

Сравнение экспрессии генов факторов вирулентности у двух штаммов бактерий *Bacillus thuringiensis*

Дубовский Матвей Иванович 9и класс МАОУ “Лицей №9”

Крыцына Татьяна Игоревна, к.б.н., научный сотрудник

Лаборатория Биологической Защиты Растений и Биотехнологии,
Новосибирский Государственный Аграрный Университет.

Новосибирск 2025

Введение

Современное сельское хозяйство сталкивается с проблемой возникновения у вредителей резистентности к многим препаратам, используемым для борьбы с ними [2]. Это влечет за собой экономические убытки, связанные с необходимостью увеличения количества вносимых препаратов. Для решения данной проблемы необходимо увеличивать эффективность имеющихся препаратов для борьбы с вредителями-фитофагами. Значительную долю фитофагов составляют насекомые.

Бактерия *Bacillus thuringiensis* (Bt) - широко используется как основа для биоинсектицидов, обладает высокоспецифичной активностью по отношению к насекомым разных отрядов, а также по отношению к фитопатогенным грибам. Основным фактором вирулентности *B. thuringiensis* являются высокоспецифичные Cry-токсины, входящие в состав кристаллического Δ -эндотоксина. Помимо Cry-токсинов, в патологическом процессе участвует множество вторичных факторов вирулентности Bt, вклад каждого из которых важен для обеспечения максимальной эффективности действия. Благодаря изучению роли каждого элемента в патологическом процессе можно лучше понять механизмы вирулентности и использовать эти данные для создания новых биоинсектицидов и повышения эффективности уже имеющихся препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* [1, 3]. Для получения максимально достоверных данных о формировании увеличенной вирулентности необходимо исследовать показатели экспрессии генов факторов вирулентности у бактерий на максимальном количестве сред. Базовая экспрессия, получаемая при изучении экспрессии генов у бактерий, растущих на питательной среде, дает начальное понимание различий в экспрессии генов бактерий с разной стратегией вирулентности.

Цель работы: изучить *in vitro* дифференциальную экспрессию генов факторов вирулентности штаммов *Bt10* и *Bt14* бактерий *Bacillus thuringiensis ssp. galleria*.

Задачи исследования:

1. Установить время наступления ранней и средней стационарной фазы роста и сравнить показатели в популяциях штаммов *Bt10* и *Bt14*.
2. Отследить морфологические изменения клеток (спорообразование) и сравнить показатели штаммов *Bt10* и *Bt14* в первые 24 часа роста.
3. Методом количественной ПЦР установить уровень мРНК для генов интереса и провести сравнительный анализ экспрессии между штаммами *Bt10* и *Bt14*.

1. Литературный обзор

Бактерии *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) - грамположительная палочковидная бактерия, наиболее широко используемая в создании биоинсектицидов [1]. Представлена широким спектром подвидов, каждый из которых обладает своими особенностями. Благодаря разнообразию продуцируемых токсинов может обладать нематоцидной и инсектицидной активностью, поражая большой спектр сельскохозяйственных вредителей. Bt является источником генов для генной инженерии растений. Эти бактерии способны к эндофитному существованию [22].

При естественном проникновении спор и кристаллов Bt в кишечник насекомого, споры прорастают, вегетативные клетки делятся, увеличивая плотность популяции и достигая «чувства кворума» [27]. В теле хозяина популяция бактерий *B. thuringiensis* проходит несколько стадий жизненного цикла, таких как вирулентная, некротрофная и спорообразующая. Каждая из этих стадий контролируется определенным плеiotропным регулятором – геном кворума. Вирулентная стадия Bt характеризуется экспрессией множества генов токсинов и ферментов, необходимых для противостояния иммунной системе хозяина на ранних этапах инфекции, и контролируется системой регуляторного белка и сигнального пептида PlcR–PapR [24]. Когда зараженное насекомое погибает, наступает некротрофная стадия жизненного цикла Bt, которая регулируется системой NprR–NprX [23]. Когда питательные вещества заканчиваются, наступает стадия спорообразования под влиянием регулятора Spo0A. Под действием этого же регулятора начинается экспрессия Cry-токсинов. Активность регулятора Spo0A, проводящая к спорообразованию, зависит от уровня его фосфорилирования и генов, способствующих этому процессу - Spo0F и Spo0B [25].

Факторы вирулентности *Bacillus thuringiensis*

Cry - токсин

Cry – токсин - основной белок кристаллического Δ-эндотоксина бактерии *Bacillus thuringiensis*. Обладая высокой специфичностью, Cry-токсин поражает определенные отряды насекомых, не представляя опасности для прочих животных. В настоящее время классифицировано 73 типа Cry – токсинов, демонстрирующих токсичность против представителей отрядов Полужесткокрылых, Жесткокрылых, Чешуекрылых, Двукрылых, Перепончатокрылых, представителей типа Круглые черви, класса Брюхоногие моллюски и раковых клеток человека [21]. Благодаря большому разнообразию Cry - токсинов, представляется возможным его применение против значительного количества фитофагов.

Энтомоцидное действие Cry-токсина заключается в образовании пор в стенках кишечника насекомого, что влечет за собой септицемию и летальный исход. Cry-токсин в составе Δ-эндотоксина попадает в кишечник насекомого перорально. Для активации Cry-токсинов необходим определенный pH кишечника насекомого, а также протеазы с помощью которых происходит

олигомеризация токсина, в случае с трехдоменными Cry-токсинами – удаление С-конца. 3D Cry-токсины являются самой многообразной группой Cry-токсинов, в которую также входит изучаемый в эксперименте Cry1. Благодаря связыванию токсина доменом II и III с аминопептидазой N (APN) и щелочной фосфатазой (ALP) соответственно, токсин концентрируется на мембране микроворсинок средней кишки. Далее токсин взаимодействует с кадгериноподобным рецептором (CAD) на эпителиальных клетках кишечника через II домен, в результате чего расщепляется часть домена I и обнажается его гидрофобная часть, после чего токсин связывается со специфическим рецептором и происходит образование поры. В результате действия токсина клетки кишечника разрушаются вследствие осмотического лизиса.

Cry1 проявляет активность против насекомых отряда чешуекрылые. Экспрессия гена Cry1 происходит в процессе спорообразования и находится под контролем плеiotропного регуляторного гена Spo0A [4, 6].

Cyt - токсин

Белок, содержащийся в кристаллических Δ -эндотоксинах бактерии *Bacillus thuringiensis*, является одним из основных токсинов Bt. Также, как и Cry-токсин, характеризуется цитолитическим порообразующим действием. Для активации Cyt-токсина также необходима олигомеризация и определенный уровень pH кишечника. Токсины Cyt не связываются со специфическими рецепторами на мембранах клеток, они распознают фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин – ненасыщенные фосфолипиды мембраны. С-конец токсина связывается с мембраной, после чего N-конец расщепляется и происходит порообразование. Синтез происходит в раннюю стационарную фазу роста бактерий и регулируется геном PlcR [7,8].

Современные исследования указывают на синергизм Cry и Cyt токсинов, в частности, показано повышение эффективности Cry-токсинов Cry4B и Cry11Aa против представителей отряда двукрылых путем связывания их с Cyt-токсином Cyt1Aa [20].

Хитиназа (Chi)

Хитиназы - ферменты, гидролизующие хитин. Хитин является основной составляющей экзоскелета насекомых и их перитрофической мембраны. *Bacillus thuringiensis* используют хитиназы для разрушения перитрофической мембраны среднего кишечника насекомого, благодаря чему основные токсины получают облегченный доступ к мембране эпителиальных клеток и рецепторам. Хитиназы используются бактерией для связывания и ассимиляции хитина, что позволяет использовать его в качестве источника углерода. Хитиназы также помогают бактерии на некротрофной стадии жизненного цикла, разлагая структуры из хитина в организме хозяина [9,10].

Фосфолипаза C (PlcA)

Фосфолипаза гидролизует фосфатидилхолин и сфингомиелин в мембране клеток хозяина. Эти ферменты способны подавлять иммунные реакции хозяина путем разрушения мембран везикул. Проявляет гемолитические свойства, индуцирует разложение тканей хозяина, способна запускать каскады химических реакций, приводящих к воспалению, способствует выходу бактериальных клеток из макрофагов хозяина. Входит в регулон PlcR [11, 18, 19].

Нейтральная металлопротеаза А (NprA)

Металлопротеаза NprA разрушает тканевые компоненты. Экспрессия гена контролируется плейотропным регулятором NprR, также являющимся геном кворума, регулирующим некротрофную стадию жизненного цикла [23]. Благодаря своей способности к разрушению тканевых компонентов (фибронектин, коллаген, ламинарин) NprA разрушает и дезорганизует ткани насекомого-хозяина, увеличивая проницаемость тканей для патогена. Как внеклеточная металлопротеаза может использоваться бактерией для получения питательных веществ из среды [12,13].

Иммунный ингибитор А металлопротеаза 1 (InhA 1)

Металлопротеаза *Bacillus thuringiensis* содержит домен связывания цинка. Подавляет защитные реакции хозяина путем разрушения антимикробных белков – цекропинов и аттацинов. Также способствует освобождению бактериальных клеток и спор из макрофагов хозяина, разрушая их. Проявляет гистолитическую активность, разрушает и дезорганизует эпителий среднего кишечника насекомого, увеличивая его проницаемость для бактерий и доступность для токсинов Cgt и Cyt. Экспрессия гена подавляется регуляторами переходной фазы AbrB и SinR, увеличивается под влиянием регулятора спорообразования Spo0A. Продуцируется начиная со средней логарифмической фазы роста до ранней стационарной фазы [13-15].

Иммунный ингибитор А металлопротеаза 2 (InhA 2)

Цинковая металлопротеаза InhA 2 разрушает и дезорганизует эпителий среднего кишечника насекомого. Сходна на 66% по аминокислотной последовательности гена с металлопротеазой InhA1. Было показано, что металлопротеаза InhA 2 играет роль в вирулентности *Bt* при пероральном заражении бактериями насекомых из отряда Чешуекрылых [16,17].

Экспрессия генов кворума *Bacillus thuringiensis* in vitro и in vivo

Экспрессия регуляторов основных фаз жизненного цикла бактерий тесно связанная между собой, и для достижения спорообразования бактериальной клетке в условиях in vitro необходимо последовательно активировать все регуляторные гены: PlcR, NprR, Spo0A. Однако, на уровне популяции, может наблюдаться одновременная экспрессия нескольких регуляторов, что говорит о популяционной гетерогенности, которая зависит от

условий среды. Так, при росте в гомогенной жидкой богатой питательной среде популяция *Bt* проявляла наименьшую гетерогенность. Однако при росте в формате биопленки бактерии формировали субпопуляции, которые на одной временной точке экспрессировали разные регуляторы кворума. Популяция биопленки была представлена вирулентной и некротрофной субпопуляцией, также, в более поздних временных точках, наблюдалась малая субпопуляция, экспрессирующая гены споруляции.

При развитии бактерий *in vivo* - в насекомом – хозяине, на ранних этапах заражения большинство клеток популяции экспрессировали вирулентный регулятор, однако на более поздних сроках инфекции гетерогенность популяции увеличивалась: часть популяции оставалась вирулентной, в то время как другая начинала экспрессию некротрофного и регулятора спорообразования [26].

Материалы и методы

Культивирование бактерий, кривая роста и микроскопия

Для работы использовали бактериальные штаммы *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleria* *Bt10* (исходный) и *Bt14* (высоковирулентный) из коллекции Лаборатории биологической защиты растений и биотехнологии НГАУ. Штамм *Bt14* был получен сотрудниками лаборатории в результате 5 пассажей исходного штамма *Bt10* через модельного хозяина (*Galleria mellonella*) и характеризуется 10-кратным увеличением вирулентности по отношению к личинкам *G. mellonella*.

Посев бактерий производили в стерильном боксе. В колбу объёмом 250 мл добавляли 25 мл среды Лурии-Бертани (ферментативный гидролизат казеина 10 г/л, экстракт дрожжевой 5 г/л, NaCl 10 г/л) и 10 мкл спорокристаллической смеси *Bt* титра 1×10^9 /мл. Культивирование производилось в термошейкере при 37 градусах и постоянном встряхивании 250 обр/мин.

Каждый штамм культивировали в 3х биологических повторах. Кривую роста строили по значениям показателя оптической плотности образцов на 1,5, 3, 5, 9, 15 и 24 часа культивирования. Измерение оптической плотности производили на спектрофотометре Varioskan Lux, при длине волны 600 нанометров. Измерения проводили в трех технических повторах для каждого биологического повторения.

Морфологические изменения клеток (спорообразовании) отслеживали с помощью светового микроскопа на 15 и 24 час культивирования, при окрашивании эозином и на увеличении x1600.

Выделение РНК и определение ее концентрации

Отбор проб на выделение РНК производился на 15 час (ранняя стационарная фаза) и 24 час (средняя стационарная фаза) культивирования. Пробы осаждали центрифугированием при 6000 обр/мин, 4 градусах в течении 5 минут. Бактериальный осадок дважды промывали 0,9% NaCl. Осадок клеток *Vt* хранили при -80 градусах до дальнейшего использования.

Пробы подвергали механической гомогенизации в жидком азоте, к осадку добавляли 1000 мкл реагента RiZol (Диаген, Россия), инкубировали 15 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали 10 минут, 12 тыс. g при 4 градусах. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли 200 мкл холодного хлороформа, перемешивали вортексированием, инкубировали при комнатной температуре 10 минут, центрифугировали при условиях, описанных выше.

В чистую пробирку переносили 400 мкл водной фазы, добавляли 500 мкл 2-пропанола, пробирки перемешивали переворачиванием. Инкубировали 15 минут при -20°C. Центрифугировали при выше описанных условиях. Добавляли 500 мкл холодного 80% этанола и перемешивали переворачиванием, центрифугировали. Процедура повторялась два раза. Супернатант удаляли и пробы сушили в термостате 10 минут при 37°C. Добавляли 60 мкл стерильной воды.

Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью нанофотометра (Implen).

Удаление геномной ДНК и обратная транскрипция

Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой I (Promega) при температуре 37 °C в течение 30 мин. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 1 мкг РНК, 1 мкл реакционного буфера, 2 мкл ДНКазы, стерильную воду до конечного объёма. Фермент инактивировали внесением 1 мкл EDTA и инкубацией 10 мин, при 65°C.

Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием набора «RNAscribeRT» (Biolabmix), в соответствии с протоколом производителя. Отрицательный контроль без обратной транскриптазы был включен для подтверждения отсутствия геномной ДНК. Реакционная смесь объёмом 20 мкл содержала 11 мкл РНК (1 мкг), 4 мкл 5x буфера, 1 мкл гексапраймера, 1 мкл ревертазы, стерильная вода до конечного объёма. Реакцию проводили в термоциклере Bio-rad T100 по протоколу производителя.

Количественная ПЦР

Реакция проводилась с использованием набора SYBR-Blue (2x) (Biolabmix). ПЦР проводилась в 96-луночной плпланшете, на амплификаторе CFX 96 (BioRad). Каждая проба имела три повторности. Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала: 12,5 мкл 2x HSqPCR, 1 мкл смеси прямого и обратного праймера (10 пмоль/мкл), 100 нг кДНК и стерильную воду до конечного объема смеси. Режим амплификации: начальная денатурация при

95°C 5 мин, 40 циклов денатурации при 95°C 15 с, отжиг при 62°C 20 с и элонгация при 72°C 15 с. Последовательности специфических праймеров представлена в таблице 1. Каждая постановка содержала отрицательный контроль без матрицы. Эффективность амплификации всех изучаемых фрагментов определялась с помощью серийного разведения и построения стандартной кривой. Для нормализации данных использовали ген «домашнего хозяйства» RpoB.

Target gene	Expressed product	Primer sequence
<i>inhA 1</i>	Иммунный ингибитор А Металлопротеаза 1	InhA(1)_F_ATGGTCACGATTTAGGTCTTCC InhA(1)_R_CAGCTTCCGCCACTCATAATA
<i>InhA 2</i>	Иммунный ингибитор А Металлопротеаза 2	InhA(2)_F_GGATATGTAACGGAGTGGCTAAC InhA(2)_R_TGCACCTTTCGGACCTTTATTT
<i>Cry1</i>	Пестицидный кристаллический белок cry 1	Cry1_F_AGAATACTTCCCAGAAACCGATAA Cry1_R_ACACTGTCTACGATGAATGTCC
<i>chi</i>	Гликозилгидролаза белок 18 семейства, хитиназы	Chi_F_TTGGGAACCTAAGCGGAGATTG Chi_R_CGTTGGTGGCTCAGTATCTTT
<i>PlcA</i>	фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза С	PlcA_F_GCTTGTCTTCTGGTGGTACA PlcA_R_TTGAATTACCCAGCCCACTC
<i>CytK</i>	Цитолитический токсин К	CytK_F_TTCATGTACTCTCGCACATACC CytK_R_CATACCAGGAGAGAAACCACTATT
<i>RpoB</i>	β субъединица РНК – полимеразы	HK_RpoB_F_ACGAAGAAGTTATGCCCGTATTA HK_RpoB_R_CGCAAACCCCTCATCAAGAAAC
<i>NprA</i>	Нейтральная протеаза А	NprA_F_TTAGTGTTAGCGACAGGAATGG NprA_R_GCACCGTCTCATTGTACTTCT

Таблица 1. Последовательность специфических праймеров

Статистический анализ

Результаты количественной ПЦР были проанализированы с использованием сравнительного метода Ct (порог цикла) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), при котором вычисляется кратное изменение экспрессии в одной экспериментальной группе относительно другой. Графики построены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.

Вычислялась разница значений Ct по генам интереса и референса у каждого образца в выборке (ΔCt). Далее вычислялась разница ΔCt между выборками. После, вычислялся средний показатель разницы и с ним сравнивались разницы другого штамма. Из полученных показателей отношения среднего другого штамма к показателям разниц проб данного штамма вычислялось среднее арифметическое, на основе которого строился график.

Результаты

1. Анализ кривой роста штаммов *Bt 10* и *Bt14*

На рисунке 1 представлен график кривой роста штаммов *Bt 10* и *Bt14*. Исходя из полученных результатов измерения оптической плотности в течении экспериментального периода, lag-фаза в популяциях обоих штаммов проходила до 3 часов культивации, фаза логарифмического роста проходила с 3 до 9 часов культивации, фаза замедленного роста с 9 до 15 часов, после чего бактерии вышли в стационарную фазу. Различие по скорости роста между штаммами было отмечено на 5й час культивации, штамм *Bt14* характеризовался более быстрым ростом. Однако к 9-му часу различия по скорости роста нивелировались.

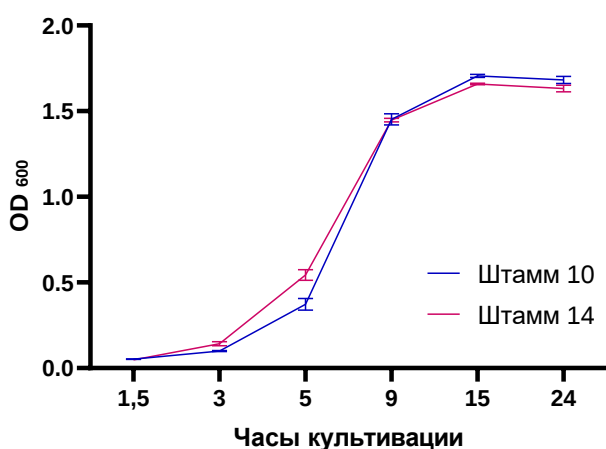


Рис. 1 Кривая роста штаммов *Bt10* и *Bt14*

2. Анализ морфологии клеток штаммов *Bt10* и *Bt14*

Для контроля скорости спорообразования в течении экспериментального периода был проведен анализ морфологии клеток популяций штаммов *Bt10* и *Bt14* на 15 и 24 часа роста (рис. 2).

При микроскопии мазков культур *Bt10* (рис. 2 А, В) и *Bt14* (рис. 2 Б, Г) на момент ранней и средней стационарной фазы (15 и 24 часа) различий по морфологии клеток между штаммами не выявлено. Клетки бактерий имели вытянутую палочковидную форму, характерную для бактерий во время вегетации. Наличие сформированных спор в популяциях на момент ранней и средней стационарной фазы микроскопически не визуализируется.

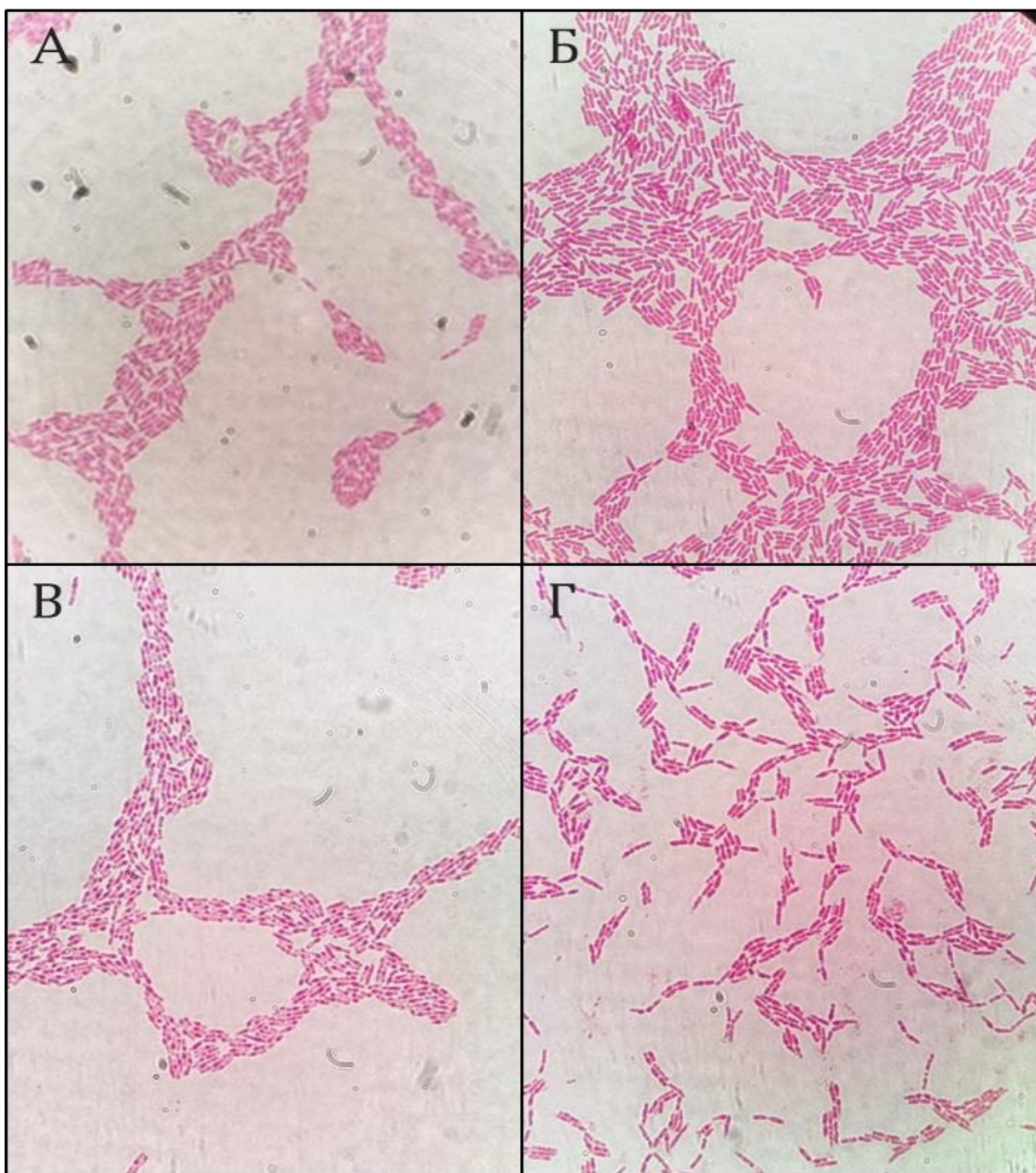


Рис. 2. А, Б – морфология клеток *Bt10* и *Bt14* на момент ранней стационарной фазы, В, Г - морфология клеток *Bt10* и *Bt14* на момент средней стационарной фазы.

3. Изучение дифференциальной экспрессии генов штаммов *Bt10* и *Bt14*

Дифференциальная экспрессия генов факторов вирулентности штамма *Bt14* относительно *Bt10* представлена на рисунке 3. При анализе уровня экспрессии генов в штаммах *Bt10* и *Bt14* на ранней (Т1) и средней (Т2) стационарной фазе роста было показано, что ген хитиназы (*chi*) и цитотоксина (*cytK*) у штамма *Bt14* экспрессировался в среднем в 10 раз выше чем у *Bt10* в

фазу роста T1. Экспрессия гена металлопротеазы *InhA2* была в 4 раза выше, а *Cry1* и *PlcA* в 3 и 2,1 раза соответственно.

Во вторую фазу роста различий по уровню экспрессии генов металлопротеаз (*inhA1* и *nprA*) между штаммами не установлено. В популяции штамма *Bt14* отмечается снижение уровня экспрессии *Cry1*, относительно *Bt10*.

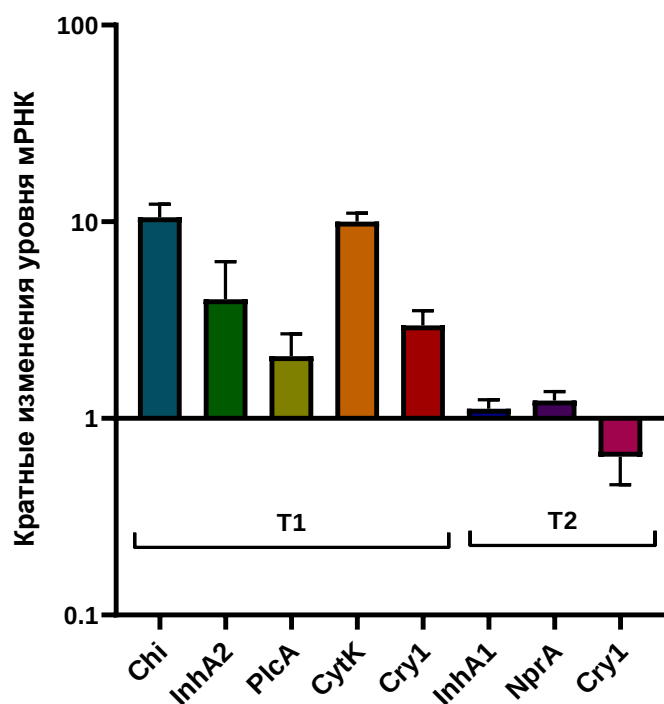


Рис. 3 Дифференциальная экспрессия генов факторов вирулентности *Bt14* относительно *Bt10* (данные представлены как среднее значение $2^{-\Delta\Delta CT}$ в выборках из 6 вариант $\pm$ ошибка среднего).

Исходя из полученных результатов, можно выдвинуть гипотезу о том, что наибольший вклад в вирулентность штамма *Bt14* вносят гены *Chi* и *CytK*. Хитиназа может улучшать доступ *Cry* и *Cyt* токсинов к мембранам клеток, разрушая хитиновую перитрофическую мембрану среднего кишечника насекомого, тем самым способствуя разрушению эпителия и распространению бактерий. Токсины *Cyt* способны помогать бактерии увеличивать вирулентность бактерии по отношению к резистентным к *Cry*-токсинам насекомым, благодаря отсутствию необходимости во взаимодействии с рецепторами на поверхности клеток.

Повышенная экспрессия этих генов на базовом уровне вероятно может быть связана с наличием мутаций в промоторных областях этих генов, приводящая к сверхэкспрессии либо с влиянием эпигенетических механизмов.

Выводы

1. Штаммы *Bt10* и *Bt14* не показали различий по времени выхода в стационарную фазу роста. *Bt14* характеризовался ускоренным ростом на 5ч культивации, однако к 9 часу различия между штаммами были нивелированы.
2. Микроскопия клеток популяции штаммов *Bt10* и *Bt14* не выявила различий по скорости спорообразования в первые 24 часа роста.
3. Анализ дифференциальной экспрессии на ранней стационарной фазе роста показал повышенную экспрессию генов *chi*, *inhA2*, *plcA*, *cytK*, *cry1* у штамма *Bt14*, относительно *Bt10*.

Список литературы

1. Zhang R., Luo Y., Gang L., Xu Y., Zhang X., Peng Q., Slamti L, Lereclus D., Wang G., Song F. Key amino acids residues enhance the ability of CpcR to activate cry gene expression in *Bacillus thuringiensis* //Research in Microbiology. – 2023. – Т. 174. – №. 6. – С. 104051.
2. Сухорученко Г. И. Резистентность вредных организмов к пестицидам-проблема защиты растений второй половины XX столетия в странах СНГ //Вестник защиты растений. – 2001. – №. 1. – С. 18-37.
3. Гришечкина С. Д., Ермолова В. П., Романова Т.А., Нижников А. А. Поиск природных изолятов *Bacillus thuringiensis* для создания экологически безопасных биологических препаратов //Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – №. 5. – С. 1062-1069.
4. Soberón M., Pardo L., Muñoz-Garay C., Sánchez J., Gómez I., Porta H., Bravo A. Pore formation by Cry toxins //Proteins membrane binding and pore formation. – 2010. – С. 127-142.
5. Jouzani G., Valijanian E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings //Applied microbiology and biotechnology. – 2017. – Т. 101. – С. 2691-2711.
6. Pardo-López L., Soberón M., Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection //FEMS microbiology reviews. – 2013. – Т. 37. – №. 1. – С. 3-22.
7. Soberón M., López-Díaz J. A., Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms //Peptides. – 2013. – Т. 41. – С. 87-93.
8. Xu C., Wang B., Yu Z., Sun M. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins //Toxins. – 2014. – Т. 6. – №. 9. – С. 2732-2770.

9. Nateche F., Amziane M., Gomis-Cebolla J., El-Aichar F., Khorf H., Ferré J. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria // *Toxins*. – 2017. – T. 9. – №. 4. – C. 139.
10. Martínez-Zavala S., Barboza-Pérez U., Hernández-Guzmán G., Bideshi D. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, modular structure, and applied potentials // *Frontiers in microbiology*. – 2020. – T. 10. – C. 3032.
11. Yang B., Pu M., Khan H., Friedman L., Reuter N., M. Roberts, A. Gershenson. Quantifying transient interactions between *Bacillus* phosphatidylinositol-specific Phospholipase-C and phosphatidylcholine-rich vesicles // *Journal of the American Chemical Society*. – 2015. – T. 137. – №. 1. – C. 14-17.
12. Dubois T., Faegri K., Perchat S., Lemy C., Buisson C., Nielsen-LeRoux C., Gohar M., Jacques P., Ramarao N., Kolstø A., Lereclus D. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis* // *PLoS pathogens*. – 2012. – T. 8. – №. 4. – C. e1002629.
13. Grandvalet C., Gominet M., Lereclus D. Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis* *inhA* metalloprotease gene at the onset of sporulation // *Microbiology*. – 2001. – T. 147. – №. 7. – C. 1805-1813.
14. Alves G., de Oliveira E., Jumbo L., dos Santos G., dos Santos M., Ootani M., Ribeiro B., de Souza Aguiar R. Genomic–proteomic analysis of a novel *Bacillus thuringiensis* strain: toxicity against two lepidopteran pests, abundance of Cry1Ac5 toxin, and presence of INHA1 virulence factor // *Archives of Microbiology*. – 2023. – T. 205. – №. 4. – C. 143.
15. Dammak I., Dammak M., Tounsi S. Histopathological and combinatorial effects of the metalloprotease *InhA1* and *Cry* proteins of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera littoralis* // *International journal of biological macromolecules*. – 2015. – T. 81. – C. 759-762.
16. Fedhila S., Nel P., Lereclus D. The *InhA2* metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route // *Journal of bacteriology*. – 2002. – T. 184. – №. 12. – C. 3296-3304.
17. Guillemet E., Cadot C., Tran S., Guinebretière M., Lereclus D., Ramarao N. The *InhA* metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence // *Journal of bacteriology*. – 2010. – T. 192. – №. 1. – C. 286-294.
18. Pomerantsev A., Kalnin K., Osorio M., Leppla S. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group // *Infection and Immunity*. – 2003. – T. 71. – №. 11. – C. 6591-6606.
19. Aurass P., Schlegel M., Metwally O., Harding C., Schroeder G., Frankel G., Flieger A. The *Legionella pneumophila* Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – T. 288. – №. 16. – C. 11080-11092.
20. Mendoza-Almanza G., Esparza-Ibarra E., Ayala-Luján J., Mercado-Reyes M., Godina-González S., Hernández-Barrales M., Olmos-Soto J. The cytocidal

spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: from insects to human cancer cells //Toxins. – 2020. – T. 12. – №. 5. – C. 301.

21. Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity //Toxins. – 2014. – T. 6. – №. 12. – C. 3296-3325.

22. Espinoza-Vergara G., García-Suárez R., Verduzco-Rosas L., Cando-Narvaez A., Ibarra J. *Bacillus thuringiensis*: a natural endophytic bacterium found in wild plants //FEMS Microbiology Ecology. – 2023. – T. 99. – №. 6. – C. fiad043.

23. Dubois T., Perchat S., Verplaetse E., Gominet M., Lemy C., Aumont-Nicaise M., Grenha R., Nessler S., Lereclus D. Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR–NprX cell–cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation //Molecular microbiology. – 2013. – T. 88. – №. 1. – C. 48-63.

24. Buisson C., Gohar M., Huillet E., Nielsen-LeRoux C. *Bacillus thuringiensis* spores and vegetative bacteria: infection capacity and role of the virulence regulon PlcR following intrahaemocoel injection of *Galleria mellonella* //Insects. – 2019. – T. 10. – №. 5. – C. 129.

25. Jiang M., Shao W., Perego M., Hoch J. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis* //Molecular microbiology. – 2000. – T. 38. – №. 3. – C. 535-542.

26. Verplaetse E., Slamti L., Gohar M., Lereclus D. Cell differentiation in a *Bacillus thuringiensis* population during planktonic growth, biofilm formation, and host infection //MBio. – 2015. – T. 6. – №. 3. – C. 10.1128/mbio.00138-15.

27. Slamti L., Perchat S., Huillet E., Lereclus D. Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect //Toxins. – 2014. – T. 6. – №. 8. – C. 2239-2255.