

Изследване термо- и рН стабилността на антибиотичните вещества с антибактерийно действие на *Bacillus subtilis* TS 01

Севдалина Тодорова

Investigation of the thermal and pH stability of the antibiotic substances with antibacterial activity of *Bacillus subtilis* TS 01: The culture filtrate of *Bacillus subtilis* TS 01 showed strong growth inhibition activity *in vitro* against the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris*. The antibacterial activity was stable over a wide pH range from 5.5 to 9.5. The active metabolites in the filtrate were found to be quite thermally stable with more than 53.33 % of the antibacterial activity even after being held at 120°C for 20 min. In addition, the antibacterial activity of the filtrate remained almost unchanged when the culture was exposed to a pH ranging from 5.5 to 8.5, but significantly reduced after the filtrate had been exposed to alkali conditions (pH 9.5) for 15 min.

Key words: *Bacillus subtilis* TS 01, biocontrol, biopesticides, phytopathogenic bacteria, antibacterial activity, thermostability and pH stability.

ВЪВЕДЕНИЕ

Биопестицидите, представляващи естествени биологични агенти и/или техните метаболити, са важно средство за биологичен контрол на болестите по растенията [7]. За получаване на бактериини биопестициди, едни от най-използваните бактерии като биоагенти в контрола на фитопатогените, са грамположителните спорообразуващи бактерии от род *Bacillus*, в т.ч. *Bacillus subtilis* [7]. Те обикновено се считат за безопасни и непатогенни, което е от съществено значение за прилагането им като биопестициди. Спорите им са изключително устойчиви латентни форми, способни да издържат на високи температури, неблагоприятно рН, липса на хранителни вещества и влага. Образоването на спори е предимство при промишленото производство на разнообразни търговски форми на биопестицидите с висока жизнеспособност.

В състава на биопестицидите влизат също много и структурно различни антимикубни съединения, които активни щамове на *B. subtilis* продуцират. На тях се дължат антагонистичните свойства на бактерията срещу голям брой фитопатогенни гъби и бактерии, както в условия *in vitro*, така и *in vivo*, а в някои случаи и *in planta* [3, 6, 14]. *B. subtilis* синтезира антибиотици, най-вече липопептидите от семействата на итурин, сърфактин и фенгицин [2, 8, 10], токсини, ензими и други биологично активни вещества. По-добре проучена е антигъбната активност на тези метаболити, но природни изолати *B. subtilis* имат силна антимикубна активност и срещу фитопатогенни бактерии, като *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. campestris*, *Burkholderia cepacia*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Corynebacterium michiganense*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrimans* [4, 11].

Във връзка с получаването, срока на годност, условията на съхранение и приложението на биопестицидите на база *B. subtilis* за контрол на фитопатогените, е от особена важност активните вещества с антимикубно действие да са стабилни и тяхната активност да не се влияе значително от факторите на външната среда.

В предишно изследване от българска почва е изолиран *B. subtilis* TS 01 [13], който проявява широк спектър на антибактерийно действие. Щамът е перспективен като биоагент за контрол на бактериини фитопатогени, което се дължи на продуцирането на антибиотични вещества с пептидна и не пептидна природа.

Целта на това проучване е да се изследва термо- и рН стабилността на антибиотичните антибактерийни вещества на *B. subtilis* TS 01, във връзка с производството на биопрепарат за биологичен контрол на бактериини фитопатогени.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Материали и методи

Микроорганизми

В експериментите е използван *B. subtilis* TS 01 [13], който се съхранява в Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури под номер НБПМКК 8718. Щамът е изолиран от българска почва и е антагонист на редица бактериални фитопатогени.

Като тест-микроорганизъм е използван фитопатогенът *Xanthomonas campestris* - от колекцията на катедра "Биотехнологии и хранителни технологии" при РУ „А. Кънчев“, Филиал-Разград. Поддържа се на наклонен месо-пептонен агар (NA, Difco) чрез периодично препосяване. Съхранява се при 0-4 °С.

Хранителна среда и условия на култивиране на *B. subtilis* TS 01

За култивиране на щама е използвана оптимизирана хранителна среда за проявяване на максимална антибактерийна активност, със състав (в %): глюкоза 2.5; царевичен екстракт 0.56; KH_2PO_4 0.2; MgSO_4 0.01; pH=7.0 [1].

Култивирането е проведено дълбочинно в ерленмайерови колби от 500 cm³, съдържащи 50 ml хранителна среда, при 28 °С, на ротационна клатачка при 220 min⁻¹, за 72 h. Инокулатът е 2 % (v/v) 18 h вегетативен материал, получен на наклонен NA, в епруветки.

Получаване на стерилен филтрат от културална течност на *B. subtilis* TS 01

Културалната среда е центрофугирана при 4000 min⁻¹ за 30 min за отделяне на биомасата. Получената културална течност е филтрувана през стерилен мембранен филтър (0.22 μm) (Millipore) [9].

Определяне на pH- и термостабилност на антибиотичните вещества с антибактерийно действие в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01

Активната киселинност на получения стерилен филтрат от културална течност на *B. subtilis* TS 01 е определена потенциометрично, с pH-метър ТМ6, и е коригирана със HCl или NaOH, както следва: pH 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 и 9.5.

За определяне влиянието на температурата върху стабилността на антибиотичните вещества с антибактерийно действие, вариантите с различно pH са подложени на температурно въздействие от 4, 25, 40, 50, 70, 100 и 120 °С за различен период от време, по следната схема:

- при 4 °С - вариантите с различно pH са съхранявани 96 h и проби за определяне на активността са вземани на всеки 24 h;
- при 25 °С (стаяна температура) - вариантите престояват 24 h и проби за определяне на активност са вземани в 1, 2, 4, 6, 12 и 24 h;
- при 40, 50, 70 и 100 °С - пробите с различно pH са загрявани на водна баня в продължение на 120 min. Активността е определяна през 30 min;
- при 120 °С - за определяне активността на вариантите с различно pH, аликвотни проби са автоклавиращани в продължение на 5, 10, 15 и 20 min.

Определяне на антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01

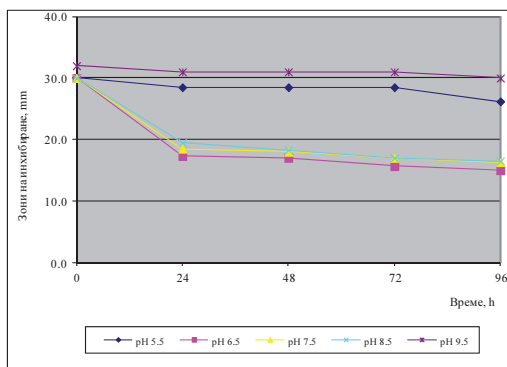
Активността на филтратите е определяна по метода на дифузия в картофено-декстрозен агар (КДА, HiMedia) с ямки. Тест-микроорганизмът е посят в хранителната среда, след охлаждането ѝ до 45 – 48 °С, в количество 1 ml суспензия, с титър 1.10^9 кое ml⁻¹ /100 ml среда. Посятата хранителна среда е разлята по 20 ml в петриеве блюда (d=100 mm), поставени на нивелирана повърхност. С цилиндричен нож, във всяко петриево блюдо, са направени по 4 ямки (d=7 mm). В ямките са накапани по 30 μl от стерилните филтрати на *B. subtilis* TS 01. Петриевите блюда са оставени при стайна температура за 30 min, за да дифундират антибиотичните

вещества в агаровата пластинка. След това са термостатирани при 28 °С за 1 – 3 дни. За наличието и степента на действие на антибиотичните вещества на *B. subtilis* TS 01, се съди по оформените стерилните зони около ямките. Определени са диаметрите на стерилните зони в mm. Опитите са проведени в двукратна повторяемост.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите, относно влиянието на рН и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01, са отразени на фигури 1-7.

От представените графики се вижда, че съдържащите се в стерилния филтрат на *B. subtilis* TS 01 антибиотични вещества, са стабилни при промяна на рН в границите от 5.5 до 9.5. При получаването му стерилният филтрат е с рН 8.9 и антибактерийната му активност срещу *X. campestris* е 32.0 mm стерилна зона. При коригиране на рН антибиотичните вещества запазват най-висока активност в алкална среда - при рН 9.5, която намалява при подкисляване на филтрата до 30.0 mm стерилна зона.



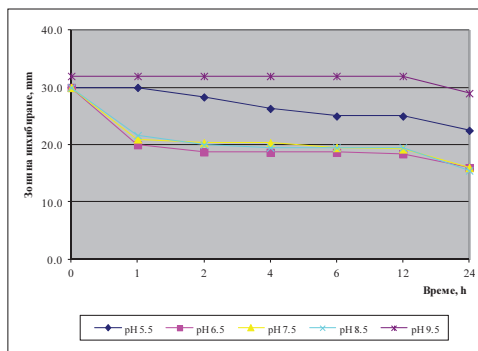
Фиг. 1 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *X. campestris* при 4 °С

От представените резултати на фигури 1-7 се вижда също, че антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01 се запазва при температурно въздействие дори до 120 °С, но в различна степен в зависимост от стойността на рН.

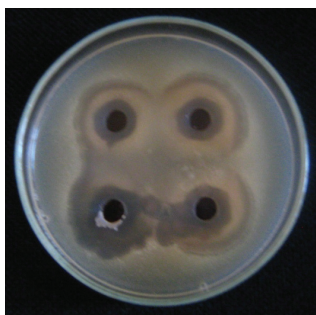
При ниска (4 °С) и стайна температура (25 °С) активността на филтрата е най-висока и стабилна при рН 9.5. В края на съответния период на наблюдение, при *B. subtilis* TS 01 се отчитат стерилни зони от 30 и 29 mm. Интересно е да се отбележи, че при стайна температура около първоначално образуваните стерилни зони се формират допълнително зони на бактериостатично действие, в които бактериалната маса на тест-микроба впоследствие лизира (сн. 1). Този ефект е наблюдаван от Földes et al. [5] при щам *B. subtilis* IFS-01 и е определен от авторите като феномен. При проведените от нас изследвания се установи, че висока и стабилна е активността и на филтрата с кисела реакция (рН 5.5) при 4 °С – 26.2 mm (фиг. 1). До 75 % се запазва активността му и при стайна температура, което се вижда от графиката на фигура 2.

Няма съществено различие в активността на пробите с близка до неутралната и слабо алкална среда (рН 6.5-8.5) при 4 °С и 25 °С. Наблюдава се една и съща зависимост, а именно активността на антибиотичните вещества намалява в началото на периода на отчитане и след това се запазва стабилна до края на въздействието, в стойности от 15 до 16.5 mm на стерилните зони (фиг. 1 и 2).

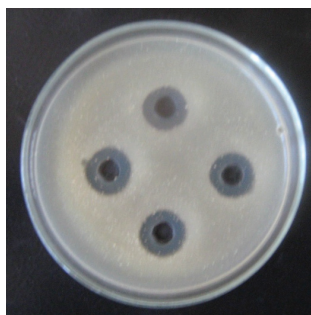
При тези температурни условия активността на филтрата е най-висока и стабилна в алкалните и кисели стойности на рН. С по-ниска активност, но също стабилни, са филтратите с близка до неутралната и слабо алкална среда. Това е много важна характеристика за *B. subtilis* TS 01, във връзка с обработка, съхранение, транспортиране и приложение на неговите биопрепарати.



Фиг. 2 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *X. campestris* при 25 °С



Сн. 1 Активност на стерилен филтрат с рН 9.5 при температурно въздействие 25 °С, в продължение на 12 h, срещу *X. campestris*

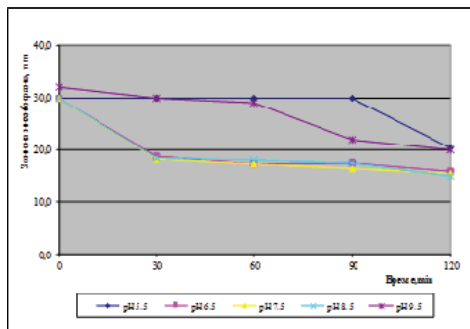


Сн. 2 Активност на стерилен филтрат с рН 5.5 при загряване на 120 °С, в продължение на 20 min, срещу *X. campestris*

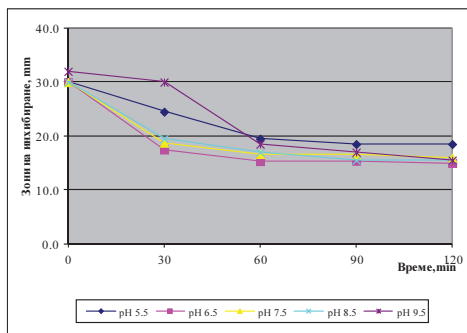
От графиките на фигури 3 и 4 се вижда, че при загряване на пробите филтрат до 40 и 50 °С активността е най-висока в алкална и кисела среда. Стабилността на антибиотичните вещества на филтрат с рН 5.5 след 120 min загряване при 40 °С намалява до 67.66 %, а на филтрат с рН 9.5 активността спада след 90 min загряване до 62.5 %. Пробите с рН 6.5-8.5 запазват почти непроменена своята активност при загряване до 40 и 50 °С (фиг. 3, 4). Характерът на изменение на стабилността следва същата зависимост, както при 4 и 25 °С, т.е. отначало активността намалява плавно и след това се запазва стабилна до края на съответния режим на загряване.

От представените графики на фигури 5-7 се вижда, че при загряване от 70 до 120 °С активността на антибиотичните вещества при всички стойности на рН намалява в началото на периода на загряване и след това се запазва стабилна. Най-висока активност се наблюдава в кисела среда (рН 5.5).

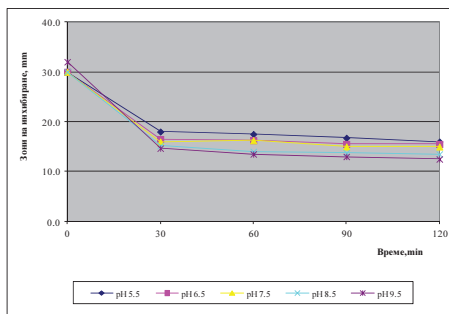
Важно е да се отбележи, че активността на антибиотичните вещества се запазва и при загряване до 120 °С за 20 min (фиг. 7). Тя е най-висока в кисела среда, при pH 5.5 – до 53.33 %, като размерът на стерилните зони е 16 mm в диаметър (сн. 2). Най-ниска е активността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат с алкална среда - pH 9.5. След 10 min автоклавиране тя се запазва до 31.25 %, а след 15 min автоклавиране се инактивира.



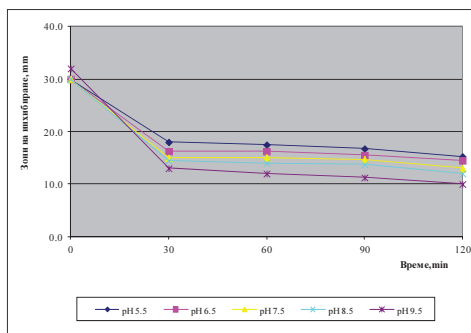
Фиг. 3 Влияние на pH и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *X. campestris* при 40 °С



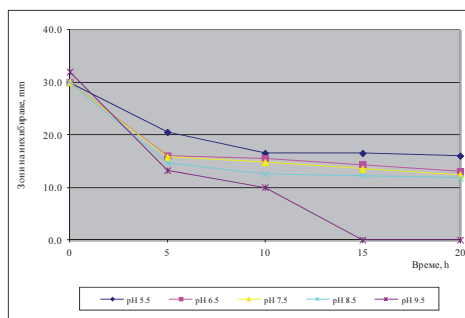
Фиг. 4 Влияние на pH и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *X. campestris* при 50 °С



Фиг. 5 Влияние на pH и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *X. campestris* при 70 °С



Фиг. 6 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *X. campestris* при 100 °С



Фиг. 7 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *X. campestris* при 120 °С

Получените от нас резултати показват, че антибиотичните вещества с антибактерийно действие в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 са термоустойчиви в значителна степен и стабилни в изследваните граници на рН. В това отношение изследванията ни корелират с тези на Tabbene et al. [12], които съобщават, че антибактериалната активност на *B. subtilis* V38 е стабилна в широк диапазон на рН и след автоклавиране при 121 °С в продължение на 20 минути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от проведения опит позволяват да обобщим, че без загряване на филтрата рН не оказва съществено влияние върху антибактерийната активност на *B. subtilis* TS 01. Тя се проявява както в кисела, така и в неутрална и алкална среда. При стайна температура и при 4 °С активността на антибиотичните вещества е стабилна и е най-висока в алкална и кисела реакция. Продуцираните от *B. subtilis* TS 01 антибиотични вещества са термостабилни в значителна степен. Активността им се запазва дори при загряване на 120 °С, в продължение на 20 min. При тези условия тя е най-висока в кисела среда и намалява при алкализирането ѝ.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Кожухарова Л., С.Тодорова, Динамика на развитието и антибиотичната активност на *Bacillus subtilis* TS 01 в две оптимизирани хранителни среди, Научни

трудове на УХТ Пловдив, „Хранителна наука, техника и технологии-2013“, 2013, 60, 889-893

[2] Ahimou F., Ph.Jacques, M.Deleu, Surfactin and Iturin A Effects on *Bacillus subtilis* Surface Hydrophobicity, Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27, 749-754

[3] Bacon C.W., I.Yates, D.Hinton, F.Meredith, The Potential Impacts of Climate Variability and Change on Air Pollution-Related Health Effects in the United States, Environmental Health Perspectives Supplements, <http://ehp.niehs.nih.gov/members/2001/suppl-2/325-332bacon/bacon-full.html>

[4] Berić T., M. Kojić, S. Stanković, L. Topisirović, G. Degrassi, M. Myers, V. Venturi, D. Fira, Antimicrobial Activity of *Bacillus* sp. Natural Isolates and Their Potential Use in the Biocontrol of Phytopathogenic Bacteria, Food Technology and Biotechnology, 2012, 50/1, 25–31

[5] Földes T., I.Bánhegyi, 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, Journal of Applied Microbiology, 2000, 89, 840-846

[6] Helbig J., H.Bochow, Effectiveness of *Bacillus subtilis* (Isolate 25021) in Controlling *Botrytis cinerea* in Strawberry, Journal of Plant Diseases and Protection, 2001, 108/6, 545-559

[7] Marc O., J.Philippe, *Bacillus* Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol, Cell, 2007, 16/3, 115-125

[8] Okulate M., Antimicrobial Activity of Bioactive Compound(s) Produced by *Bacillus* Species, 2009, <http://www.mbl.edu/microbialdiversity/files/2012/08/13BolajiFinalReport.pdf>

[9] Phae C.G., M.Sasaki, M.Shoda, H.Kubota, Characteristics of *Bacillus subtilis* Isolated from Composts Suppressing Phytopathogenic Microorganism, Soil Science and Plant Nutrition, 1990, 36/4, 575-586

[10] Stein T., *Bacillus subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses and Specific Functions, Molecular Microbiology, 2005, 56/4, 845–857

[11] Sharga B.M., G.D. Lyon, *Bacillus subtilis* BS 107 as an Antagonist of Potato Blackleg and Soft Rot Bacteria, Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44/8, 777–783

[12] Tabbene O., I.B.Slimene, F.Bouabdallah, M.L.Mangoli, M.C.Urdaci, F.Limam, Production of Anti-methicillin-resistant Staphylococcus Activity from *Bacillus subtilis* sp. Strain B38 Newly Isolated from Soil, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 157/3, 407-419

[13] Todorova S., L.Kozhuharova, Characteristics and Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Soil, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26/7, 1207-1216

[14] Tourè 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* in Apple, Journal of Applied Microbiology, 2004, 96/5, 1151-1160

За контакти:

гл. ас. д-р Севдалина Тодорова, катедра “Биотехнологии и хранителни технологии”, Русенски университет “Ангел Кънчев”, Филиал Разград, тел.: 0882692828, E-mail: stodorova@uni-ruse.bg

Докладът е рецензиран