

Влияние на компонентите на хранителната среда върху развитието и антибиотичната активност на *Bacillus subtilis* TS 01

Севдалина Тодорова

Influence of medium components on the development and antibiotic activity of *Bacillus subtilis* TS 01: The individual effects of the components of the medium on the development and antibiotic activity of *Bacillus subtilis* TS 01 was examined. It was found that the development and antibiotic activity depend on the type and concentration of carbon and nitrogen sources and concentrations of salts in the medium. The obtained results are statistical analysed. A optimal complex fermentation medium of *B. subtilis* TS 01 was composed with the following composition (in %): glucose - 1.5; corn extract (as nitrogen) - 0.3; KH_2PO_4 - 0.15; $MgSO_4$ - 0.01, pH 7.0.

Key words: *Bacillus subtilis*, medium components, antibiotic activity, phytopathogens

ВЪВЕДЕНИЕ

Щам *Bacillus subtilis* TS 01 е изолиран от почва и таксономично определен в проведени предишни изследвания [10]. Той проявява висока антибиотична активност и широк спектър на действие срещу фитопатогенни микроорганизми и е добър биоконтролиращ агент за растителна защита [5]. Антибиотичната активност се постига при дълбочинно култивиране на щама в добре подбрани, балансирани по състав хранителни среди [4].

Целта на настоящата работа е да се проучи самостоятелното влияние на компонентите на хранителната среда върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Биоагент

В изследванията е използван щам *B. subtilis* TS 01. Съхранението, поддържането и условията за култивиране на щама, както и получаването на стерилен филтрат от културална течност, са описани в предишни публикации [4].

Тест – микроорганизми

При определяне на антибиотичната активност са използвани фитопатогените *Botrytis cinerea* и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Ro. Поддържането, съхранението и приготвянето на суспензии на тест-микроорганизмите са описани в предишни изследвания на Тодорова и Кожухарова [4, 5].

Хранителна среда

Като базисна хранителна среда за култивиране на *B. subtilis* TS 01 се използва избраната в предишни изследвания като най-подходяща среда № 3 [4]. Изследвано е влиянието на вида и концентрацията на компонентите ѝ върху количеството на биомасата, рН на културалните среди и върху антигъбната и антибактерийна активност на *B. subtilis* TS 01.

• Влияние на вида и концентрацията на въглеродния източник

Среда № 3 съдържа 10 g l^{-1} глюкоза. В останалите варианти въглеродният източник се заменя със захароза, манитол, инозитол, глицерол и нишесте в количества, равни на глюкозата по съдържание на въглерод.

В следващия етап е изследвано влиянието на концентрацията на глюкозата, варирана в следните количества: 0,50 %, 0,75 %, 1,00 %, 1,25 %, 1,50 %, 1,75 %, 2,00 %, 2,25 %, 2,50 %, 2,75 % и 3,00 %.

• Влияние на вида и концентрацията на азотния източник

Среда № 3 съдържа 10 g l^{-1} пептон. В останалите варианти като азотен източник се включват различни органични и неорганични вещества: дрождев екстракт, месен екстракт, царевичен екстракт, царевичен глутен, соев протеин, соево брашно, рибено брашно, глутаминова киселина, аспарагин, карбамид, KNO_3 ,

NaNO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄ и NH₄H₂PO₄ в количества, равни на пептона по азотно съдържание.

В следващия етап на изследването се варира концентрацията на царевичния екстракт както следва: 0,050 %, 0,125 %, 0,300 %, 0,500 %, 0,700 %, 0,900 % и 1,100 %.

- **Влияние на концентрацията на KH₂PO₄**

Концентрацията на KH₂PO₄ се варира както следва: 0,00 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,10 %, 0,15 % и 0,20 %.

- **Влияние на концентрацията на MgSO₄**

Концентрацията на MgSO₄ се варира както следва: 0,00 %, 0,01 %, 0,05 %, 0,10 % и 0,15 %.

Определяне на антибиотичната активност

Антибиотичната активност е определена по метода на дифузия в агар с ямки [4, 10].

Определяне на биомасата

Биомасата се определя по тегловния метод след сушене при 105 °С до постоянна суха маса и се изразява в % с.в. [2]. За някои среди биомасата включва клетки и неразтворени компоненти на съставките.

Определяне на pH

pH се определя потенциометрично с pH-метър ТМ6.

Статистика

Резултатите са статистически обработени, като са представени средните стойности със съответната им средна грешка при ниво на значимост P=0.05 [1, 3].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследвано е влиянието на вида на въглеродния източник върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01. Резултатите са отразени в таблица 1.

Таблица 1
Влияние на въглеродния източник върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01

| Въглероден източник | Биомаса, % с.в. | pH | Активност в стерилни зони, mm срещу: | |
|---------------------|-----------------|------|--------------------------------------|---|
| | | | <i>B. cinerea</i> | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro |
| Глюкоза | 0.318 | 8.10 | 33.0±0.23 | 40.0±0.63 |
| Захароза | 0.169 | 8.00 | 29.6±0.27 | 33.6±0.16 |
| Манитол | 0.300 | 8.00 | 31.0±0.133 | 40.3±0.23 |
| Инозитол | 0.198 | 7.94 | 27.0±0.45 | 38.3±0.27 |
| Глицерол | 0.097 | 8.25 | 29.0±0.23 | 38.0±0.13 |
| Нишесте | 0.116 | 8.30 | 22.6±0.62 | 16.0±0.46 |

От представените данни в таблица 1 се вижда, че глюкозата остава най-добрият въглероден източник в състава на среда № 3. При включването ѝ в компонентния състав биомасата на щама достига 0.318 % с.в., а pH на културалната среда се повишава до 8.1. Антибиотичната активност, изразена с размера на стерилните зони, срещу *B. cinerea* е 33.0 mm, а срещу *P. syringae* pv. *tomato* Ro – 40.0 mm. Получените резултати потвърждават общата тенденция, че най-често в средите за култивиране на *B. subtilis* като въглероден източник се използва глюкоза [7, 8].

Добър въглероден източник според резултатите от проведеното изследване е и манитол. Щамът се развива малко по-слабо - биомасата на културата достига 0.300

% с.в., но антимикробната активност също е много добре изразена – стерилните зони са 31.0 mm срещу *B. cinerea* и 40.3 mm срещу *P. syringae* pv. *tomato* Ro. По отношение на този въглероден източник получените от направеното изследване резултати съвпадат с тези на Kugler et al. [6].

От данните в таблица 1 се вижда също, че като неподходящ въглероден източник за растежа и активността на щам *B. subtilis* TS 01 се оказва нишесте – стерилни зони 22.6 и 16.0 mm съответно срещу *B. cinerea* и *P. syringae* pv. *tomato* Ro.

Анализирайки получените резултати, като въглероден източник в хранителната среда за култивиране на *B. subtilis* TS 01 е избрана глюкоза.

В следващия етап е изследвано влиянието на концентрацията на глюкозата върху антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01. Тя е варирана от 0.50 % до 3.00 %. Получените резултати са представени в таблица 2.

Таблица 2
Влияние на концентрацията на глюкозата върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01

| Глюкоза, % | Биомаса, % с.в. | pH | Активност в стерилни зони, mm срещу: | |
|---------------|--------------------|------|---|--|
| | | | <i>B. cinerea</i> | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro |
| 0.50 | 0.214 | 8.14 | 29.8±0.49 | 36.0±0.63 |
| 0.75 | 0.241 | 8.12 | 30.8±0.59 | 28.8±0.32 |
| 1.00 | 0.317 | 8.14 | 32.8±0.37 | 40.8±0.50 |
| 1.25 | 0.340 | 8.10 | 32.3±0.52 | 40.6±0.32 |
| 1.50 | 0.404 | 8.14 | 33.1±0.30 | 41.0±0.38 |
| 2.00 | 0.327 | 8.12 | 32.0±0.39 | 39.8±0.50 |
| 2.50 | 0.299 | 8.12 | 30.9±0.32 | 39.8±0.50 |
| 3.00 | 0.272 | 8.13 | 30.2±0.39 | 40.3±0.59 |

Щамът се развива най-добре и антибиотичната му активност е най-висока при концентрация на глюкозата 1.50 %. При използването ѝ в по-високи концентрации антибиотичната активност на щамата намалява, което може би се дължи на катаболитна репресия.

Изследвано е влиянието на различни органични и минерални източници на азот върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01. Получените резултати са отразени в таблица 3.

Данните в таблица 3 показват, че най-добри азотни източници в състава на среда № 3 са органичните. Развитието на щамата и антибиотичната му активност са еднакво добре изразени. Антигъбната активност на щамата е най-висока при включване в състава на хранителната среда на царевичен екстракт, соево брашно, соев протеин и царевичен глутен. Стерилните зони срещу *P. syringae* pv. *tomato* Ro са най-големи при пептон, аспарагин, царевичен екстракт.

Таблица 3

Влияние на азотния източник върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01

| Азотен източник | Биомаса, % с.в. | pH | Активност в стерилни зони, mm срещу: | |
|---|--------------------|------|---|--|
| | | | <i>B. cinerea</i> | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro |
| Пептон | 0.320 | 8.04 | 33.5±0.13 | 39.6±0.30 |
| Дрождев екстракт | 0.390 | 9.00 | 26.5±0.27 | 28.0±0.33 |
| Месен екстракт | 0.190 | 7.82 | 28.8±0.25 | 25.6±0.13 |
| Царевичен екстракт | 0.388 | 8.48 | 36.0±0.23 | 38.3±0.19 |
| Царевичен глутен | 0.326 | 7.50 | 34.2 ±0.13 | 31.0±0.25 |
| Соев протеин | 0.827 | 9.53 | 34.6±0.46 | 31.6±0.33 |
| Соево брашно | 0.834 | 9.32 | 35.3±0.25 | 35.0±0.30 |
| Рибено брашно | 0.542 | 9.25 | 31.2±0.33 | 26.6±0.23 |
| Глутаминова киселина | 0.109 | 6.90 | 20.0±0.16 | 22.3±0.52 |
| Аспарагин | 0.200 | 8.20 | 32.0±0.30 | 39.0±0.0 |
| Карбамид | 0.111 | 7.30 | 28.0±0.46 | 28.0±0.24 |
| KNO ₃ | 0.165 | 7.50 | 28.3±0.33 | 30.4±0.16 |
| NaNO ₃ | 0.147 | 7.30 | 27.0±0.25 | 34.3±0.23 |
| NH ₄ Cl | 0.139 | 6.00 | 30.3±0.32 | 38.0±0.13 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.158 | 5.60 | 26.0±0.16 | 25.5±0.27 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 0.113 | 5.30 | 22.0±0.18 | 17.0±0.30 |

От представените резултати се вижда също, че много добър неорганичен азотен източник е NH₄Cl. Активността на щама е 30.3 mm и 38.0 mm съответно срещу *B. cinerea* и *P. syringae* pv. *tomato* Ro. Недостатък е по-малкото количество натрупана биомаса.

Таблица 4

Влияние на концентрацията на царевичния екстракт върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01

| Царевичен екстракт, % (по азот) | Биомаса, % с.в. | pH | Активност в стерилни зони, mm срещу: | |
|------------------------------------|--------------------|------|---|--|
| | | | <i>B. cinerea</i> | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro |
| 0.050 | 0.318 | 7.51 | 34.9±0.45 | 38.6±0.32 |
| 0.125 | 0.404 | 8.40 | 36.6±0.43 | 40.0±0.63 |
| 0.300 | 0.523 | 9.67 | 38.0±0.32 | 41.2±0.59 |
| 0.500 | 0.685 | 9.77 | 37.8±0.38 | 43.0±0.71 |
| 0.700 | 1.099 | 9.74 | 37.2±0.59 | 43.1±0.26 |
| 0.900 | 1.417 | 9.61 | 35.8±0.25 | 43.0±0.63 |
| 1.100 | 1.796 | 9.50 | 35.5±0.69 | 40.6±0.45 |

В заключение може да се каже, че азотният източник в среда № 3 също оказва съществено значение върху развитието и активността на щам *B. subtilis* TS 01, като изводите ни са в унисон с мнението и на други изследователи [6, 9] по отношение

изискванията на щамове *B. subtilis*. Противоречиво становище в това отношение изказват Wang et al. [11].

Обобщавайки резултатите се налага извода, че е по-целесъобразно като азотен източник в среда № 3 да се включи царевичен екстракт.

В хода на изследването е проучено и влиянието на концентрацията на царевичния екстракт върху антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01. Тя е варирана от 0.050 до 1.100 %. Получените резултати са представени в таблица 4. Анализирайки данните, е подбрана концентрация на царевичния екстракт 0.300 %. При нея антибиотичната активност на щама е много силно изразена, като стерилните зони срещу *B. cinerea* са най-големи – 38.0 mm, и развитието на щама е много добро – образуваната биомаса е 0.523 % с.в.

Концентрацията на KH_2PO_4 е варирана от 0 до 0.2 %. Резултатите от изследванията са представени в таблица 5. Вижда се, че растежът на културата и антибиотичната ѝ активност достигат най-високи стойности при концентрация на KH_2PO_4 от 0.15 %.

Таблица 5
Влияние на концентрацията на KH_2PO_4 върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01

| KH_2PO_4 , % | Биомаса, % с.в. | pH | Активност в стерилни зони, mm срещу: | |
|------------------------------|-----------------|------|--------------------------------------|---|
| | | | <i>B. cinerea</i> | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro |
| 0.000 | 0.630 | 8.80 | 31.2±0.45 | 41.6±0.46 |
| 0.025 | 0.642 | 8.96 | 34.2±0.39 | 43.3±0.59 |
| 0.050 | 0.597 | 8.89 | 36.2±0.39 | 43.6±0.43 |
| 0.100 | 0.548 | 8.95 | 37.6±0.60 | 44.0±0.0 |
| 0.150 | 0.551 | 8.97 | 38.6±0.32 | 44.0±0.27 |
| 0.200 | 0.510 | 8.85 | 36.2±0.39 | 45.2±0.39 |

Концентрацията на MgSO_4 е варирана от 0 до 0.15 %. Данните от резултатите са представени в таблица 6. Оптимална за развитието на щама и за антибиотичната му активност е най-ниската концентрация на MgSO_4 – 0.01 %.

Таблица 6
Влияние на концентрацията на MgSO_4 върху развитието и антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01

| MgSO_4 , % | Биомаса, % с.в. | pH | Активност в стерилни зони, mm срещу: | |
|---------------------|-----------------|------|--------------------------------------|---|
| | | | <i>B. cinerea</i> | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro |
| 0.00 | 0.554 | 9.01 | 39.0±0.0 | 42.0±0.45 |
| 0.01 | 0.571 | 9.12 | 39.2±0.39 | 43.1±0.30 |
| 0.05 | 0.558 | 8.98 | 38.8±0.43 | 41.0±0.38 |
| 0.10 | 0.544 | 8.98 | 38.0±0.38 | 41.8±0.39 |
| 0.15 | 0.507 | 9.00 | 37.6±0.45 | 40.2±0.59 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В резултат на така проведените изследвания върху влиянието на компонентите на хранителната среда бе съставена комплексна ферментационна

среда за култивиране на *B. subtilis* TS 01 със следния състав (в %): глюкоза – 1.5; царевичен екстракт (спрямо азот) – 0.3; KH_2PO_4 – 0.15; MgSO_4 – 0.01, с pH 7.0.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Батунер, П. Математические методы в химической технике. Ленинград: Химия, 1971.
- [2]. Бешков, М. Н., Е. А. Карова, И. Мургов. Ръководство за упражнения по микробиология. София: Земиздат, 1986.
- [3]. Михайлова, П., Ф. Страка, И. Апостолов. Математико-статистическа обработка на резултатите. В: Растително-защитна прогноза и сигнализация. София: Земиздат, 1982, 199-222.
- [4]. Тодорова, С., Л. Кожухарова. Проучване влиянието на състава на хранителната среда върху биоконтролиращата активност на *Bacillus subtilis* TS 01. Съюз на учените Стара Загора, 2005, 2, 185-191.
- [5]. Тодорова, С., Л. Кожухарова. Определяне антимикробния спектър на действие на *Bacillus subtilis* TS 01, култивиран в различни хранителни среди. Научни трудове на Русенски университет „Ангел Кънчев”, 2008, 47, 8, 13-19.
- [6]. Kugler, M., W. Loeffler, C. Rapp, A. Kern, G. Jung. 1990. Rhizoctin A, an Antifungal Phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: Biological Properties. Archives of Microbiology. 153, 276-281
- [7]. Ohno, A., T. Ano, M. Shoda. 1993a. Production of the Antifungal Peptide Antibiotic, Iturin by *Bacillus subtilis* NB22, in Solid State Fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 75, 1, 23-27
- [8]. Phae, C. G., M. Shoda. Investigation of Optimal Conditions for Foam Separation of Iturin, an Antifungal Peptide Produced by *Bacillus subtilis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 1991. 71, 2, 118-121
- [9]. Schmiedeknecht, G., I. Issoufou, H. Junge, H. Bochow. 2001. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. V. Biological control of diseases on maize and sunflowers. Journal of Plant Diseases and Protection. 108, 5, 500-512
- [10]. Todorova, S., L. Kozhuharova. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26, 1207-1216.
- [11]. Wang, S. L., I. L. Shih, C. H. Wang, K. C. Tseng, W. T. Chang, Y. K. Twu, J. J. Ro, C. L. Wang. 2002. Production of Antifungal Compounds from Chitin by *Bacillus subtilis*. Enzyme and Microbial Thechnology. 31, 321-328.

За контакти:

гл. ас. д-р Севдалина Тодорова, катедра “Биотехнологии и хранителни технологии”, Русенски университет “Ангел Кънчев”, Филиал - Разград, тел.: 0879115770, e-mail: stodorova@uni-ruse.bg

Докладът е рецензиран.