксинов. Однако по сравнению с контролем (растения, проращиваемые в воде) в результате длительного воздействия эндотоксинов (45 минут и дольше) происходило незначительное угнетение развития проростков. Угнетающее действие проявлялось, прежде всего, в слабом развитии зоны корневых волосков. Кроме того, под влиянием раствора кристаллов наблюдали ингибирование формирования и роста корней, а также подавление роста колеоптилей.

Анализ динамики активности дельта-эндотоксинов показал, что угнетение развития проростков происходит в первые сутки инкубирования, затем эффект влияния значительно снижается.

Таблица 9

Некоторые показатели качества проростков овса при различных условиях инкубирования

Время инкуби-рования	Вариант опыта								
	Контроль (H_2O)	Раствор ДНФ[1]	Раствор NaOH	Раствор NaCl	Эндотоксин (15 мин)	Эндотоксин (30 мин)	Эндотоксин (45 мин)	Эндотоксин (60 мин)	Эндотоксин (проращивание)
Среднее количество корней у проростков									
24 часа	4,90±0,15	3,50±0,50	4,91±0,25	4,90±0,20	4,92±0,35	4,94±0,35	4,74±0,44	4,67±0,25	4,27±0,23**
48 часов	5,05±0,48	3,50±0,50	5,07±0,41	5,10±0,42	5,09±0,43	5,03±0,42	4,95±0,46	4,75±0,31	4,36±0,28
72 часа	5,60±0,61	3,50±0,50	5,60±0,48	5,62±0,43	5,70±0,45	5,35±0,43	5,39±0,42	5,06±0,48	4,68±0,28
Средняя длина корней у проростков, мм									
24 часа	10,52±7,36	8,00±1,24	12,25±7,93	11,97±6,94	12,07±3,96	11,67±5,35	10,03±5,11	8,97±5,12	8,06±5,92
48 часов	15,75±11,42	8,00±1,24	16,11±12,07	17,08±12,78	16,21±7,83	16,02±7,19	14,47±4,93	12,83±10,67	10,94±8,73
72 часа	23,72±14,77	8,00±1,24	25,09±15,28	26,35±15,82	25,44±8,92	24,31±10,25	20,71±14,12	16,74±11,03	14,20±10,31
Доля растений с хорошо выраженной зоной корневых волосков, %									
24 часа	53,75±6,18	0	62,13±7,35	64,03±7,80	64,11±6,25	58,35±10,60	46,90±7,35	42,13±7,36	10,25±6,17
48 часов	77,14±9,02	0	85,21±10,69	82,03±6,39	82,15±13,82	81,43±12,48	51,29±8,07*	46,57±7,73**	16,57±4,62***
72 часа	77,14±9,02	0	85,28±11,02	86,14±10,45	86,35±15,22	86,20±12,01	69,11±10,35	62,55±8,03	56,73±7,31
Средняя длина колеоптилей, мм									
24 часа	*Различия не выражены, длина колеоптилей ок.5 мм*								
48 часов	11,96±1,79	5,00	12,32±2,46	15,07±3,77	16,22±3,62	13,07±3,92	11,43±2,09	10,67±2,24	8,01±2,40
72 часа	25,47±2,17	5,00	25,67±2,93	25,82±2,19	26,11±2,93	23,92±3,15	21,48±4,62	21,17±4,49	14,07±6,12*
Доля проростков с признаками повреждения, %									
24 часа	0	100	0	0	0	0	0	8,56±4,55*	38,09±8,07***
48 часов	0	100	0	0	0	0	4,76±2,95	13,33±2,17***	40,12±6,38***
72 часа	0	100	0	0	0	0	4,76±2,95	13,33±2,17***	40,12±6,38***

Примечание: [1] – в случае использования раствора ДНФ все показатели развития проростков не изменялись в течение эксперимента;

* – различия с контролем достоверны при $p<0,10$; ** – $p<0,05$; *** – $p<0,01$.

Подобные симптомы характерны для действия фитопатогенов, неспецифических для данного растения, и сопровождаются, как правило, выраженной фитоалексинной активностью некротизированных тканей (индуцированная устойчивость, серхчувствительность растений) (Матышевская, 1979; Озерецковская, Чалова, 1989). Известно, что в случае кратковременного воздействия микробных метаболитов, либо под влиянием низких концентраций индукторов у растений не образуются некрозы. Но растительная ткань при этом приобретает способность к активным защитным реакциям. Такое явление называют системной устойчивостью растения (Озерецковская, Чалова, 1989).

Действительно, результаты наших исследований показали, что токсичным является только длительное инкубирование проростков в растворе кристаллов (60 мин, а также проращивание в эндотоксине). Снижение времени воздействия до 30-45 минут нивелирует токсичное действие, а при 15-минутном инкубировании наблюдали ростостимулирующее влияние эндотоксинов (табл.9).

Приведённые нами данные согласуются с результатами А.Тюльпинёвой (2003). В ходе анализа антифунгальной активности дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis* автором было обнаружено недостоверное ингибирование этим агентом роста овса, сочетающееся с увеличением всхожести. В отношении роста яровой пшеницы и озимой ржи, напротив, было отмечено стимулирующее действие дельта-эндотоксинов. Вполне вероятно, что растения существенно различаются между собой по реакции на индукцию устойчивости. Поэтому одна и та же длительность воздействия дельта-эндотоксинов у одних культур вызывает усиление роста, сопровождающееся формированием системной устойчивости, а у других растений провоцирует реакцию сверхчувствительности. В последнем случае у растений могут образовываться некрозы и другие симптомы повреждения. Необходимо отметить, что растворы, применяемые для выделения кристаллов, не оказывали токсического действия на растения (табл.9).

Нами было проведено исследование влияния эндотоксинов на устойчивость овса к возбудителю бурого бактериоза. Как оказалось, 30-минутная обработка эндотоксинами достаточна для формирования у растений системной устойчивости к *P.syringae pv.striafaciens*. В этом случае биологическая эффективность дельта-эндотоксинов составила 12,32±3,75% (табл.10). Обработка растений раствором эндотоксинов приводит к достоверному снижению распространения и развития бурого бактериоза, существенному увеличению в выборке доли здоровых и устойчивых проростков, а также снижению доли растений третьего балла поражения.

Длительное воздействие (48 ч) раствора кристаллов на проростки производило гораздо меньший защитный эффект. В этом случае биологическая эффективность обработки растений составила лишь 5,19±1,73%. Под влиянием эндотоксинов до-

стоверно уменьшалось развитие бактериоза, вместе с тем снижение распространения оказалось несущественным. Анализ степени выравненности образцов показал, что в выборке снижается доля проростков третьего балла поражения, однако наряду с этим незначительно увеличивается процент растений второго балла (табл.10).

Таблица 10

Иммунизирующий эффект обработки проростков овса дельта-эндотоксинами *B.thuringiensis subsp.kurstaki* Z-52

Вариант опыта	Распространение, %	Развитие, %	Степень выравненности, %					Биол. эффективность, %
			0	0,1	1	2	3	
1	21,95±6,33	2,40±0,65	78,05±3,16	16,35±2,00	5,60±1,50	0	0	–
2	96,88±2,14	86,82±3,60	3,12±1,20	4,12±2,15	13,45±2,50	4,35±2,00	74,96±3,40	–
3	93,03±4,40	75,40±4,31	7,00±3,62	7,50±2,81	13,50±2,53	4,00±3,12	68,00±2,73	12,32±3,75
4	95,03±1,32	81,35±3,12	5,25±2,38	8,00±3,12	10,20±3,11	6,35±2,36	70,20±3,61	5,19±1,73
$НСР_{05}$	3,16	5,03	2,45	2,12	3,35	2,06	1,93	3,98

Варианты опыта: 1 – интактные растения (контроль), 2 – инфицированные растения (инфекционный фон), 3 – инкубирование в растворе эндотоксинов (30 мин) и последующее инкубирование в воде (48 часов), 4 – инкубирование в растворе эндотоксинов (48 часов).

Таким образом, полученные результаты указывают на иммунизирующий характер влияния дельта-эндотоксинов на проростки овса. Кратковременное воздействие эндотоксинов не угнетает растение, вместе с тем при последующем заражении фитопатогенами выявляется усиление и ускорение реакции устойчивости.

Результаты проведённых экспериментов в целом дают основание рассматривать дельта-эндотоксины *B.thuringiensis* в качестве перспективного агента контроля бактериозов растений.

ВЫВОДЫ

1. Установлено ингибирующее действие дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis subsp.kurstaki* Z-52 на рост фитопатогенных бактерий – представителей родов *Corynebacterium* и *Pseudomonas*. Степень антибиотической активности раствора эндотоксинов зависит от его концентрации, а также вида микроорганизмов и условий их культивирования.

2. Выявлено стимулирующее действие дельта-эндотоксинов на респираторную активность тест-бактерий. Эффект усиления дыхания (1-5 мин инкубирования) сменяется угнетением потребления кислорода (15 мин) бактериями. Степень начально-

го стимулирования и последующего угнетения респираторной активности зависит от вида тестируемых микроорганизмов. Усиление дыхательной активности сопровождается подавлением синтеза АТФ бактериальными клетками.

3. Показано, что антибиотическая активность эндотоксинов выражена при росте бактерий на олиготрофных средах, сбалансированных по составу, и отсутствует на несбалансированных олиготрофных (лимитированных по Cu^{2+}) средах. Фитопатогенные бактерии так же устойчивы к эндотоксинам в условиях роста на евтрофных питательных средах.

4. Для токсин-резистентных диссоциантов патоваров *Pseudomonas syringae* характерен более высокий уровень активности сукцинатдегидрогеназы по сравнению с активностью фермента, характерной для исходных штаммов, что свидетельствует о формировании высокоактивных дыхательных цепей у клеток, устойчивых к действию дельта-эндотоксинов.

5. Дельта-эндотоксины *B.thuringiensis subsp.kurstaki* Z-52 подавляют основные симптомы бактериозов огурца, овса и фасоли. Биологическая эффективность эндотоксинов составила на искусственном инфекционном фоне в среднем соответственно 95,43, 64,86 и 33,31 процентов.

6. Дельта-эндотоксины *B.thuringiensis subsp.kurstaki* Z-52 стимулируют рост и развитие проростков овса при кратковременном воздействии. Предварительная обработка проростков раствором эндотоксинов повышает устойчивость растений к возбудителю бурой пятнистости.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Каменёк Л.К. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на фитопатогенные микроорганизмы /Л.К.Каменёк, А.А.Тюльпинёва, Е.П.Морозова, Т.А.Левина, Е.Н.Тихонова, Т.А.Луковенко //Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 50-летию кафедры почвоведения и агрохимии ПГСХА, Пенза 19-20 ноября 2002 г.: Сборник материалов. – Пенза, 2002. – С.130-132.

2. Каменёк Л.К. Фитозащитный эффект обработки семян овса дельта-эндотоксином *Bacillus thuringiensis* /Л.К.Каменёк, Т.А.Левина, Е.П.Морозова, Т.А.Луковенко //Приоритет России XXI века: от биосферы и техносферы к ноосфере: Сборник материалов /Международная научно-практическая конференция, Пенза 21-22 января 2003 г. – Пенза, 2003. – С. 76-77.

3. Каменёк Л.К. Влияние дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на дыхание микроорганизмов /Л.К.Каменёк, А.А.Тюльпинёва, Т.А.Левина, Е.П.Морозова, Е.Н.Тихонова, Т.А.Луковенко //Биология – наука XXI века: Сборник тезисов /7-ая Пущинская Международная школа-конференция молодых учёных, Пущино 14-18 апреля 2003 г. – Пущино, 2003. – С.277.

4. Тюльпинёва А.А. Возможности использования дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* для подавления грибных фитопатогенов /А.А.Тюльпинёва, Т.А.Левина, Е.Н.Тихонова, Л.К.Каменёк //Биосфера и человек: проблемы взаимодействия: Сборник материалов /VII Международная научно-практическая конференция, Пенза 23 мая 2003 г. – Пенза, 2003. – С.173-175.

5. Каменёк Л.К. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на некоторые аэробные бактерии в зависимости от развития окислительных систем микроорганизмов /Л.К.Каменёк, Т.А.Левина //Математическое моделирование физических, экономических, технических и социальных систем и процессов: Сборник материалов /V Международная конференция, Ульяновск 16-18 июня 2003 г. – Ульяновск, 2003. – С.85-87.

6. Левина Т.А. Активность сукцинатдегидрогеназы диссоциантов *Pseudomonas syringae,* устойчивых к действию дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* /Т.А.Левина, Л.К.Каменёк //Актуальные проблемы современного здравоохранения и экологии: Сборник материалов /Региональная конференция молодых учёных, Ульяновск 27 ноября 2003 г. – Ульяновск, 2003. – С.60-62.

7. Левина Т.А. Возможности использования дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* для защиты растений от бактериозов /Т.А.Левина, Л.Д.Миначёва, Д.А.Терёхин, Л.К.Каменёк //Региональные проблемы народного хозяйства: Сборник материалов /Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных, Ульяновск 8-9 апреля 2004 г. – Ульяновск, 2004. – С.103-107.

8. Левина Т.А. Возможности использования дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* для сенсибилизации растений /Т.А.Левина, Д.А.Терёхин, Л.Д.Миначёва, Л.К.Каменёк //Биотехнология – охране окружающей среды. Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов: Сборник тезисов /II Международная научная конференция и III школа-конференция молодых учёных и студентов, Москва 25-27 мая 2004 г. – Москва, 2004. – С.48.

9. Левина Т.А. Возможности использования дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* для защиты растений от бактериозов /Т.А.Левина, Л.Д.Миначёва, Д.А.Терёхин, Л.К.Каменёк //Биология – наука XXI века: Сборник тезисов /8-ая Пущинская Международная школа-конференция молодых учёных, Пущино 17-21 мая 2004 г. – Пущино, 2004. – С.267.

10. Левина Т.А. Активность дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* в отношении некоторых бактерий /Т.А.Левина, С.В.Пантелеев, Л.К.Каменёк //От фундаментальной науки – к новым технологиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии: Сборник материалов /Международная конференция молодых ученых, Тверь 1 октября 2004 г. – Тверь, 2004. – С.13-16.

11. Левина Т.А. Влияние дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* на окислительный синтез АТФ клетками *Pseudomonas syringae* /Т.А.Левина, Л.К.Каменёк //Наука и образование 2004: Сборник материалов /Международная научно-техническая конференция, Мурманск 7-15 апреля 2004 г.– Мурманск, 2004. – С.52-55.

12. Левина Т.А. Дельта-эндотоксины как фактор антагонистической активности *Bacillus thuringiensis* /Т.А.Левина, С.В.Пантелеев, Л.К.Каменёк //Проблемы экологии и охраны природы. Пути их решения: Сборник материалов /II Всероссийская научно-практическая конференция, Ульяновск, ноябрь 2004. – Ульяновск, 2004. – С.116-121.

13. Левина Т.А. Особенности функционирования окислительных систем диссоциантов *Pseudomonas syringae*, устойчивых к дельта-эндотоксинам *Bacillus thuringiensis* /Т.А.Левина, Л.К.Каменёк //Ферменты микроорганизмов: структура, функции и применение: Сборник докладов /XIII Международная конференция, Казань 4-8 апреля 2005 г. – Казань, 2005. – С.53-55.

14. Каменёк Л.К. Антибактериальное действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* как потенциального агента защиты растений /Л.К.Каменёк, Т.А.Левина, Д.А.Терёхин, Л.Д.Миначёва //Биотехнология. – 2005. – №1. – С.59-70.