

## Стабилност на активните вещества с антигъбно действие във филтрат на *Bacillus subtilis* TS 01

Севдалина Тодорова

**Stability of antifungal active compounds in the filtrate of *Bacillus subtilis* TS 01:** *Bacillus subtilis* strain TS 01 showed strong inhibitory activity on growth of *Botrytis cinerea*. The antifungal activity was highly stable to heat and wide pH ranging from 5.5 to 9.5. The active metabolites in the filtrate were found to be quite thermally stable even after being held at 120°C for 20 min. In addition, the antifungal activity of the filtrate remained almost unchanged when the culture was exposed to a pH ranging from 5.5 to 9.5. The antifungal activity was with the highest - 64.8 % inhibition recorded when treated with pH 8.5 and lowest - 62.5 %, when the filtrate had been exposed to acid conditions (pH 5.5).

**Key words:** *Bacillus subtilis* TS 01, biocontrol, phytopathogenic fungi, antifungal activity, thermostability and pH stability.

### ВЪВЕДЕНИЕ

Използването на полезни микроорганизми (биопестициди) се счита за един от най-обещаващите методи за по-рационални и безопасни практики в земеделието. Признавайки опасностите от пестицидите върху човека и околната среда, много страни в света днес приемат биологичния контрол като най-добрата алтернатива на химическия метод за борба с болестите и вредителите по растенията [11]. Редица проучвания са в подкрепа на големия потенциал на *Bacillus subtilis* като агент за биологичен контрол срещу голям брой фитопатогенни гъби [4, 6, 8, 10]. Антимикробното му действие се дължи на способността да продуцира активни метаболити и най-вече липопептидни антибиотици и повърхностно активни вещества от семействата на сърфактин, итурин и фенгицин [1, 7, 13].

Много от антигъбните вещества на *B. subtilis* са описани като силно термоустойчиви или частично устойчиви и стабилни в широки граници на рН от 3 до 11 [4, 6, 10, 15], което е много важно условие при получаване на биопестициди на база активни щамове на бактерията. Запазването на активността на метаболитите ще гарантира дълъг срок на годност и по-малка необходимост от специални условия при съхранение и приложение на биопрепаратите.

*Bacillus subtilis* TS 01 е изолиран от българска почва [14] и проявява силно антигъбно действие срещу голям брой фитопатогени, дължащо се на продуцирането на антибиотични вещества с пептидна и не пептидна природа. Това прави щам много подходящ като биологичен агент за борба с редица причинители на гъбни заболявания по растенията.

Целта на настоящата работа е да се изследва термоустойчивостта и рН стабилността на антигъбните вещества във филтрат на *B. subtilis* TS 01, във връзка с получаването на биопрепарат за контрол на гъбни фитопатогени.

### ИЗЛОЖЕНИЕ

#### Материали и методи

#### Микроорганизми

В експериментите е използван изолираният от българска почва антагонист *B. subtilis* TS 01 [14], проявяващ силно изразени антимикробни свойства срещу редица гъбни фитопатогени. Щамът се съхранява се в Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури под номер НБПМКК 8718.

Като тест-микроорганизъм е използван фитопатогенът *Botrytis cinerea* - от колекцията на катедра "Биотехнологии и хранителни технологии" при РУ „А. Кънчев“, Филиал-Разград. Поддържа се на наклонен агар на Сабуро (Biolife) чрез периодично препосвяване. Съхранява се при 0-4 °С.

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

За проучване на антибиотичната активност на *B. subtilis* TS 01 е проведено дълбочинно култивиране в ерленмайерови колби от 500 cm<sup>3</sup>, съдържащи 50 ml глюкозо-пептонна среда №3 [9], при 28 °C, на ротационна клатачка при 220 min<sup>-1</sup>, за 72 h. Средата е посята с 2 % (v/v) вегетативен, 18 h материал, получен на наклонен месо-пептонен агар (NA, Difco) в епруветки.

### **Получаване на стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01**

Културалната среда е центрофугирана при 4000 min<sup>-1</sup> 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 антигъбно 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 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 антигъбно действие вариантите с различно pH са подложени на температурно въздействие от 4, 25, 40, 50, 70, 100 и 120 °C за различен период от време. Използвана е следната схема:

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

### **Определяне на антибиотичната активност**

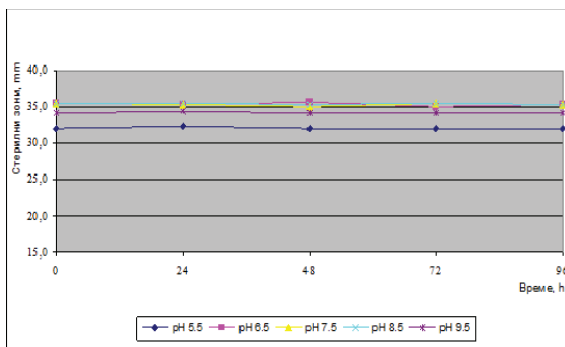
Активността на филтратите е определяна по метода на дифузия в картофено-декстрозен агар (КДА, HiMedia) с ямки. В петриеви блюда (d=100 mm), поставени на нивелирана повърхност, е разлята по 20 ml КДА. След застиването на хранителната среда, плесенната гъба е посята повърхностно с 0.1 ml суспензия с титър 1.10<sup>5</sup> кое ml<sup>-1</sup>. С цилиндричен нож, във всяко петриево блюдо, са направени по 4 ямки (d=7 mm). В ямките, при повторение от две петриеве блюда, са накапани по 30 µl от стерилните филтрати на *B. subtilis* TS 01. Петриевите блюда престояват при стайна температура за 30 min, за да дифундират антибиотичните вещества в агаровата пластинка. След това са термостатирани при 28 °C 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 повтораемост.

### **РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

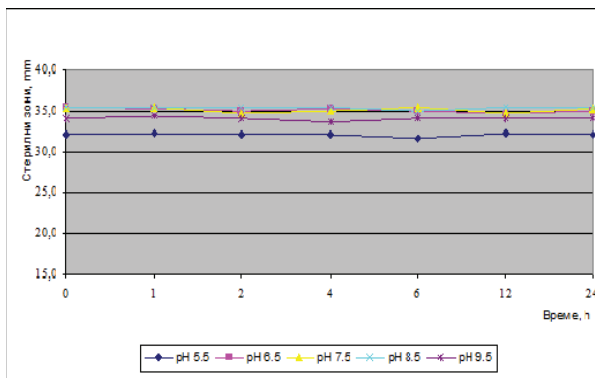
Резултатите от изследванията върху стабилността на антигъбните вещества във филтратата на *B. subtilis* TS 01 са отразени на фигури 1-7. От представените графики се вижда, че стерилният филтрат от културална течност на *B. subtilis* TS 01 е стабилен при промяна на pH в границите от 5.5 до 9.5 и антигъбната му активност варира от 32.0 до 35.5 mm. Най-висока активност антибиотичните вещества имат при pH 7.5 – 8.5, която намалява при подкисляване на филтратата, по-значимо при pH 5.5.

От представените резултати на фигури 1-7 се вижда също, че антигъбната активност на *B. subtilis* TS 01 се запазва и е стабилна при температурно въздействие

дори до 120 °С. При ниска (4 °С) и стайна температура (25 °С) не се наблюдава никакво изменение в активността на филтрата при всички варианти на рН за изследвания период от време (фиг. 1 и фиг. 2, съответно). Тя е напълно стабилна до края на периода на загряване. Това е много важна характеристика за *B. subtilis* TS 01, която гарантира време за съхранение, обработка, транспортиране на културалната среда. При тези температурни условия данните показват, че активността на филтрата е най-висока в алкалните стойности на рН. Такава зависимост отчитат и Kong et al. [3] при щам В-903.



Фиг. 1 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антигъбните вещества във филтрата на *B. subtilis* TS 01 срещу *B. cinerea* при 4 °С



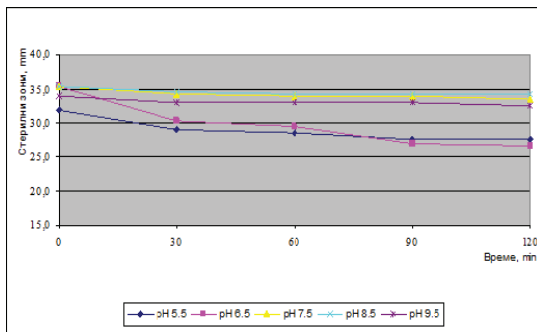
Фиг. 2 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антигъбните вещества във филтрата на *B. subtilis* TS 01 срещу *B. cinerea* при 25 °С

При загряване на филтрата до 40 °С, пробите с рН 7.5-9.5 запазват абсолютно непроменена своята активност (фиг. 3). Понижение в активността се наблюдава в слабо кисела среда (рН 5.5 – 6.5), където отчетените стерилни зони в 120 min са с диаметър 26.6 mm.

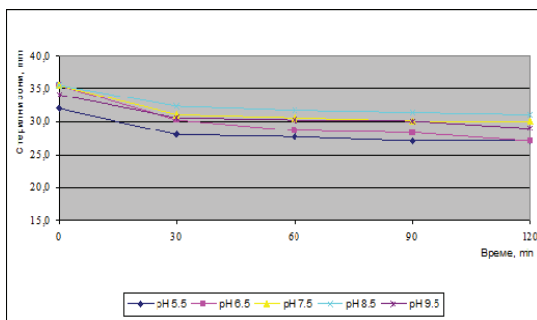
При загряване на филтрата от 50 до 120 °С се наблюдава една и съща зависимост, а именно: активността на антибиотичните вещества при всички стойности на рН намалява в началото на периода и след това се запазва стабилна до края на съответния режим на загряване (фиг. 4-7). Важно е да се отбележи, че активността на антигъбните метаболити не се инактивира и при загряване до 120 °С за 20 min при всички стойности на рН (фиг. 7). Най-висока тя се запазва в алкална среда при рН 8.5 – до 64.8 %. Най-ниска е активността на антибиотичните вещества

във филтрат със слабо кисела реакция (pH 5.5). След 20 min автоклавиране тя се запазва до 62.5 %, като стерилната зона, която се образува, е 20.0 mm.

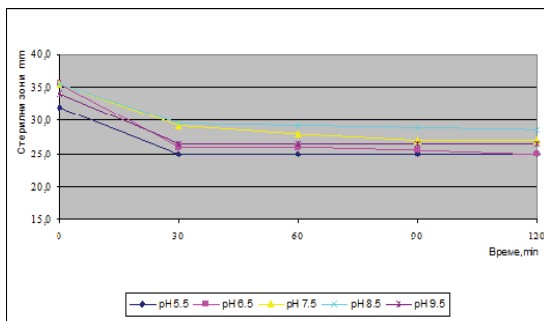
Получените резултати при направеното изследване показват, че антибиотичните вещества в стерилен филтрат на *B. subtilis* TS 01 са термоустойчиви в значителна степен и стабилни в изследваните граници на pH. В това отношение изследванията ни корелират с тези на Li et al. [4], Wang et al. [15] Sharga and Lyon [11]



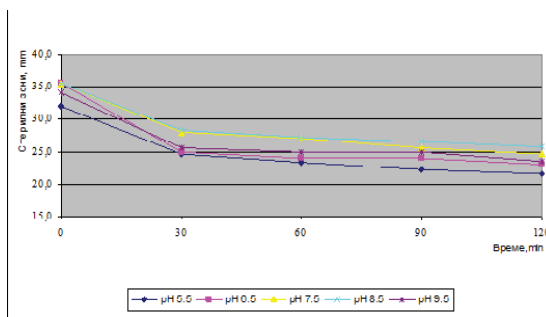
Фиг. 3 Влияние на pH и температурата върху стабилността на антигъбните вещества във филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *B. cinerea* при 40 °C



Фиг. 4 Влияние на pH и температурата върху стабилността на антигъбните вещества във филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *B. cinerea* при 50 °C

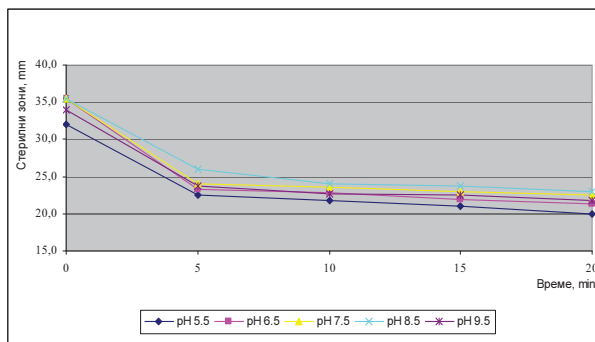


Фиг. 5 Влияние на pH и температурата върху стабилността на антигъбните вещества във филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *B. cinerea* при 70 °C



Фиг. 6 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антигъбните вещества във филтрат на на *B. subtilis* TS 01 срещу *B. cinerea* при 100 °С

Наблюдават се различия в получените резултати от нас и от Kong et al. [3]. Авторите отчитат стабилност на активната субстанция на *B. subtilis* В-903 при загряване от 121 °С за 20 min, но само в кисела среда. Антибиотичните вещества, които McKeen et al. [5] проучват, са стабилни при автоклавиране при рН под 5, но при рН около 7 не проявяват активност. Helbig and Vochow [2] установяват, че инхибиращият ефект на филтрат от културална среда на *B. subtilis* 25021 се губи при автоклавиране. Различията вероятно се дължат на специфичните антибиотични вещества, които отделните щамове продуцират.



Фиг. 7 Влияние на рН и температурата върху стабилността на антигъбните вещества във филтрат на *B. subtilis* TS 01 срещу *B. cinerea* при 120 °С

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от проведения анализ позволяват да обобщим, че без загряване на филтрата рН не оказва съществено влияние върху фунгицидната активност на *B. subtilis* TS 01. Тя се проявява почти в еднаква степен, както в слабо кисела, така и в неутрална и алкална среда. При стайна температура и при 4 °С активността на антибиотичните вещества не се променя в течение на времето и е най-висока в алкална реакция. Продуцираните от *B. subtilis* TS 01 антигъбни метаболити са термостабилни в значителна степен. Активността им се запазва дори при автоклавиране на 120 °С, в продължение на 20 min. При тези условия тя е най-висока в алкална реакция и намалява при подкисляване на средата.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ahimou F., Ph.Jacques, M.Deleu, Surfactin and Iturin A Effects on *Bacillus subtilis* Surface Hydrophobicity, Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27, 749-754
- [2] 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
- [3] Kong J., W.Wang, B.Zhao, H.Cheng, X.Shen, G.Zhang, Study on Characteristic of Antifungus Substance from *Bacillus subtilis* B-903 Strain, Acta Microbiologica Sinica, 1992, 32/6, 445-449
- [4] Li H., X.Wang, M.Han, Z.Zhao, M.Wang, Q.Tang, C.Liu, B.Kemp, Y.Gu, J.Shuang, Y.Xue, Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and Its Potential Application in Control of Replant Diseases, African Journal of Biotechnology, 2012, 11/1, 231-242
- [5] McKeen C.D., C.C.Reilly, P.L.Pusey, Production and Partial Characterization of Antifungal Substances Antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*, Phytopathology, 1986, 76, 136-139
- [6] Nalisha I., M.Muskhazli, T.Nor Farizan, Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*, Malaysian Journal of Microbiology, 2006, 2/2, 19-23
- [7] Okulate M., Antimicrobial Activity of Bioactive Compound(s) Produced by *Bacillus* Species, 2009, <http://www.mbl.edu/microbialdiversity/files/2012/08/13BolajiFinalReport.pdf>
- [8] Oyedele, A. O., & Ogunbanwo, T. S., Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Isolated from Some Condiments and Soil, African Journal of Microbiology Research, 2014, 8/18, 1841-1849
- [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] Ruangwong O., C.I.Chang, A.L.Senghor, W.J.Liang, Identification of Antifungal Compound Produced by *Bacillus subtilis* LB5 with Ability to Control Anthracnose Disease Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, African Journal of Microbiology Research, 2012, 6/16, 3732-3738
- [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] Souto G.I., O.S.Correa, M.S.Montecchia, N.L.Kerber, N.L.Pucheu, M.Bachur, A.F.Garcia, Genetic and Functional Characterization of a *Bacillus* sp. Strain Excreting Surfactin and Antifungal Metabolites Partially Identified as Iturin-like Compounds, Journal of Applied Microbiology, 2004, 97, 1247-1256
- [13] Stein T., *Bacillus subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses and Specific Functions, Molecular Microbiology, 2005, 56/4, 845-857
- [14] 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
- [15] Wang S.L., I.L.Shih, C.H.Wang, K.C.Tseng, W.T.Chang, Y.K.Twu, J.J.Ro, C.L.Wang, Production of Antifungal Compounds from Chitin by *Bacillus subtilis*, Enzyme and Microbial Thechnology, 2002, 31, 321-328

### 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](mailto:stodorova@uni-ruse.bg)

Докладът е рецензиран