

## Определяне антимикробния спектър на действие на *Bacillus subtilis* TS 01, култивиран в различни хранителни среди

Севдалина Тодорова, Любка Кожухарова

**Determination of the antimicrobial spectrum of action of cultivated in different nutrient media *Bacillus subtilis* TS 01:** The antimicrobial spectrum of action of *B. subtilis* TS 01 from three cultural media was in vitro determined by the diffusion method against a great number, predominantly phytopathogenic fungi and bacteria. Many of them were tested for the first time for sensitivity to the antimicrobial action of *B. subtilis*. TS 01 strain exhibited a very broad antibiotic spectrum against Gram-positive and Gram-negative microorganisms in all cultural media but at a different degree. This probably was due to the production of antibiotic in different quantity or to several substances, having different potencies.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, antimicrobial spectrum, suppressive effect, phytopathogens

### ВЪВЕДЕНИЕ

*Bacillus subtilis* инхибира растежа на голям брой микроорганизми. Редица негови щамове проявяват ясно изразена антигъбна и (или) антибактерийна активност срещу голям брой фитопатогени [1, 2, 4] в условия *in vitro* и *in vivo*.

Целта на настоящото изследване е определяне на антимикробния спектър на действие на щам *B. subtilis* TS 01, култивиран в три различни по състав хранителни среди, спрямо възможно голям брой предимно фитопатогенни плесенни гъби и бактерии.

### ИЗЛОЖЕНИЕ

#### Бактериална култура

Щам *B. subtilis* TS 01 е оригинално изолиран от почва и идентифициран в предишни наши изследвания (10).

#### Тест – микроорганизми

Бактерии: *Dickeya chrysanthemi*, *Erwinia amylovora* 909/1, *Escherichia coli* 87-39, *Pseudomonas savastanoi* pv. *gegeinea*, *Ps. syringae* pv. *tomato* Ro, *Xanthomonas axonopodis* pv. *gegeines* 19, *X. axonopodis* pv. *gegeines* 27, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris*, *X. vesicatoria* BT, *X. vesicatoria* PT, *Staphylococcus aureus* MRSA (от колекцията на катедра "Биотехнологии и хранителни технологии" в РУ „Ангел Кънчев” – Филиал Разград).

Плесенни гъби: *Alternaria solani*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *Monilia fructigena*, *M. laxa* 916, *M. linhartiana* 869, *Mucor* sp., *Penicillium scopulariopsis*, *Penicillium* sp., *Phytophthora cryptogea* 759/1, *Phytophthora* sp., *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia* sp., *Rhizopus nigricans*, *Sclerotinia sclerotiorum* 896, *Verticillium dahlia* 863 (от колекцията на катедра "Биотехнологии и хранителни технологии" в РУ „Ангел Кънчев” - Филиал- Разград).

Дрожди: *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae* (от колекцията на катедра "Биотехнологии и хранителни технологии" в РУ „Ангел Кънчев” - Филиал- Разград).

#### Поддържане на тест-микроорганизмите

Термофилните и мезофилни бактерии се поддържат чрез периодично препосвяване в епруветки на наклонен хранителен агар (NA, Difco). Инкубират се при 37° С за 24 h и при 28° С за 48 h съответно. Гъбите се поддържат на наклонен картофено-декстрозен агар (КДА) [7] в епруветки. Дрождите се култивират при 28° С в продължение на 48 - 72 h, а плесенните гъби - при 26° С 4-7 денонощия. Културите се съхраняват при 0-4° С. Бактериите и дрождите се препосвят на прясна хранителна среда през интервал един месец, а плесенните гъби – през три месеца

### Приготвяне на суспензии на микробните култури

Клетките на всяка микробна култура се суспендират с 5 ml стерилна дестилирана вода. Суспензиите на дрождите и бактериите се приготвят с титър  $1.10^9$  кое/ml. Суспензиите на плесенните гъби съдържат спори и/или части от мицела, с титър  $1.10^5$  кое/ml.

### Дълбочинно култивиране на *Bacillus subtilis* TS 01

Развитието на *B. subtilis* TS 01 се осъществява дълбочинно в ерленмайерови колби от 500 ml с 50 ml хранителна среда № 3 [3], среда на Чапек [7] и среда с глутаминова киселина в състав ( $g\ l^{-1}$ ): глюкоза 10, пептон 10,  $KH_2PO_4$  1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5; pH 6.8. Култивирането е при  $28^\circ C$  на ротационна клатачка при  $220\ min^{-1}$  за 72 h. Инокулатът е 2 % (v/v) вегетативен посевен материал.

### Определяне на антибиотичния спектър на действие на *B. subtilis* TS 01

Спектърът на действие на щама се проучва *in vitro* от културалните среди по метода на дифузия в КДА с ямки. В стерилни петрити ( $d = 100\ mm$ ), поставени на нивелирана повърхност, се разливат по 20 ml КДА. След застиването на хранителната среда плесените се посяват повърхностно с 0.1 ml суспензия. Дрождите и бактериите се посяват в хранителната среда след охлаждането ѝ до  $45 - 48^\circ C$  в количество 1 ml суспензия /100 ml среда. Посятата хранителна среда се разлива също по 20 ml в петрита. С цилиндричен нож в хранителната среда на всяка петри се изрязват по 4 ямки ( $d = 7\ mm$ ). В ямките се накапват по 0.030 ml от културалните среди на *B. subtilis* TS 01. Петритата се оставят при стайна температура за 30 min, за да дифундират антибиотичните вещества в агаровата пластинка. След това се термостатират при  $28^\circ C$  (*St. aureus* и *E. coli* при  $37^\circ C$ ) за едно до три (при бактерии и дрожди) и пет до седем (при плесени) денонощия. За наличието и степента на антимикробните свойства на щама *B. subtilis* се съди по оформените около ямките стерилни зони. Определят се диаметрите им в mm. За чувствителни се считат тест-микроорганизмите с големина на зоните 18 mm и повече; умерено чувствителни са тези, при които зоните са от 12 до 18 mm; резистентни са тези, при които зоната на подтискане е до 12 mm и особено, когато въобще липсва [8]. Опитът се провежда двукратно.

### Статистика

Резултатите са статистически обработени, като са представени средните стойности със съответната им средна грешка при ниво на значимост  $P=0.05$  [6, 9].

### Резултати и обсъждане

Данните, отразяващи получените резултати от настоящото изследване, са представени в таблица 1. *B. subtilis* TS 01 проявява много широк антимикробен спектър на действие. Той е определен от три културални среди *in vitro* по метода на дифузия в агар срещу 34 тест-микроорганизми. От тях 27 са чувствителни на антимикробното действие на *B. subtilis* TS 01 и четири са умерено чувствителни, което съставлява 91.18 % от тестваните микроорганизми. Най-големи зони (над 35 mm) са измерени при *A. solani*, *B. cinerea*, *M. linhartiana* 869, *Ph. cryptogea* 759/1, *Rhizoctonia sp.*, а при *Ps. spiruce* pv. *tomato* Ro, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* и *X. campestris* – над 45 mm. Антимикробното действие на шамове *B. subtilis* е добре известно, но не в такъв голям мащаб. Földes et al. (2000) докладват за щам *B. subtilis*, проявяващ антагонизъм срещу 17 гъби и осем бактерии. Щам GA1 е тестван срещу 14 плесенни гъби [5]. *B. subtilis* TS 01 проявява едновременно антигъбни и антибактерийни свойства, като чувствителни на антимикробното му действие са както Gram-положителни, така и Gram-отрицателни микроорганизми. Според Földes et al. (2000) по-чувствителни на антимикробното действие на изолиран от тях щам са Gram-положителните бактерии в сравнение с Gram-отрицателните. Това различие само потвърждава, че продуцирането на антимикробни вещества от *B. subtilis* е шамова особеност. Зоните на инхибиране на гъбите и бактериите от *B. subtilis* TS 01

Таблица 1. Антимикробен спектър на действие на *B. subtilis* TS 01

Тест микроорганизми	Стерилни зони, mm (P 0.05) от културална среда на <i>B. subtilis</i> TS 01 от:		
	Среда на Чапек	Среда с глутаминова к-на	Среда №3
<b>Гъби:</b>			
<i>Alternaria solani</i>	39.8±0.2314	37.0±0.3779	37.2±0.2507
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19.3±0.2412	20.0±0.1889	26.0±0.3779
<i>Aspergillus niger</i>	-	15.2±0.2672	15.0±0.2314
<i>Botrytis cinerea</i>	32.5±0.1336	34.2±0.2507	38.0±0.1889
<i>Fusarium culmorum</i>	27.2±0.5201	26.0±0.2672	27.0±0.1889
<i>Fusarium graminearum</i>	27.0±0.2314	27.3±0.0	20.0±0.3779
<i>Monilia fructigena</i>	33.3±0.1336	29.3±0.2507	30.0±0.4225
<i>Monilia laxa</i> 916	25.0±0.2563	23.5±0.1889	27.0±0.4629
<i>Monilia linhartiana</i> 869	36.2±0.2507	27.0±0.2672	39.0±0.2672
<i>Mucor</i> sp.	-	-	-
<i>Penicillium scopulariopsis</i>	15.6±0.3240	14.2±0.2507	17.0±0.2672
<i>Penicillium</i> sp.	-	8.0±0.0	8.0±0.2672
<i>Phytophthora cryptogea</i> 759/1	29.6±0.2507	35.3±0.1336	37.6±0.2563
<i>Phytophthora</i> sp.	22.5±0.3251	20.9±0.1832	24.0±0.3273
<i>Pythium aphanidermatum</i>	15.2±0.0	14.3±0.5201	16.0±0.4629
<i>Rhizoctonia</i> sp.	26.5±0.2672	34.9±0.1336	37.0±0.1889
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 896	25.4±0.1832	21.0±0.4225	27.3±0.5201
<i>Verticillium dahliae</i> 863	25.5±0.2563	15.0±0.3273	25.0±0.4226
<i>Candida albicans</i>	30.0±0.1832	33.0±0.2412	30.1±0.1253
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27.0±0.3664	18.0±0.4226	27.0±0.2672
<b>Бактерии:</b>			
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	14.0±0.3779	16.3±0.1336	16.8±0.2507
<i>Erwinia amylovora</i> 909/1	35.3±0.1889	30.7±0.0	18.0±0.2672
<i>Escherichia coli</i> 87-39	27.5±0.3273	34.0±0.2507	34.3±0.0
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>gegeinea</i>	22.4±0.3779	17.0±0.2314	17.0±0.2672
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro	43.3±0.2412	45.2±0.2507	48.0±0.1889
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	18.5±0.2563	39.1±0.3273	39.4±0.1832
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>gegeines</i> 19	21.3±0.1889	22.0±0.2507	22.2±0.0
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>gegeines</i> 27	31.0±0.2314	27.5±0.3779	27.9±0.2412
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	49.5±0.2672	44.2±0.0	37.5±0.1889
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	27.3±0.1336	33.5±0.2412	35.0±0.2672
<i>Xanthomonas campestris</i>	47.9±0.2412	43.3±0.5201	50.0±0.1889
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> BT	35.6±0.3779	39.5±0.2563	39.7±0.1647
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> PT	19.5±0.2412	20.0±0.2507	20.2±0.2314

'-' - липса на стерилна зона

'с' - подтискане на спорообразуването

са много ясни и чисти, което определя съответно фунгицидно и бактерицидно действие на щама. Голяма част от плесенните гъби от клас *Deuteromycetes* и клас *Basidiomycetes* и дрождите са чувствителни към антагонистичното действие на *B. subtilis* TS 01 (стерилните зони са по-големи от 18 mm). Действието на щама е по-слабо срещу видовете от родовете *Aspergillus* и *Penicillium*. При *A. niger* и *Penicillium* sp. щам TS 01 не инхибира растежа на мицела, но подтиска спорообразуването. Спрямо представителите от клас *Zygomycetes* - *Mucor* sp. и *Rh. stolonifer* не се наблюдава инхибиращ ефект. В нашата работа за първи път е определяно антимикуробното действие на щам *B. subtilis* срещу патогените *A. fumigatus*, *D. chrysanthemi*, *M. laxa*, *M. linhartiana*, *P. scopulariopsis*, *Ps. savastanoi* pv. *gegeinea*, *Ps. syringae* pv. *tomato* Ro, *X. axonopodis* pv. *gegeines* 19, *X. axonopodis* pv. *gegeines* 27, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* BT, *X. vesicatoria* PT. Особено силно се инхибира растежът и развитието на видове от родовете *Monilia* (фиг.1), *Pseudomonas* и *Xanthomonas*.



Фигура 1. Антимикробно действие на *Bacillus subtilis* TS 01 срещу *Monilia laxa* 916

Стерилните зони се запазват продължително време, даже след месечно инкубиране. Дори около образуваните вече стерилни зони се формират допълнително зони на фунгистатично и съответно бактериостатично действие. Мицелната и бактерийна маса в тези зони силно намалява. Този ефект щамът проявява срещу всички бактериен тест – микроорганизми и срещу голям процент от гъбите. Този феномен, както го определят Földes et al. (2000), е докладван при щам *B. subtilis* IFS-01 само срещу *P. chrysogenum*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От получените резултати при проведените изследвания можем да обобщим, че щам *B. subtilis* TS 01 има ясно изразени антагонистични свойства, определящи един много широк антимикуробен спектър на действие. Силният антагонизъм срещу гъби и бактерии щам TS 01 проявява от всички културални среди. Той вероятно се дължи на продуцирането на антибиотични вещества с антигъбно и антибактерийно действие. Спектърът на антимикуробно действие на щама в различните културални среди е близък, но не идентичен. Това показва, че антибиотичните вещества, продуцирани от него, вероятно се синтезират в различни количества или може би са близки по природа, но не са едни и същи. *B. subtilis* TS 01 представлява перспективен биоконтролиращ агент срещу голям брой фитопатогени.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Chan, Y.-K., W.A. McCormick, K.A. Seifert. Characterization of an Antifungal Soil Bacterium and its Antagonistic Activities against *Fusarium species*. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49, 4, 253-262.
- [2]. Földes, T., I. Banhegyi, Z. Herpai, L. Varga, J. Szigeti. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. J. Appl. Microbiol., 2000, 89, 840-846.
- [3]. Patel, P.S., S. Huang, S. Fisher, D. Pirnik, C. Aklonis, L. Dean, E. Meyers, P. Fernandes, F. Mayerl. Bacillaene, a Novel Inhibitor of Prokaryotic Protein Synthesis, Produced by *Bacillus subtilis*: Production, Taxonomy, Isolation, Physicochemical Characterization and Biological Activity. Journal of Antibiotics, 1995, 48, 9, 97-1003.
- [4]. Phae, C.G., M. Shoda, N. Kubota. Suppressive Effect of *Bacillus subtilis* and Its Products on Phytopathogenic Microorganisms. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990, 69, 1, 1-7.
- [5]. Touré, Y., M. Ongena, P. Jacques, A. Guiro, P. Thonart. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol., 2004, 96, 1151-1160.
- [6]. Батунер, П. Математические методы в химической технике. Ленинград: Химия, 1971.
- [7]. Бешков, М.Н., Е.А. Карова, И. Мургов. Ръководство за упражнения по микробиология. София: Земиздат, 1986.
- [8]. Димитров, Д.И., Н.Д. Гигова. Ръководство за практически упражнения по промишлена медицинска микробиология. София: Наука и изкуство, 1978.
- [9]. Михайлова, П., Ф. Страка, И. Апостолов. Математико-статистическа обработка на резултатите. В: Растително-защитна прогноза и сигнализация. София: Земиздат, 1982, 199-222.
- [10]. Тодорова, С. Таксономично определяне на бактериен щам от род *Bacillus*, проявяващ антагонистични свойства спрямо фитопатогенни микроорганизми. Научни трудове на УХТ Пловдив, 2003, 50, 3, 90-96.

### За контакти:

гл.ас. Севдалина Тодорова, катедра "Биотехнологии и хранителни технологии", Русенски университет "Ангел Кънчев", Филиал - Разград, тел.: 084/ 611011, e-mail: [s.todorova\\_rz@yahoo.com](mailto:s.todorova_rz@yahoo.com)  
доц. д-р Любка Кожухарова, катедра "Биотехнология", УХТ, Пловдив, тел.: 032/ 603642, e-mail: [l.kojuharova@abv.bg](mailto:l.kojuharova@abv.bg)

### Докладът е рецензиран