

ХАРАКТЕРИСТИКА НА АНТИБИОТИЧНИТЕ ВЕЩЕСТВА В КУЛТУРАЛНА ТЕЧНОСТ НА *BACILLUS SUBTILIS* TS 01

Севдалина Тодорова

Русенски университет „Ангел Кънчев“, Филиал – Разград, 7200 Разград, България,
E-mail: stodorova@uni-rise.bg

CHARACTERISTIC OF ANTIBIOTIC SUBSTANCES IN CULTURE BROTH LIQUID OF *BACILLUS SUBTILIS* TS 01

Sevdalina Todorova

Department of Biotechnologies and Food technologies, Ruse Angel Kanchev University – Razgrad Branch, 7200 Razgrad, Bulgaria, E-mail: stodorova@uni-rise.bg

ABSTRACT

Bacillus subtilis TS 01 exhibits antimicrobial action against phytopathogenic microorganisms. By means of Thin Layer Chromatography (TLC) and biochromatography it has been established that in the culture broth the strain synthesizes a complex of antibiotic substances with antifungal and antibacterial activity. The best separation of the substances has been achieved in a system of butanol : acetic acid : water (3 : 1 : 1, v/v/v). Using biochromatography five active substances with R_f-values of 0.19, 0.39, 0.50, 0.58 and 0.70 have been determined. With the aid of a TDM-reagent five of the substances with antifungal and antibacterial action have been determined as peptides. Two anti-Botrytis antibiotics and a substance with antibacterial activity have not shown the characteristic coloration with the TDM-reagent and due to this they are hardly likely to be peptide compounds.

Key words: *Bacillus subtilis* TS 01, Thin-layer chromatography (TLC), biochromatography, antimicrobial activity

Bacillus subtilis продуцира вещества с антимикробно действие с невероятно разнообразие от структури. Произведените антимикробни активни съединения включват предимно пептиди, както и не пептидни съединения, като поликетиди, аминокзахари, фосфолипиди (Stein, 2005).

Антибиотичните вещества, синтезирани от *B. subtilis*, проявяват антигъбна и/или антибактерийна активност срещу редица фитопатогенни микроорганизми (Leifert et al., 1995; McKeen et al., 1986; Yazgan et al., 2001; Montesinos, 2007). Продуцирани в условия *in vitro*, те са основните компоненти, отговорни и за биологичния контрол *in vivo* на редица болести по растенията (Helbig and Vochow, 2001; Montesinos, 2007).

Итурините са семейство от циклични липопептидни антибиотици, извлечени от културалната среда на различни щамове *B. subtilis*. Те имат общ ред на подреждане: β-аминомастна киселина (като липидна част) – Asn – Тур – Asn и показват вариации в другите четири позиции (Maget-Dana and Peuroux, 1994). Различават се итурин А, итурин D, итурин Е. В система хлороформ : метанол : вода (65:25:4, v/v) петна им са с R_f-стойности съответно: 0.35 – итурин А; 0.18 – итурин D; 0.60 – итурин Е. Итуриновите антибиотици бациломицин L и бациломицин L-метилестер образуват петна съответно с R_f 0.16 и 0.58 (Besson and Michel, 1987, 1991). Като тест-микроорганизъм при биохроматограмата е използван *Saccharomyces cerevisiae*.

Редица щамове *B. subtilis* синтезират вещества, които проявяват освен антибиотични и повърхностно активни свойства и се класифицират като биосърфактанти. Между всички класове особено интересни са липопептидите. Подобно на итурините, те са изградени от седем остатъка на α-аминокиселини, като един е съвършено различен от тези на итуриновата

група. Вместо β -аминомастна киселина съдържат една β -хидроксимастна киселина (Ahimou et al., 2000).

Фенгицин (плипастин) съчетава няколко изключителни структурни свойства: циклизация, разклоняване и необичайни съставни части (Stein, 2005).

Способността да продуцира липопептиди от класовете сърфактин, итурин и фенгицин с антибиотични свойства и висока повърхностна активност (Ahimou et al., 2000; Razafindralambo et al., 1998), прави *B. subtilis* могъщ агент за биологичен контрол на болестите по растенията.

Според Wang et al. (2002) синтезираните нови фунгициди от *B. subtilis* W113 и *B. subtilis* W118 не могат да се отъждествят с описаните антигъбни пептидни антибиотици – итурин А и сърфактин. Новооткритите фунгициди имат по-големи молекулни маси.

Yazgan et al. (2001) съобщават за продуциране на дипептида бацилизин, Идентифициран е чрез ТСХ в система бутанол : оцетна киселина : вода (4:1:1, v/v) и биохроматография със *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Петното, проявяващо активност, е с Rf 0,27.

Patel et al. (1995) за първи път докладват за нов полиенов антибиотик, изолиран от културална среда на *B. subtilis* ATCC 55422. Това е антибиотикът бацилаен, определен чрез UV-спектър, като хексаен. Активното вещество е определено с ТСХ в метанол : хлороформ (40:60, v/v) и биохроматография срещу силно чувствителен щам *Escherichia coli* SGB888, и има Rf-стойност 0,76.

B. subtilis TS 01 е изолиран от българска почва и таксономично определен (Todorova and Kozhuharova, 2010). Щамът е продуцент на антибиотични вещества с много широк спектър на действие срещу фитопатогенни гъби и бактерии и е перспективен биоконтролиращ агент за растителна защита.

Целта на настоящата работа е характеристика на антибиотичните вещества в културална течност на *B. subtilis* TS 01 чрез тънкослойна хроматография и биохроматография.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Щам-продуцент

В изследванията е използван щам *B. subtilis* TS 01. Съхранява се в Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури под номер НБПМКК 8718.

2. Тест-микроорганизми

Като тест-микроорганизми са използвани *Botrytis cinerea* и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Ro от колекцията на катедра “Биотехнологии и хранителни технологии” на РУ „Ангел Кънчев” – Филиал Разград. Поддържането, съхранението им и приготвянето на суспензии от тях е по методиката на Todorova and Kozhuharova (2010).

3. Култивиране на *Bacillus subtilis* TS 01

Развитието на *B. subtilis* TS 01 е осъществено дълбочинно в Ерленмайерови колби от 500 ml с 50 ml хранителна среда. Култивирането е проведено при температура 28 °C, на ротационна клатачка (220 min⁻¹), за 72 h. Инокулатът е 2 % (v/v), с 18-часов вегетативен посевен материал.

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

Културалната среда се центрофугира при 4000 min⁻¹ за 30 min за отделяне на биомасата. Получената културална течност се филтрува през стерилен мембранен филтър (0.22 μ m) (Millipore).

5. Тънкослойна хроматография

ТСХ за разделяне на антибиотичните вещества в стерилен филтрат от културална течност на *B. subtilis* TS 01 е проведена по метода на Leifert et al. (1995). Използвани са следните разтворители и системи:

- Ацетон
- Етанол : вода (2 : 1, v/v)
- Бутанол : оцетна киселина : вода (3: 1 : 1, v/v/v)
- Хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4, v/v/v)
- Метанол : хлороформ : вода (65 : 30 : 5, v/v/v)

Те се поставят в хроматографска камера в слой с височина 0,5 cm. Използвани са хроматографски плаки със силикагел 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm (Merck, Germany). На старта на хроматографската плака с микропипета се поставят по 50 µl от стерилен филтрат на културална течност на *B. subtilis* TS 01. Хроматограмите се правят в три повторения. Едното копие на хроматограмите след развитие се суши при 60 °C за около 15 min и се напръсква с ТДМ-реактив (Тетраметилдиамино-дифенилметан), за доказване на пептидни антибиотици по метода на Arx et al. (1976). След напръскване на хроматограмите с ТДМ-реактива се появяват зелени петна, чийто цвят се променя от синьо-зелен до синьо-черен при наличие на пептиди. Петната са трайни на въздуха с часове, а на тъмно – с дни. Определят се Rf – сойностите на активните вещества.

6. Биохроматография

С другите две копия на хроматограмите се провежда биохроматография по метода на Leifert et al. (1995). Хроматограмите се изсушават в продължение на 5 h при 70 °C, след което се полагат върху агарова хранителна среда, посята с гъбен и бактериен тест-микроорганизъм. Оставят се на студено за 30 min, за да дифундират антибиотичните вещества в агаровите пластинки. След това хроматографските плаки се отстраняват, а биохроматограмите се развиват в термостат при 26 °C и 30 °C съответно, за 72 h при *B. cinerea* и 24 h при *P. syringae* pv. *tomato* Ro. Установяват се активните петна и се определят техните Rf – сойности.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

B. subtilis TS 01 синтезира няколко антибиотични вещества, които определят неговата антигъбна и антибактерийна активност. При проведения хроматографски анализ най-добро разделяне на антибиотичните вещества се получава в системата разтворители бутанол : оцетна киселина : вода (3:1:1, v/v). На биохроматограмата се оформят пет активни петна. Техните Rf-стойности са представени в таблица 1.

Таблица 1

Биохроматограма на културалната течност на *B. subtilis* TS 01
в система бутанол : оцетна киселина : вода (3:1:1)

Тест-микроорганизъм	Rf	Оцветяване
<i>B. cinerea</i>	0.39	Синьо-зелено
	0.50	Синьо-черно
	0.70	Синьо-черно
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro	0.19	Синьо-черно
	0.58	Синьо-зелено

Три от петната са активни срещу *B. cinerea*. При обработка на хроматограмите с ТДМ-реактив, петната с Rf-стойности 0.50 и 0.70 придобиха характерното синьо-черно оцветяване. Това дава основание тези вещества да бъдат определени като пептиди. Анти-*Botrytis* антибиотикът с Rf 0.39 не придоби характерното оцветяване, затова е малко вероятно да бъде пептид.

Петно със същата Rf-стойност определят и Leifert et al. (1995) в културална течност на *B. subtilis* CL27 и *B. subtilis* CL45. При биохроматография с *B. cinerea* и *Alternaria brassicicola*, веществото е определено като основния анти-*Botrytis* антибиотик и, според авторите, е малко вероятно да е пептид, тъй като при визуализиране с ТДМ-реактив не

развива характерното синьо-черно оцветяване. При другите петна от нашата хроматограма няма съвпадение с изследванията на Leifert et al. (1995). Авторите също идентифициран още два пептидни антибиотика, но с Rf 0.56 и 0.61.

P. syringae pv. *tomato* Ro не е използван като тест-микроорганизъм в биохроматограми по литературни данни. Срещу него от филтратата на *B. subtilis* TS 01 са активни две вещества, образувайки петна с Rf 0.19 и 0.58. Един от антибиотиците е определен като пептид (с Rf 0.19), а другият – не.

При биохроматограмата след разделяне на веществата в системата етанол : вода (2:1, v/v) са отчетени 3 активни петна срещу *B. cinerea* и *P. syringae* pv. *tomato* Ro. Резултатите са представени в таблица 2.

Таблица 2

Биохроматограма на културалната течност на *B. subtilis* TS 01
в система етанол : вода (2:1)

Тест-микроорганизъм	Rf	Оцветяване
<i>B. cinerea</i>	0.54	Синьо-черно
	0.69	Синьо-зелено
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro	0.54	Синьо-черно
	0.21	Синьо-черно

Вещество с Rf стойност 0.54 е активно и срещу двата тест-микроорганизма. При визуализиране с ТДМ-реактив петното се оцветява от зелено до синьо-черно и се определя като пептид. Петно с Rf 0.21 с антибактерийна активност, също се определя като пептид по специфичното оцветяване. Третото петно е на анти-*Botrytis* антибиотик с Rf 0.69. Той не показва характерното оцветяване, затова е малко вероятно да е пептид.

Две петна с близки до нашите Rf-стойности определят McKeen et al. (1986), активни при биохроматограма срещу *Monilinia fructicola*. Петно с Rf 0.55 е нинхидрин позитивно и по данни на авторите е цикличен полипептид. Вещество с Rf 0.67 проявява антигъбна активност и е нинхидрин негативно, но също е цикличен полипептид (McKeen et al., 1986). Според авторите антибиотичните вещества са много сходни по свойства с итурин А.

Много близки по Rf-стойности са петната, които Ferreira et al. (1991) получават при разделяне с ТСХ на антибиотичните вещества в екстракт от културална течност на антагонистичен щам *B. subtilis*. При развитие на хроматограмата в смес от етанол : вода (2:1, v/v) под UV светлина авторите определят петна с антибиотична активност срещу *Eutypa lata* с Rf 0.55 и 0.59.

Същата система за хроматографски анализ чрез ТСХ използват и Sharga and Lyon (1998) при характеризиране на антибиотичните вещества, продуцирани от *B. subtilis* BS 107. При развитие на хроматограмата се образуват три петна с Rf-стойности 0.67, 0.69 и 0.75. Петната с Rf 0.67 и 0.69 са нинхидрин позитивни, но не са активни срещу *Erwinia carotovora* при проведената биохроматограма. Активност проявява петно с Rf 0.75, което е нинхидрин негативно. Според авторите антибиотикът е от групата на итурините.

Няма съвпадение с данни от литературата по отношение на третото петно от нашата хроматограма с Rf 0.21.

ИЗВОДИ

B. subtilis TS 01 продуцира комплекс от антибиотични вещества. Пет са с антигъбно действие, от които три имат пептидна структура, а две вероятно не са пептиди. Щамът продуцира и четири вещества с антибактерийно действие, от които три са пептиди, а едно – не е. Едно от пептидните антибиотични вещества е с широк спектър на действие, тъй като е активно срещу *B. cinerea* и *P. syringae* pv. *tomato* Ro.

Продуцирането на антибиотични вещества от *B. subtilis* е щамова особеност. Някои от антибиотичните вещества, които *B. subtilis* TS 01 синтезира, са различни по Rf стойности с цитираните в литературата. Тези различия още веднъж подчертават оригиналността на изолирания от българска почва щам *B. subtilis* TS 01.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahimou, F., Ph. Jacques, M. Deleu. 2000. Surfactin and Iturin A Effects on *Bacillus subtilis* Surface Hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*. 27, 749-754
2. Arx, E. V., M. Faupel, M. Brugger. 1976. Das 4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan Reagens (TDM) Eine Modifikation der Chlor-o-Tolidin Farbereaktion für die Dünnschicht-chromatographie. *Journal of Chromatography*. 120, 224-228
3. Besson, F., G. Michel. 1987. Isolation and Characterization of New Iturins: Iturin D and Iturin E. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 40, 4, 437-442
4. Besson, F., G. Michel. 1991. Influence of Divalent Ions on the Solubility of Iturin and Bacillomycin L, Antifungal Peptidolipids of *Bacillus subtilis*. *Microbios*. 65, 15-21
5. Ferreira, J. H. S., F. N. Matthee, A. C. Thomas. 1991. Biological Control of *Eutypa lata* on Grapevine by an Antagonistic Strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 81, 3, 283-287
6. Helbig, J., H. Bochow. 2001. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (Isolate 25021) in Controlling *Botrytis cinerea* in Strawberry. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 108, 6, 545-559
7. Leifert, C., H. Li, S. Chidburee, S. Hampson, S. Workman, D. Sigeo, H. A. S. Epton, A. Harbour. 1995. Antibiotic Production and Biocontrol Activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 97-108
8. Maget-Dana, R., F. Peypoux. 1994. Iturins, a Special Class of Pore-forming Lipopeptides: Biological and Physicochemical Properties. *Toxicology*. 87, 1-3, 151-174
9. McKeen, C. D., C. C. Reilly, P. L. Pusey. 1986. Production and Partial Characterization of Antifungal Substances Antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 76, 136-139
10. Montesinos E., 2007, Antimicrobial Peptide and Plant Disease Control, FEMS Microbiology, Letters 270, 1, 1-11
11. Patel, P. S., S. Huang, S. Fisher, D. Pirnik, C. Aklonis, L. Dean, E. Meyers, P. Fernandes, F. Mayerl. 1995. Bacillaene, a Novel Inhibitor of Prokaryotic Protein Synthesis, Produced by *Bacillus subtilis*: Production, Taxonomy, Isolation, Physicochemical Characterization and Biological Activity. *Journal of Antibiotics*. 48, 9, 997 – 1003
12. Razafindralambo, H., M. Deleu, C. Hbid, P. Jacques, P. Thonart, M. Paquot. 1998. Foaming Properties of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis*: Effect of Lipid and Peptide Structural Attributes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 911-916
13. Sharga, B. M., G. D. Lyon. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an Antagonist of Potato Blackleg and Soft Rot Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 44, 8, 777–783
14. Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 56, 4, 845–857
15. Todorova, S., L. Kozuharova. 2010. Characteristics and Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 26, 7, 1207 – 1216. doi: 10.1007/s11274-009-0290-1
16. 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
17. Yazgan, A., G. Özcengiz, E. Özcengiz, K. Kiliç, M. A. Marahiel, N. G. Alaeddinoğlu. 2001. Bacilysin Biosynthesis by a Partially-purified Enzyme Fraction from *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 29, 400-406