

УДК 579.64:581.1:60

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННЫХ
КУЛЬТУР КАТРАНА ПРИМОРСКОГО (*CRAMBE MARITIMA* L.)
ОТНОСИТЕЛЬНО ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ
*BACILLUS THURINGIENSIS***

Крыжко А. В.¹, Бугара И. А.², Омельченко А. В.², Кузнецова Л. Н.¹, Горелова В. В.¹

¹ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Республика Крым, Россия

²Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: solanum@ukr.net

Проведенные исследования позволили выявить штаммы *B. thuringiensis*, перспективные для применения против листогрызущих вредителей в агроценозах востребованной сельскохозяйственной культуры катрана приморского *Crambe maritima* L., обладающей высокой антибактериальной активностью. Полученные результаты открывают перспективу разработки биопрепаратов нового поколения на основе совместного использования суспензионной культуры катрана приморского и энтомопатогена *B. thuringiensis*. Степень влияния содержащих антимикробные вещества суспензионных культур *C. maritima* на бактериальные культуры энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis* зависит как от состава питательных сред, используемых для получения культур растительных клеточек, так и от штамма бактерий.

Ключевые слова: *Crambe maritima* L., суспензионная культура, антибактериальное действие, *Bacillus thuringiensis*.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной проблемой является разработка способов защиты растений, основанных на совместном применении биоагентов, препаратов, обладающих высокой инсектицидной, бактерицидной и антифунгальной активностью [1, 2]. Такой прием может обеспечить высокий выход качественной, экологически безопасной агрономической продукции.

Одним из перспективных источников фитобиотиков в качестве биологического средства защиты растений является катран приморский *Crambe maritima* L., многолетнее травянистое растение семейства Крестоцветных. Интерес к практическому применению *C. maritima* основан на биохимических особенностях вида, связанных с содержанием потенциально антимикробных глюкозинолатов (GSL), основным из которых является эпилпрогоитрин. Содержание эпилпрогоитрина в этиолированных проростках достигает 80–85 % и 95 % в семенах. Также в проростках идентифицированы шесть других GSL (прогоитрин, глюконапин, глюкобрассикапан, синалбин, глюконастуртин и глюкобрассицин). Вместе с тем в

семенах были идентифицированы только пять GSL. В семенах, но не в этиолированных проростках, присутствовал и глюкоалиссин [3]. Катран приморский также содержит флавоноидные гликозиды, полученные из кемпферола (3-глюкозид, 3,4'-диглюкозид, 3-(*p*-кумарил) глюкозид-4'-глюкозид), 3-(2-гидроксипропионил) глюкозид-4'-глюкозид) и кверцетина (3-глюкозид, 3,4'-диглюкозид, 3-ферулоилглюкозид-4'-глюкозид, 3-малонилглюкозид-4'-глюкозид). Дополняют вторичные метаболиты *C. maritima* фитоалексины, такие как камалексин и брассинин. Проведенные исследования подтвердили противогрибковые эффекты этих двух фитоалексинов *in vitro* на развитие *Alternaria spp.* на разных стадиях роста [6].

В современной системе защиты сельскохозяйственных культур от листогрызущих вредителей с успехом используются биопрепараты на основе энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis*, способных формировать при споруляции параспоральные кристаллические включения белковой природы, обуславливающие, главным образом, ее активность [4, 5]. Биоинсектициды на основе штаммов *B. thuringiensis* являются перспективными для использования в агроценозах *C. maritima*, так как для данного вида растений характерно наличие листогрызущих вредителей – *Pieris brassicae* L., *P. rapae* L.

Необходимо учитывать, что при внесении *B. thuringiensis* в агроэкосистемы на энтомопатогены влияют такие внешние факторы как фитонциды и экстрактивные вещества растений, способные не только подавлять их рост, но и влиять на развитие [6]. Известно, что под действием экстрактивных веществ кедр, ели и лиственницы при культивировании штаммов *B. thuringiensis* отмечали появление гигантских, веретеновидных, кластридиальных и нитевидных форм клеток. Экстрактивные вещества акации вызывали задержку роста бактерий на 24 часа, а клена и ореха – на 48 часов [7]. Под действием нелетучих веществ капусты происходит задержка образования белковых кристаллов *B. thuringiensis* на 2–3 дня [8].

Исходя из вышеизложенного, целью исследований было изучение влияния суспензионных культур *C. maritima* на рост и развитие бактерий штаммов *B. thuringiensis* из Крымской коллекции микроорганизмов ФГБУН «Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнена на базе лаборатории энтомопатогенных микроорганизмов отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма» и лаборатории биотехнологии и генной инженерии растений кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий Таврической академии (структурного подразделения) ФГАОУ ВО Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского.

Для получения суспензионной культуры *C. maritima* использовали каллусные культуры III-пассажа, индуцированные из листовых эксплантов [9]. В ламинарном боксе MSC Advantage™ Thermo Fisher Scientific взвешивали 35 мг каллусной ткани и помещали в жидкие питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) [10] без CaCl₂,

объемом 30 мл, содержащие 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л кинетина, 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), обозначенные, соответственно, как МС-12 и МС-13, разлитые в колбы Эрленмейера объемом 100 мл. Культивировали клеточную суспензию *S. maritima* в орбитальном шейкере MaxQ™ 4000 Thermo Fisher Scientific при 110 оборотах в минуту и температуре 26 °С в течение 30 суток [11].

Определяли антибиотическую активность суспензионной культуры *S. maritima* относительно жидких споровых культур штаммов *B. thuringiensis* 792, 888, 994, 0162, 0279, 0428 и 0578. Работу проводили в лабораторных условиях по методу Е. М. Данини [12]. Микробную взвесь штаммов бактерий с титром спор $2,3-4,6 \cdot 10^7$, высевали на поверхность РПА (рыбо-пептонный агар) в количестве 0,1 мл. Питательную среду, в которой культивировались клетки суспензионной культуры *S. maritima*, разливали в лунки по 0,1 мл. Контролями служили чашки с питательной средой РПА, засеянными культурами штаммов *B. thuringiensis* без лунок. Опытные и контрольные чашки Петри выдерживали в термостате при температуре 27–28 °С в течение 3–4 суток.

Оценку действия суспензионной культуры *S. maritima* проводили по зоне задержки роста колоний бактерий и непосредственно по количеству колоний в опытных и контрольных чашках Петри. Исследование культурально-морфологических свойств колоний *B. thuringiensis* проводилось согласно общепринятым методам [13, 14].

Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica 7 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что суспензионные культуры *S. maritima* обладают антибактериальной активностью по отношению к ряду штаммов энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis*, однако степень ее активности зависит от состава питательной среды, на которой суспензионная культура выращивалась (табл. 1). Наиболее токсичными для штаммов бактерий оказались суспензионные культуры, выращенные на питательной среде МС-13, содержащей фитогормоны ауксиновой и цитокининовой природы в соотношении 2:1. В варианте со штаммами *B. thuringiensis* 0162 и 0279 количество колоний, образовавшихся на чашках с суспензионной культурой, выращенной на данной питательной среде было соответственно в 7,1 и в 1,4 раза меньше, чем в контрольных (табл. 1).

У культур исследуемых штаммов, находящихся в зоне действия суспензионной культуры, изучали морфологию колоний. Макроскопическому анализу подвергали колонии, взятые из опытных вариантов в зоне угнетения роста, и сравнивали их с колониями из контрольных вариантов, не подвергавшихся воздействию суспензионной культуры.

Установлено, что под действием суспензионной культуры *S. maritima*, полученной на среде МС-13, исследуемые штаммы *B. thuringiensis* так же, как и в контрольных вариантах, образовывали круглые или неправильной формы колонии с

зубчатым краем. По консистенции колонии были вязкими, имели плоский рельеф с матовой, серовато-бежевого цвета поверхностью.

Таблица 1
Антибактериальная активность суспензионных культур *S. maritima*
относительно бактерий *B. thuringiensis* (лабораторный опыт)

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	Количество колоний <i>B. thuringiensis</i> на РПА (10^6)		
	Контроль	Питательные среды для получения суспензионной культуры <i>S. maritima</i>	
		МС-12	МС-13
792	41,7 ± 3,5	42,0 ± 3,2	35,0 ± 1,7
888	20,6 ± 3,7	27,3 ± 5,8	22,0 ± 3,4
994	27,3 ± 3,8	27,0 ± 5,2	30,0 ± 1,5
0162	463,3 ± 15,3	109,3 ± 9,6	65,0 ± 4,7
0279	31,0 ± 1,2	16,3 ± 1,3	22,3 ± 2,0
0428	30,6 ± 6,2	44,0 ± 2,5	39,3 ± 5,5
0578	35,3 ± 3,3	39,6 ± 3,5	36,0 ± 6,6

Штаммы же 994, 0162, 0279, колонии которых в контрольных чашках имели едва различимую, более светлую ареолу, под воздействием антибактериальных веществ *S. maritima*, формировали ярко выраженную ареолу и кратерообразный профиль. При микроскопировании колоний штаммов 0162 и 0279 на стадии развития вегетативных цепочек наблюдали увеличение количества вегетативных клеток в цепочках соответственно в 1,5 и 2,7 раз по сравнению с контролем. Кроме того, колонии опытных вариантов штамма 994 в пределах зон угнетения имели диаметр в 2,0 раза меньше контрольных. Колонии же штаммов *B. thuringiensis* 0162 и 0279, образовавшиеся в зоне угнетения суспензионной культуры *S. maritima*, полученной на питательной среде МС-13, существенно не отличались по размеру от контрольных (табл. 2).

При микроскопировании колоний штамма 994 на стадии развития вегетативных клеток (через 8–10 часов) отмечали увеличение количества клеток в цепочках (в 1,4 раза по сравнению с контролем). На 5-е сутки роста отмечали задержку в формировании спор и кристаллов. Культура остановилась в развитии на стадии спорообразования.

Культуры штаммов *B. thuringiensis* 0162 и 0279, образовавшиеся в зоне угнетения суспензионной культуры *S. maritima*, выращенной на средах МС-13, через пять суток культивирования, в сравнении с контрольными, характеризовались более активной динамикой формирования спор и кристаллов и процессом выхода спор из спорангиев в вегетативных клетках. Тогда как в контрольных вариантах в вегетативных клетках колоний штамма 0279 лишь фиксировали процесс активного формирования спор и белковых кристаллов эндотоксина, в вариантах с обработкой суспензионной культурой, уже могли наблюдать до 40 % свободных спор. В

культуре штамма 0162 в течение соответствующего периода в клетках колоний в контроле было отмечено до 40 % свободных спор, а в соответствующих опытных вариантах выход спор и кристаллов достигал 75 %.

Таблица 2

Влияние суспензионных культур катрана приморского (*C. maritima*) на диаметр колоний штаммов *B. thuriangiensis* (лабораторный опыт)

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	Диаметр колонии штаммов <i>B. thuriangiensis</i> на РПА, мм		
	Контроль	Питательные среды для получения суспензионной культуры <i>C. maritima</i>	
		МС-12	МС-13
994	16,2±1,9	7,2±0,5	8,0±0,8
0162	5,5±0,3	5,1±0,7	6,8±0,5
0279	8,8±1,6	9,4±0,8	7,3±0,8

Суспензионные культуры *C. maritima*, полученные на питательной среде МС-13, не оказывали какого-либо достоверного антибактериального эффекта на культуры штаммов *B. thuriangiensis* 792, 888, 0578, 0428.

Суспензионные культуры, полученные на питательной среде МС-12, содержащей фитогормоны ауксиновой и цитокининовой природы в соотношении 1:1, были менее токсичными для исследованных штаммов *B. thuriangiensis*.

Количество колоний штамма *B. thuriangiensis* 0162, образовавшихся на чашках с добавлением по методу «колодцев» суспензионной культуры, выращенной на питательной среде МС-12 было в 4,3 раза меньше, чем в контрольных (табл. 1). Также суспензионная культура обладала в 4,9 раз меньшим, чем в контроле токсическим влиянием на жизнеспособность штамма *B. thuriangiensis* 0279. Исследование культурально-морфологических свойств колоний штаммов 994, 0162, 0279 показало, что антибактериальные вещества суспензионной культуры *C. maritima*, полученной на МС-12 также, как и антибактериальные вещества суспензионной культуры, полученной на МС-13, способствовали формированию колоний с ярко выраженной ареолой и кратерообразным профилем. По остальным признакам колонии всех изученных штаммов не отличались от полученных на контрольных чашках.

Колонии штамма 994, под влиянием суспензионной культуры *C. maritima*, полученной на питательной среде МС-12 были в 2,25 раза меньше контрольных. При микроскопировании данных колоний на стадии развития вегетативных клеток отмечали различия в количестве клеток в цепочках контрольных и опытных вариантов. Так, в опытных вариантах количество клеток в цепочках было в 1,6 раз больше, чем в контрольных. Через пять суток культивирования в вегетационных клетках под влиянием суспензионной культуры наблюдали задержку выхода спор, в то время как в контроле выход спор составлял около 20 %.

Колонии штамма 0162 и 0279, образовавшиеся в зоне угнетения суспензионных культур *C. maritima* имели размеры, соответствующие размерам колоний

контрольных вариантов. Микроскопирование колоний штамма 0162 показало, что цепочки вегетативных клеток колоний, контактировавших с суспензионными культурами, выращенными на МС-12, также были типичными для культуры данного штамма. При микроскопировании колоний штамма 0279, наблюдали цепочки из вегетативных клеток в 1,8 раз длиннее, чем в контроле. В дальнейшем, через пять суток культивирования, в контрольных чашках с культурой штамма 0279 фиксировали процесс активного формирования спор и белковых кристаллов эндотоксина, тогда как в вариантах с обработкой суспензионной культурой, выращенной на среде МС-12, уже наблюдали 10 % выход спор. В контрольной культуре штамма 0162 было отмечено до 40 % свободных спор, а в соответствующих опытных вариантах – до 95 %.

Суспензионная культура *S. maritima*, полученная на питательной среде МС-12 также, как и культура, полученная на среде МС-13, не оказывали какого-либо достоверного антибактериального эффекта на культуры штаммов *B. thuringiensis* 792, 888, 0578, 0428.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что степень влияния содержащих антимикробные вещества суспензионных культур *S. maritima*, выращенных на питательных средах МС-12 и МС-13 на бактериальные культуры энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis* зависит как от состава питательных сред, используемых для получения культур, так и от штамма бактерий.

Установлено, что максимально устойчивыми к антимикробным веществам суспензионных культур *S. maritima* являются штаммы *B. thuringiensis* 792, 888, 0578 и 0428. Действию суспензионных культур подвержены бактериальные культуры штаммов 0162, 0279 и 994. Влияние суспензионных культур на бактерии данных штаммов в сравнении с соответствующими контрольными вариантами проявляется в изменении динамики прохождения фаз физиологического развития культур. Ускорение динамики развития характерно для культур штаммов 0162 и 0279, и наоборот, замедление развития - для культуры штамма 994.

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность дальнейших исследований по совместному применению энтомопатогена *B. thuringiensis* и суспензионной культуры *S. maritima* при защите растений от фитопатогенов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России (№ 0562-2019-0001), регистрационный номер в ЦИТиС: АААА-А19-119022590066-3, а также проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» на 2015–2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика»».

Список литературы

1. Yang G. Z. Facile Three-Component Synthesis, Insecticidal and Antifungal Evaluation of Novel Dihydropyridine Derivatives / G. Z. Yang, X. F. Shang, P. L. Cheng, X. D. Yin, J. K. Zhu, Y. Q. Liu, et al. // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23(10). – P. 156–161.
2. Yun H. G. Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea* / H. G. Yun, D. J. Kim, W. S. Gwak, T. Y. Shin, S. D. Woo // *Mycobiology*. – 2017. – Vol. 45(3). – P. 192–198.
3. Anushree Sanyal Biological Flora of the British Isles: *Crambe maritima* / Anushree Sanyal, Guillaume Decocq // *Journal of Ecology*. – 2015. – Vol. 103. – P. 769–788.
4. Кандыбин Н. В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* / Н. В. Кандыбин, В. Ф. Патыка, В. П. Ермолова, Т. И. Патыка // Инновационный центр защиты растений. – С. Петербург.: Пушкин. 2009. – 244 с.
5. Roh Jong Yul *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control / Roh, Jong Yul, Jae Young Choi, Ming Shun Li, Byung Rae Jin, Yeon Ho Je // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 17(4). – P. 547–559.
6. Крыжко А. В. Влияние фитонцидов и экстрактивных веществ душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) на культуру бактерий энтомопатогенного штамма *Bacillus thuringiensis* 0371 / А. В. Крыжко, Л. Н. Кузнецова, Е. Ф. Мягих // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 72–79.
7. Гукасян А. Б. Бактериостатическое и бактерицидное действие хвои и ее химических компонентов на возбудителя болезни сибирского шелкопряда / А. Б. Гукасян // *Изв. Сиб. отд. АН СССР*. – 1958. – № 7. – С. 174–188.
8. Кольчевский А. Г. Влияние фитонцидов растений, произрастающих в биоценозах капустных и картофельных полей на *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* шт. 202 / А. Г. Кольчевский // *Бюл. ВНИИ с.-х. микробиологии*. – 1981. – № 33. – С. 57–60.
9. Бугара И. А. Получение калусных культур *Crambe maritima* L. и их цитологическая характеристика / И. А. Бугара, А. В. Омельченко, Е. В. Газель, К. О. Кирилин // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, Биология. Химия*. – 2018. – Т. 4 (70). № 2. – С. 3–10.
10. Murashige T. The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. A. Skoog // *Physiol. Plant*. – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473–497.
11. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
12. Данини Е. М. Элементарные методики изучения антибактериальных свойств фитонцидов высших растений / Е. М. Данини // *Фитонциды, их роль в природе и значение для медицины*. М.: Изд-во АМН СССР, 1952. – 330 с.
13. Alexander Steve K. Laboratory exercises in organismal and molecular microbiology / Steve K. Alexander, Dennis Strete, Mary Jane Niles. – 1st ed. – 2004. – 362 p.
14. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
15. Халафян А. А. Современные статистические методы медицинских исследований: монография / А. А. Халафян – М.: ЛЕНАРД, 2014. – 320 с.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *CRAMBE MARITIMA* L. SPENSION CULTURES AGAINST THE STRAINS OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER

Kryzhko A. V.¹, Bugara I. A.², Omelchenko A. V.², Kuznetsova L. N.¹, Gorelova V. V.¹

¹Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia

²V.I. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Crimea, Russia

E-mail: solanum@ukr.net

Nowadays, the development of plant protection methods based on the joint use of biopreparations agents with complex high insecticidal and antifungal activity is an urgent problem. That's why study of the interactions between the suspension culture *Crambe maritima* L. as an antagonist of phytopathogens and *B. thuringiensis* as an entomopathogen, is of interest as a complex method of plant protection.

It is shown that the intensity of influence of antimicrobial substances of *C. maritima* suspension cultures on *B. thuringiensis* entomopathogenic strains depends both on the composition of the nutrient media and bacterial strain properties and resistance. *C. maritima* suspension cultures were obtained on Murashige and Skoog mediums without CaCl₂, which was differ in the content of auxin and cytokinin.

It was found that the strains of *B. thuringiensis* 792, 888, 0578 and 0428 are the most resistant to antimicrobial substances of the *C. maritima* suspension culture. Bacterial cultures of strains 0162, 0279 and 994 are exposed to the action of antimicrobial substances of suspension culture. The influence of suspension cultures on these strains in comparison with the corresponding control variants is shown in change of dynamics of passing by *B. thuringiensis* cultures the phases of physiological development. Acceleration of development dynamics was a characteristic for the strains 0162 and 0279, and slowdown of development – for the strain 994.

Thus, the research has allowed to identify the strains of *B. thuringiensis*, which is promising for use against leaf-eating pests in agrocenoses of the popular crop *C. maritima*, which has a high antibacterial activity. The obtained results open up the prospects for the development of a new generation of biological crop protection preparations based on the complex using of *C. maritima* suspension culture as an antagonist of phytopathogens and entomopathogenic bacteria *B. thuringiensis*.

Keywords: *Crambe maritima* L., suspension culture, antimicrobial activity, *Bacillus thuringiensis*.

References

1. Yang G. Z., Shang X. F., Cheng P. L., Yin X. D., Zhu J. K. and Liu Y. Q., Facile Three-Component Synthesis, Insecticidal and Antifungal Evaluation of Novel Dihydropyridine Derivatives, *Molecules*, **23(10)**, 156 (2018).
2. Yun H. G. Kim D. J., Gwak W. S., Shin T. Y. and Woo S. D., Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea*, *Mycobiology*, **45(3)**, 192 (2017).
3. Anushree Sanyal and Guillaume Decocq, Biological Flora of the British Isles: *Crambe maritima*, *Journal of Ecology*, **103**, 769 (2015).

4. Kandybin N. V., Patyka V. F., Ermolova V. P., and Patyka T. I. *Microbiological of insects and its dominant Bacillus thuringiensis*, 244 p. (St. Petersburg, Pushkin, 2009).
5. Roh Jong Yul, Jae Young Choi, Ming Shun Li, Byung Rae Jin, and Yeon Ho Je, Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17(4)**, 547 (2007).
6. Kryzhko A. V., Kuznetsova L. N., and Myagkikh E. F., The effect of liquid end volatile extractives of oregano (*Origanum vulgare* L.) on the entomopathogenic bacteria strain *B. thuringiensis* 0371, *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya.*, **7 (1)**, 72 (2017).
7. Gukasyan A. B., The bacteriostatic and bactericidal action of fir-needle and its chemical components on the agent of Siberian moth, *Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR.*, **7**, 174 (1958).
8. Kolchevskii A. G. The impact of plants volatile substances, growing in biocenoses of cabbage and potato fields in the strain *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 202, *Bull. Institute of agricultural microbiology.*, **33**, 57 (1981).
9. Bugara I. A., Omelchenko A. V., Gazel E. V., and Kirilin K. O., The callus cultures of *Crambe maritime* L. receive and their cytological characteristics, *Uchenye zapiski Krymskogo federalnogo universiteta im V. I. Vernadskogo, seriya-Biologiya, Himiya.*, **70 (2)**, 3 (2018).
10. Murashige T. and Skoog F. A., The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.*, **15(13)**, 473 (1962).
11. Kalinin F. L., Sarnackaya V. V. and Polishchuk V. E. *Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry*, 488 p. (Kiev, Naukova Dumka, 1980).
12. Danini E. M. *The basic methodology of the study antibacterial properties of volatile production in higher plants*, 330 p. (Moscow.: Publishing House of the Academy of Medical Sciences of the USSR, 1952).
13. Alexander Steve K., Strete Dennis and Niles Mary Jane, *Laboratory exercises in organismal and molecular microbiology*, 362p. (Boston, McGraw-Hill Science/Engineering/Math 2004).
14. Netrusov A. I., Egorova M. A. and Zakharchuk L. M. *Workshop on Microbiology*, 608 p. (Moscow, Publishing center "Academy", 2005).
15. Khalafyan A. A. *Modern statistical methods in medical research: monograph*, 320 p. (Moscow LEONARD, 2014).