

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”**

---



## **Биоконтрол на фитопатогенни бактерии**

**НИКОЛАЙ СЛАВЧЕВ БАДЖИНЕРОВ**

### **АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”  
Професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Микробиология)

Научни ръководители: проф. д-р П. Мончева  
проф. д-р Н. Богацевска

**София**

**2017**

## СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА, ИЗПОЛЗВАНИ В ДИСЕРТАЦИЯТА

**АБК** - Агенти за биологичен контрол  
**АХЛ** - Ацил-хомосерин лактони  
**ДНК** - Дезоксирибонуклеинова киселина  
**ЕС** - Европейски съюз  
**ИСП** - Индуцирана системна устойчивост  
**ИЗР** - Институт за защита на растенията (вече бивш)  
**рРНК** - Рибозомна рибонуклеинова киселина  
**тРНК** - Транспортна рибонуклеинова киселина  
**СПР** - Системна придобита резистентност  
**УВ** - Ултравioletова светлина  
**ХСЛ** - Хомосерин лактони  
**BLAST** - Basic Local Alignment Search Tool  
**bp** (base pairs) - Базови двойки  
**BuOH** – Бутилов алкохол  
**C-NMR** – Carbon nuclear magnetic resonance  
**СТР** (Cytidine Triphosphate) - Цитидин трифосфат  
**F** (Flexibilis) – Извити  
**FTIR**- Fourier Transform Infrared Spectroscopy  
**GenBank NCBI** (National Center for Biotechnology Information)-  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>  
**HR** - Свърхчувствителна реакция  
**H-NMR** – Proton nuclear magnetic resonance  
**ISP** (International Streptomyces Project) - Международен стрептомицетен проект  
**MeOH** – Метиллов алкохол  
**МИС** – Минимална инхибираща концентрация  
**MS**- Mass spectrometry  
**NA** (Nutrient Agar) – Хранителен (месопептонен) агар  
**NBIMCC** - Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури  
**PCR** (Polymerase Chain Reaction) - Полимеразна верижна реакция  
**PGPR** - Plant-growth-promoting rhizobacteria  
**PrOH** – Пропилов алкохол  
**QQE** - Quorum quenching enzymes  
**QS** - Quorum sensing  
**R** (Rectus) - Прави  
**RA** (Retinaculum-Apertum) - Отворени спирали  
**S** (Spira) - Спирали  
**TLC** (Thin-Layer Chromatography) -Тънкослойна хроматография  
**TTC** – Triphenyl tetrazolium chloride  
**UV** - Ултравioletови лъчи  
**UV-VIS** - Ultraviolet–visible Spectroscopy  
**YDC** - Yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>  
**YEME** - Yeast extract-Malt extract

# УВОД

Ежегодно културните растения се нападат от болести, причинени от различни микроорганизми – вируси, гъби, бактерии, което нанася вреда и загуби от селскостопанска продукция (Boussaber et al., 2014). За да се запази качеството и количеството на храни, трайни култури и насаждения от производители в световен мащаб е необходимо регулиране на разпространението и контрол на болестите по растенията, което е едно от основните направления в растителната защита. За тази цел се използват различни подходи за предотвратяване, миграция или контрол на заболяванията. В повечето селскостопански практики се разчита основно на химични фертилизатори и пестициди. Този подход в селското стопанство е довел до значителни подобрения в производството на посеви и високо качество на произвежданата продукция през последните 100 години. Все пак, замърсяването на околната среда причинено от свръхупотреба и често погрешно прилагане на синтетични химикали, както и благодарение на усилията на противниците на използването на пестициди, доведе до значителни промени в настройката на хората спрямо тяхното използване в селското стопанство. Към настоящия момент има значителна регулация в приложението на пестицидите, продукт на химическата промишленост. В допълнение, разпространението на заболявания по растенията в естествените екосистеми и местообитания би могло да попречи на успешното приложение на синтетични химикали, поради мащабите към които би трябвало да се приложат тези синтетични химикали. В последните години редица изследователи на третирането с пестициди фокусират своите усилия върху разработването на алтернативни продукти на синтетичните химикали за контрол на заболяванията по растенията. Сред тях са и тези, означавани като „биологичен контрол”.

Разработени са различни подходи за биологичен контрол, но тяхното ефективно прилагане се нуждае от детайлно разбиране на сложните взаимодействия между растенията, хората и околната среда. В основата и практиката на биологичния контрол е потискането на заболяванията по растенията или тяхната превенция. За правилното му прилагане е необходимо

добре да се познават дефинициите на понятията, механизмите, които стоят в основата на този контрол, както и да се изследва зависимостта между микробното разнообразие и биологичния контрол и не на последно място да се начертаят бъдещите направления, които биха могли да доведат до подобряване и развитие на по-разнообразни и ефективни форми на контрол срещу фитопатогените.

Борбата с болестите по растенията чрез използването на естествени ресурси е необходимост, осъзната от цялото човечество, защото те са екологични. Сред тях най-голямо внимание се отдава на микроорганизмите, и по-специално на актиномицетите, поради способността им да продуцират разнообразни по своята природа и механизъм на действие биологичноактивни вещества (Solanki et al., 2016). Тези вещества са екстензивно експлоатирани срещу различни видове патогени като гъби, бактерии, инсекти, плевели и др. вредители (Aggarwal et al., 2016; Reddy et al., 2016)

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване потенциала на почвени актиномицети за използването им в биологичния контрол на причинители на бактериози по растителни видове от сем. *Solanaceae*.

За постигането на целта са поставени следните задачи за изпълнение:

1. Първичен скрининг на почвени актиномицети за антимикробно действие спрямо фитопатогенни бактерии в *in vitro* условия
  - 1.1. Продуциране на антибактериални вещества
  - 1.2. Синтеза на хомосерин-лактон разграждащи ензими (QQE)
2. Таксономична характеристика на най-активните актиномицетни щамове
  - 2.1. С класически методи
  - 2.2. С молекулни методи
3. Избор на подходяща хранителна среда и продуценти на антибактериални вещества

4. Оптимизиране на състава на избраната хранителна среда
5. Начална характеристика на антибактериалните вещества, синтезирани от избраните актиномицетни щамове
6. Изследване на антибактериалната активност на избраните щамове в *in vivo* условия.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Материали

#### 1.1. Актиномицетни щамове

Като възможни източници на антибактериални вещества с активност срещу фитопатогенни бактерии са използвани 18 почвени актиномицетни щамове, изолирани от различни почвени местообитания, които са от колекцията на Катедра Обща и промишлена микробиология към Биологическия факултет на СУ. Девет от щамовете са изолирани от почва от о. Ливингстън, Антарктика (щамове с номера 14, 23, 27, 29, 30, 32, 36, 47 и 54N), а останалите - от почвени проби от планината Родопи в България.

#### 1.2. Тест-бактериални щамове

За изпитване на антибактериалното действие на актиномицетите са използвани следните тест-бактерии: *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 (NCIB 3610), *B. subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NBIMCC 159 (NCIB 196), *Candida albicans* NBIMCC 72 (CBS 562), *Saccharomyces cerevisiae* NBIMCC 537 (CBS 1171), *Aspergillus niger* NBIMCC 3253 (LIV131) и следните фитопатогенни бактерии, предоставени от колекцията на проф. дсн Невена Богацевска (ИЗР-Костинброд): *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (изолат от България), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Ro (изолат от домати от Петрич), *Xanthomonas vesicatoria* T (доматен патотип, раса T1), *X. vsicatoria* (пиперено-доматен патотип), *Xanthomonas euvesicatoria* (пиперен патотип), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (изолат от фасул, България), *X. axonopodis* pv. *glycines* (изолат от соя, България). Допълнително като тест-бактерии при част от

експериментите *in vivo* са използвани следните щамове – *X. vesicatoria* 8b и 44M и *X. euvesicatoria* 41b и 37M (Kizheva et al., 2013; Ванчева, 2015) и *Xanthomonas gardneri* 66 (Kizheva et al., 2013; Кижева, 2014).

За анализиране на способността към синтеза на хомосерин лактони са използвани и следните фитопатогенни бактерии: *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* 32 (изолат от гладиола), *B. gladioli* pv. *alliicola* 35 (изолат от лилиум), *B. gladioli* pv. *alliicola* 53 (изолат от лук) (Stoyanova et al., 2011).

## Методи

- 1.Култивиране на микроорганизми – повърхностно и дълбочинно
- 2.Получаване на филтрати от културална среда и екстракти от мицел
- 3.Определяне на антибактериална активност – дифузионен метод
- 4.Таксономично характеризирание на актиномицетни култури
  - 4.1. Класически подход – по 48 фенотипни признака
    - 4.1.1. Морфология на споровата верига и споровата повърхност
    - 4.1.2. Пигментация на въздушен и субстратен мицел и формиране на разтворим в средата пигмент
    - 4.1.3. Продукция на меланин
    - 4.1.4.Усвояване на 14 въглеродни източници
    - 4.1.5. Усвояване на 4 азотни източници
    - 4.1.6. Способност към разграждане на: еластин, арбутин, ксантин, пектин, лецитин
    - 4.1.7. Редуциране на нитрати
    - 4.1.8.Продукция на сероводород
    - 4.1.9. Инхибиране на растежа от: натриев азид, натриев хлорид и фенол
    - 4.1.10. Растеж при 45°C
    - 4.1.11.Устойчивост към антибиотици: неомицин, рифампицин, олеандомицин, пеницилин
    - 4.1.12. Антибиоза срещу: *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *S. cerevisiae*, *Asperigillus niger*
  - 4.2. Молекулен – чрез секвениране на гена за 16S рРНК
    - 4.2.1. Изолиране на ДНК
    - 4.2.2. PCR амплификация на 16S рДНК с универсални праймери

- 4.2.3. Секвениране на PCR –продукти на 16S рДНК
5. Анализ на способността на тест-фитопатогенни бактерии за синтеза на хомосерин-лактони – чрез екстракция и TLC
6. PCR амплификация на *aiiA* и *aiiD* гените при актиномицети чрез специфични праймери
7. Начално характеризиране на антибактериалния комплекс при щам *Streptomyces* sp. 47
  - 7.1. Екстракция на активните компоненти от културалната среда с различни разтворители
  - 7.2. Разделяне на компонентите чрез катионообменна колонна хроматография
  - 7.3. Анализ на получените фракции чрез TLC
  - 7.4. UV-VIS спектрална характеристика на фракциите
  - 7.5. Инфрачервена спектроскопия на най-активната фракция
8. Начално характеризиране на антибактериалния комплекс при щам *Streptomyces* sp. 54N
  - 8.1. Екстракция на активните компоненти от културалната среда с различни разтворители
  - 8.2. Анализ на екстракти чрез TLC и биоавтография
9. Определяне на антимикробна активност на синтезираните антибактериални комплекси в условия *in vivo* върху инокулирани с фитопатогенни бактерии семена от домати и пипер

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Първичен скрининг на почвени актиномицети за активност срещу фитопатогенни бактерии

Актиномицетите са сред прокариотите с най-големи биосинтетични възможности по отношение на биологично-активни вещества, към които се отнасят и антибактериални вещества с различна природа. Ето защо скринингът за антагонисти на фитопатогенни бактерии е насочен към тази група. Изследвани са 18 почвени актиномицетни щамове от колекцията на

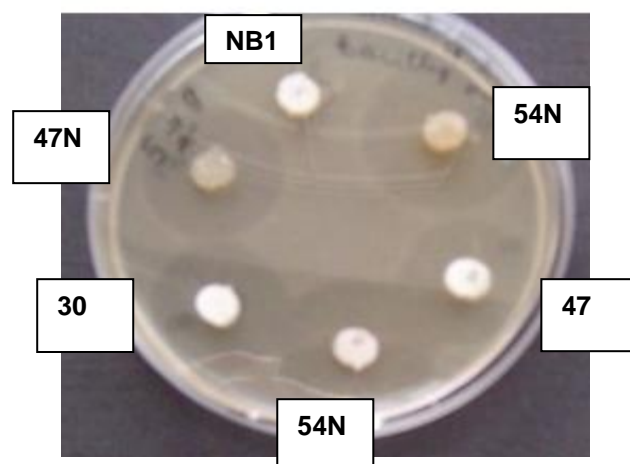
лабораторията по Биология на актиномицети и фитопатогенни бактерии, част от които са изолирани от Антарктида.

Началният скрининг за антибактериална активност е проведен срещу универсален тест-микроорганизъм *B. subtilis* ATCC 6633 по метода на агаровите блокчета и ямки в агар, като в последния случай са използвани както филтрати от културалната среда, в която са култивирани щамове, така и екстракти от мицела. От изследваните 18 щамове – 11 показаха положителен резултат, след което тяхната активност е изпитана срещу набор от най-често срещани бактерии, патогени по растителни видове от сем. Solanaceae както Грам-отрицателни, така и Грам-положителни. Не се наблюдават съществени различия в диаметъра на инхибиторните зони, формирани от филтратите и екстрактите от мицела, като при щамове 47 и 54N активността на филтратите е дори по-висока. Това показва, че антибактериалните вещества се акумулират както в мицела, така и извън клетките. По-нататъшната работа е съсредоточена главно върху използването на филтрати от културалната среда, което улеснява работата по прилагането на веществата в условия *in vivo*.

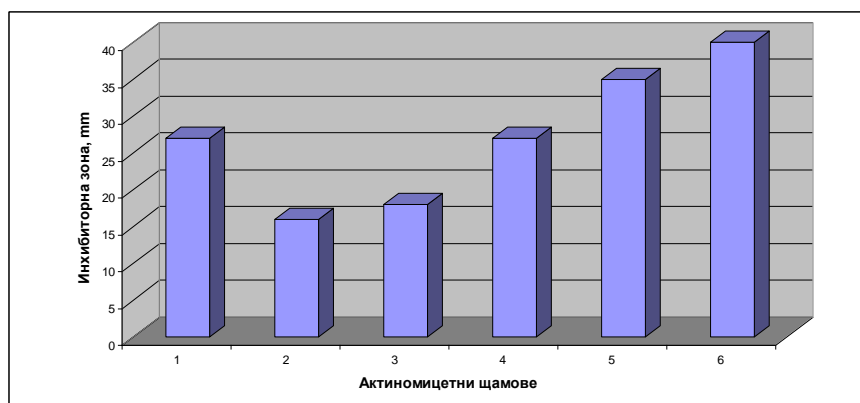
Скринингът показва, че около 61% от изследваните щамове проявяват антибактериална активност. Активните щамове се различават по силата на своето антибактериално действие, но при всички, синтезираните субстанции биха могли да бъдат отнесени към такива с широк спектър на действие, тъй като имат активност както срещу Грам-положителни, така и срещу Грам-отрицателни бактерии. Приблизително 82% от активните щамове са изолати от Антарктически почви. Получените от нас резултати потвърждават съществуващите данни в литературата за антимикробна активност на много актиномицетни щамове, изолирани от Антарктика.

В Табл. 1, Фиг. 1, Фиг. 2 и Фиг. 3 е представена информация за антибактериалната активност на избрани щамове.





Фиг. 1. Антибактериална активност на избрани актиномицетни щамове срещу *B. subtilis* ATCC 6633, определена по метода на агаровите блокчета



Фиг. 2. Антибактериална активност на най-активните щамове срещу *B. subtilis* ATCC 6633

1 – щам 14; 2- щам 23; 3- щам 29; 4- щам 30; 5 – щам 47; 6 – щам 54N

Christova and Naidenova (1996), Nedialkova and Najdenova (2004-2005), Димитрова и др. (2006), Енчева-Малинова (2016), също установяват, че значителна част от изолираните и изследвани от тях антарктически актиномицетни щамове проявяват антибактериална активност срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, вкл. и фитопатогенни. Gousterova et al. (2014) изолират термофилни актиномицети от Антарктика, като установяват, макар и за по-нисък процент от щамовете, способност към синтеза на антимикробни агенти. Това показва, че почвите от това местообитание биха могли да се използват като източник на продуценти на антимикробни вещества. За редица актиномицети с друг произход също е установена способност към

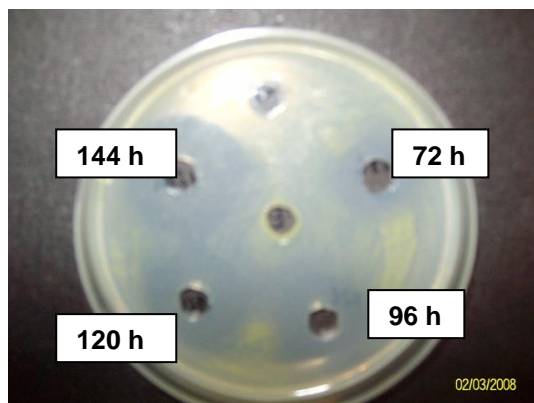
синтеза на антибактериални вещества с широк спектър на действие (Bull and Stach, 2007; Singh et al., 2012; Sharma, 2014), което потвърждава техния потенциал като агенти за биологичен контрол на фитопатогени. В по-голямата си част актиномицетите, анализирани от по-горе споменатите автори, са представители на род *Streptomyces* (Singh et al., 2012; Harikrishnan and Shanmugaiah, 2013; Sadeghy and Hatami, 2014; Тодорова, 2015).

От проведените от нас анализи се вижда, че Грам-положителните бактерии - *B. subtilis* 6633 и *C. michiganensis* pv. *michiganensis* реагират най-чувствително на действието на синтезираните от изследваните щамове вещества. Забележимо най-висока активност проявяват три от щамовете - 54N, 30 и 47, формирайки инхибиторни зони със среден размер около 30, 26 и 22 mm съответно. Известно е, че Грам-отрицателните бактерии притежават по-висока устойчивост към действието на антибактериални вещества, а по-голямата част от най-значимите фитопатогенни бактерии принадлежат към тази група. Ето защо откриването на антагонисти, едновременно на Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, е важно и заслужава интерес с оглед на растителната защита. За по-нататъшни изследвания бяха избрани посочените по-горе три актиномицетни щамове, показали най-висока активност.

Табл. 1 Антибактериална активност на филтрати от културалната среда / екстракти от мицела на скринираните актиномицети

Актиномицетен щам	Тест-микроорганизъм, инхибиторна зона, mm							
	1	2	3	4	5	6	7	8
NB3	19/18	9/10	9/9	10/10	9/9	10/11	8/8	14/14
NB7	21/23	10/10	10/11	8/8	9/9	10/11	0/0	13/12
14	27/26	16/17	8/9	15/14	13/12	20/21	24/23	32/30
23	16/17	13/14	8/9	12/11	11/11	13/12	16/16	22/21
27	19/20	14/13	18/18	18/17	17/16	19/18	17/16	23/21
29	18/18	16/15	18/17	17/16	17/17	18/18	18/17	22/20
30	27/28	24/23	25/25	25/24	24/25	28/29	21/21	32/31
32	22/22	16/16	16/17	19/18	19/18	15/14	19/18	22/20
36	24/23	18/19	19/18	18/18	20/21	19/18	20/21	26/25
47	35/32	16/14	10/10	23/21	17/15	20/18	26/24	34/32
54N	40/38	25/22	26/23	28/25	26/24	35/33	25/23	39/36

1 – *B. subtilis* 6633; 2 – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; 3 – *X. axonopodis* pv. *glycines*; 4 – *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип); 5 – *X. vesicatoria* (доматен патотип); 6 – *X. euvesicatoria* (пиперен патотип); 7 – *P. syringae* pv. *tomato* Ro; 8 – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*



Фиг. 3. Антибактериална активност на щам 54 N срещу *X. euvesicatoria*

## 2. Скрининг на актиномицетни щамове за синтеза на хомосерин лактон-разграждащи ензими

В литературния обзор бе посочено, че съвременните стратегии в биологичната борба с вредителите по растенията включват търсене на микроорганизми, чийто механизъм на действие не е свързан с директното убиване или инхибиране на растежа на фитопатогените, а със синтезирането на ензими, които да разграждат сигнални молекули, които се синтезират в хода на функциониращи в тях регулационни механизми, които определят тяхната вирулентност (каквото например е QS). За много фитопатогенни бактерии е доказано функционирането в тях на QS механизъм, който може да бъде мишена на биологичния контрол. Това е регулационен процес, чрез който редица бактерии могат да модулират генната експресия като функция от тяхната популационна плътност (Fuqua et al., 1994). В основата на този процес са нискомолекулни сигнални молекули, известни като хомосерин лактони (ХСЛ) или автоиндуктори, които се освобождават от много Грам-отрицателни бактерии, и които регулират различни процеси, зависещи от клетъчната плътност на популациите. Когато популациите са с ниска плътност, ХСЛ-сигналните молекули се отделят и акумулират в ниска концентрация в средата (Dong et al., 2001). Когато обаче популациите са с висока плътност, концентрацията на АХЛ се повишава и това индуцира продукцията на фактори на вирулентността, антибиотици, биофилми и инфектиране на растенията или другите еукариотни организми от патогените (Dong et al., 2001). Изучаването на

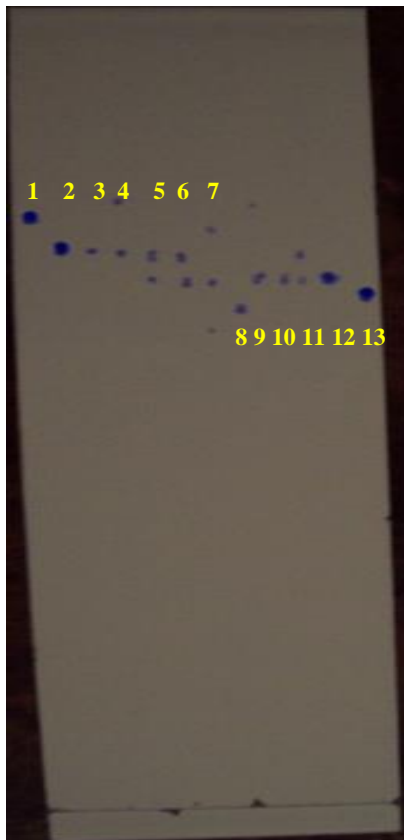
този механизъм дава възможност той да бъде използван при търсенето на нови подходи за биологичен контрол. За тази цел анализирахме седем тест-фитопатогенни бактерии за функциониране в тях на QS, чрез установяване на възможността за синтезиране на такива сигнални молекули. Щамовете са култивирани в течна хранителна среда, след което от културалната среда са получени екстракти с дихлорметан по процедура, описана в раздела Материали и методи. Екстрактите са анализирани чрез тънкослойна хроматография, а резултатите са отразени на Фиг. 4. Анализът на хроматограмата показва, че всички изследвани фитопатогенни бактерии продуцират един или друг тип ХСЛ. Очевидно е наличието на хетерогенност по отношение на типовете ХСЛ. N- хексаноил-L-хомосерин лактон продуцират щамове *B. gladioli* pv. *alliicola* 32, *B. gladioli* pv. *alliicola* 35, *B. gladioli* pv. *alliicola* 53, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* и *X. euvesicatoria* (пиперен патотип). Шест щамове - *B. gladioli* pv. *alliicola* 53, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. vesicatoria* (доматен патотип), *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип), *X. euvesicatoria* (пиперен патотип) синтезират N-(3-оксо)-октаноил-L-хомосерин лактон. Три от изследваните щамове (*B. gladioli* pv. *alliicola* 53, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* и *X. euvesicatoria*) имат сходен профил на синтезираните хомосерин лактони, като прави впечатление че и трите синтезират както N- хексаноил-L-хомосерин лактон, така и N-(3-оксо)-октаноил-L-хомосерин лактон. Щамове *B. gladioli* pv. *alliicola* 35, *X. axonopodis* pv. *glycines* и *X. vesicatoria* (доматен патотип) синтезират хомосерин лактони, които най вероятно са или 3-оксо заместени хомосерин лактони или са смес от 3-оксо-хомосерин лактон и незаместен хомосерин лактон. Интересен е профилът на *P. syringae* pv. *tomato* Ro, който е много различен от останалите. Той не синтезира нито N-хексаноил-L-хомосерин лактон (C6-ХСЛ) нито N-(3-оксо)-октаноил-L-хомосерин лактон (C8-(3оксо)ХСЛ). Твърде вероятна е продукцията на ХСЛ с повече от 8 въглеродни атома или някакъв 3-оксо заместен ХСЛ. Не може да се изключи и възможността за наличие на смес от заместени и незаместени ХСЛ. За потвърждаване на това предположение е необходимо сравняването с повече ХСЛ или маспектроскопски анализ и сравняване с базата данни. В резултат на този анализ би могло да се предположи, че изследваните видове фитопатогенни бактерии могат да бъдат обект на биологична борба чрез

щамове, чието действие е насочено срещу разрушаването на QS в тях, напр. чрез разграждане на синтезираните от тях сигнални молекули (ХСЛ).

Хомосерин лактон-разграждащите ензими – хомосеринлактонази и хомосеринацилази са ензимите, които разграждат ХСЛ на фитопатогенните бактерии и по този начин препятстват сигнализацията между клетките в една популация за инвазирането на гостоприемника. Четири от нашите актиномицетни щамове (29, 30, 47, 54N) бяха изследвани чрез PCR със специфични праймери за наличие в техния геном на гени, отговорни за синтезата на гореспоменатите ензими. При нито един от четирите щамове не бе доказано наличието на такива гени, което показва, че антибактериалното действие на щамовете почива само на синтезирането от тях на антибактериални вещества с друга природа и друг механизъм на действие.

В литературата съществуват данни за способността на актиномицети да синтезират ензими, разграждащи ХСЛ (*Quorum quenching enzymes* – QQE) (Chen et al., 2013). Така напр., при изследване на ризосферни и ендофитни актиномицети, проведено от Chankhamhaengdech et al. (2013), е показано, че те притежават много по-висока активност на ензими, разграждащи ХСЛ, отколкото почвените изолати. Това съобщение е първото, което докладва такава активност при актиномицети. Авторите доказват, че щам *Streptomyces* LPC029 притежава висока C<sub>10</sub>HSL-разграждаща активност, а ензимът има широка субстратна специфичност и е класифициран като ХСЛ- ацилаза. Синтезата на QQE е установено и при други представители на актинобактериите като *Rhodococcus* (Park et al., 2006), *Arthrobacter* (Park et al., 2003), *Streptomyces* (Park et al., 2005), които разграждат АХЛ чрез синтезираните от тях лактонази. Yoon et al. (2006) и Kang et al. (2004) изолират АХЛ-разграждащи ензими от *Nocardioides kongjuensis*, които могат да хидролизират АХЛ автоиндуктори от почвени проби. Ендофитната Грам-положителна бактерия *Microbacterium testaceum*, изолирана от картофени листа, показва АХЛ-деградираща активност (Morohoshi, 2011). Сред видовете, които синтезират QQE активност *Rhodococcus erythropolis* е забележителен заради това, че е единствената актинобактерия, която проявява три ензимни активности, насочени към АХЛ – оксидоредуктази, амидохидролази и лактонази (Park et al., 2006; Uroz et al., 2005; Uroz et al., 2008). Сред изследваните от нас актиномицети не се откриват

такива със способност да синтезират *QQE*, което насочи по-нататъшните изследвания към антибактериалните вещества, които те продуцират.



Фиг. 4. Тънкослойна хроматография на екстракти от културалната среда на тест-фитопатогенни бактерии

- 1) N- бутаноил-L-хомосеринлактон (маркер)
- 2) N-хексаноил-L-хомосеринлактон (маркер)
- 3) *B. gladioli* pv. *alliicola* 32 (изолат от гладиола)
- 4) *B. gladioli* pv. *alliicola* 35 (изолат от лилиум)
- 5) *B. gladioli* pv. *alliicola* 53 (изолат от лук)
- 6) *X. axonopodis* pv. *phaseoli*
- 7) *X. axonopodis* pv. *glycines*
- 8) *P. syringae* pv. *tomato* Ro
- 9) *X. vesicatoria* (доматен патотип)
- 10) *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип)
- 11) *X. euvesicatoria* (пиперен патотип)
- 12) N-(3-оксо)-октаноил-L-хомосеринлактон (маркер)
- 13) N-октаноил- L-хомосеринлактон (маркер)

### 3. Таксономична характеристика на актиномицетните щамове с най-висока активност

Таксономичното характеризиране на актиномицети, продуциращи различни метаболити с потенциално приложение е важна стъпка във всяка една скринингова програма. Бързата идентификация на изолати, поне до ниво род, може да даде ценни данни, които да се използват за по-нататъшните етапи на изследванията. Идентификацията до вид често дава информация за това дали синтезираните метаболити са нови или вече познати (Labeda, 1987). Освен това, сведенията за таксономичната принадлежност на даден микроорганизъм са от важно значение, предвид безопасността при неговото приложение. За по-нататъшна работа, както бе посочено, бяха избрани три от анализирани актиномицетни щамове – 30, 47 и 54N, показали най-висока активност и спектър на антибактериално действие.

### 3.1. Класически подход

Класическият подход за таксономична характеристика на избраните актиномицетни щамове, включва определянето на 48 фенотипни характеристики, залегнали в идентификационната програма, разработена от Langham et al. (1989).

Резултатите от този анализ са показани в Табл. 2, от която се вижда, че фенотипно, щамовете се различават помежду си в голяма част от признаците. Те са сходни по морфологията на споровите вериги, като всички формират прави или вълнисти спороносци; Въздушният мицел и при трите щамове е в сивата гама; Разграждат ксантин, усвояват манитол, декстран, ксилоза, целобиоза и фруктоза; Не проявяват липолитична активност и не продуцират H<sub>2</sub>S; Не разграждат еластин; Не се развиват при температура 45°C и 7% NaCl; Не усвояват L-цистеин и инулин; Нямаат противогъбна активност. Само щам 54N продуцира дифундиращ в средата пигмент с жълтеникав цвят. По останалите свойства те се различават помежду си. Сравняването на данните за антибактериалната активност, получени в началния скрининг с тези, получени с тест-микроорганизмите, препоръчани в използваната идентификационна схема се вижда, че щамове 30 и 47 не показват активност срещу нито един от тест-микроорганизмите, докато щам 54N потвърждава антибактериалната си активност. Щам 54N се характеризира с по-малки възможности към усвояване на изследваните въглехидрати, а щамове 30 и 47 не усвояват включените в теста аминокиселини. Единствено щам 47 притежава устойчивост към изследваните антибиотици. Два от щамовете синтезират меланинов пигмент (Фиг. 9)

Табл. 2 Физиолого-биохимична характеристика на актиномицетните щамове

№	Характеристика	Реакция		
		Щам 30	Щам 47	Щам 54N
1	Права или вълниста спорова верига	+	+	+
2	Спирална спорова верига	-	-	-
3	Червена спорова маса (въздушен мицел)	-	-	-
4	Сива спорова маса (въздушен мицел)	+	+	+
5	Пигмент на субстратния мицел червен/оранжев	-	-	-
6	Продукция на дифундиращ пигмент	-	-	+
7	Жълт/кафяв дифундиращ пигмент	-	-	+
8	Продукция на меланин на дрождево/железен агар	-	+	-

№	Характеристика	Реакция		
		Щам 30	Щам 47	Щам 54N
9	Продукция на меланин на тирозинов агар	+	+	-
10	Антибиоза срещу <i>Bacillus subtilis</i> NBIMCC 2353	-	-	+
11	Антибиоза срещу <i>Micrococcus luteus</i> NBIMCC 159	-	-	+
12	Антибиоза срещу <i>Candida albicans</i> NBIMCC 72	-	-	-
13	Антибиоза срещу <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBIMCC 537	-	-	-
14	Антибиоза срещу <i>Aspergillus niger</i> NBIMCC 3253	-	-	-
15	Лецитиназна активност	+	-	+
16	Липолиза	-	-	-
17	Хидролиза на пектин	-	-	+
18	Редукция на нитрати	+	-	+
19	Продукция на H <sub>2</sub> S	-	-	-
20	Разграждане на еластин	-	-	-
21	Разграждане на ксантин	+	+	+
22	Разграждане на арбутин	+	-	-
23	Устойчивост към неомицин (50 µg/ml)	-	+	-
24	Устойчивост към рифампицин (50 µg/ml)	-	+	-
25	Устойчивост към олеандомицин (100 µg/ml)	-	+	-
26	Устойчивост към пеницилин (10 U)	-	+	-
27	Растеж при 45°C	-	-	-
28	Растеж при 7% NaCl	-	-	-
29	Растеж при 0.01% натриев азид (NaN <sub>3</sub> )	-	-	+
30	Растеж при 0.1% фенол	-	-	+
31	Усвояване на L - цистеин	-	-	-
32	Усвояване на L-валин	-	-	+
33	Усвояване на L - фенилаланин	-	-	+
34	Усвояване на L - хистидин	-	-	+
35	Усвояване на захароза	+	+	-
36	Усвояване на <i>meso</i> -инозитол	+	+	-
37	Усвояване на манитол	+	+	+
38	Усвояване на L - рамноза	+	+	-
39	Усвояване на рафиноза	+	+	-
40	Усвояване на D-мелизитоза	-	+	-
41	Усвояване на адонитол	-	+	-
42	Усвояване на D-мелибиоза	+	+	-
43	Усвояване на декстран	+	+	+
44	Усвояване на ксилитол	-	+	-
45	Усвояване на ксилоза	+	+	+
46	Усвояване на целобиоза	+	+	+
47	Усвояване на фруктоза	+	+	+
48	Усвояване на инулин	-	-	-

Макро- и микроморфологични признаци на щамовете са показани на Фиг. 5, 6, 7 и 8.

Установените фенотипни признаци за всеки щам са сравнени с базата данни от идентификационна програма на Langham et al. (1989), използвана от нас.



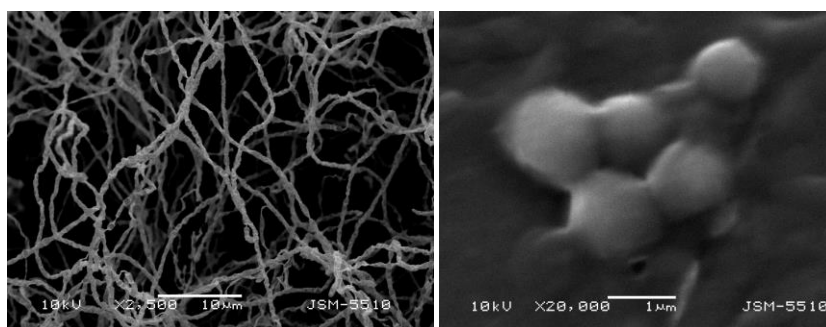


Щам 30

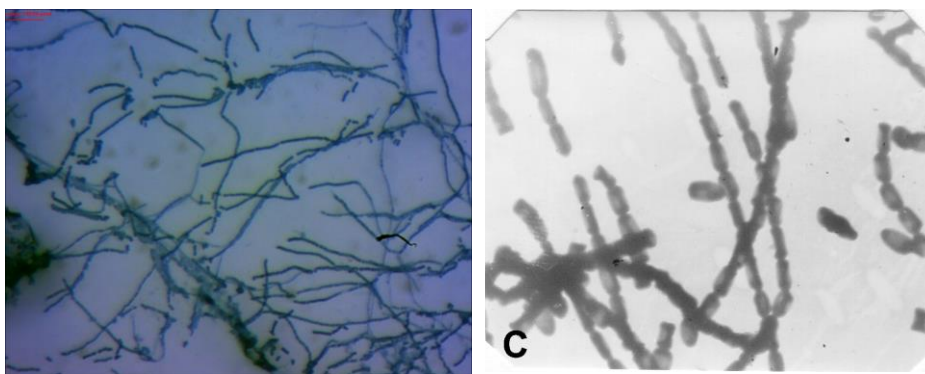
Щам 47

Щам 54N

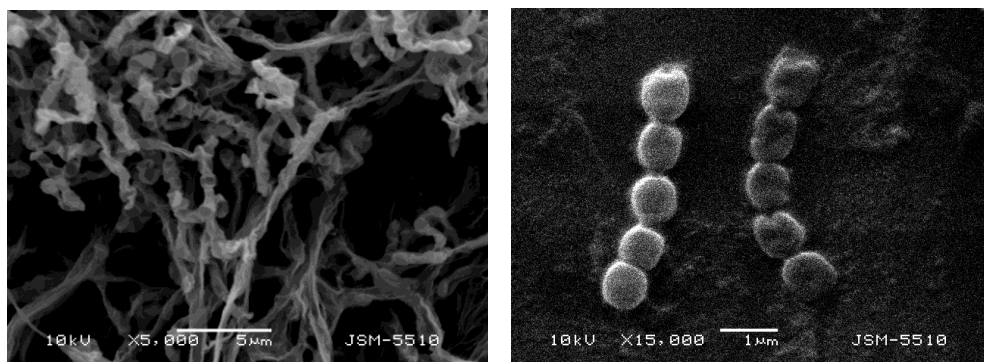
Фиг. 5. Морфология на колониите на актиномицетите (на среда AV- агар за щамове 30 и 47 и на среда Гаузе 1 за щам 54N)



Фиг. 6. Морфология на мицела и споровата повърхност на щам 30



Фиг. 7. Морфология на мицела и споровата повърхност на щам 47



Фиг. 8. Морфология на мицела и спорвата повърхност на щам 54N

Щам 30 се идентифицира с достатъчен процент на сходство до род *Streptomyces* (Фиг. 10), като най-близките до него видове са *Streptomyces cyaneus* и *S. diastaticus*. Въпреки близостта си с тях, той се различава по доста характеристики и на този етап от изследванията не може да бъде отнесен към нито един от посочените видове.

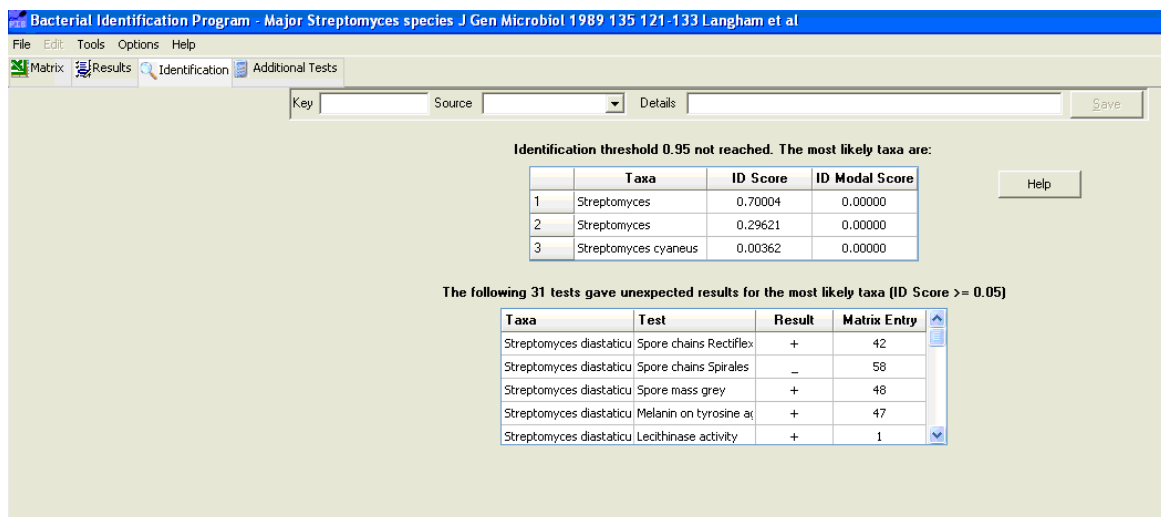


Фиг. 9. Синтеза на меланинов пигмент от актиномицетни щамове 30 и 47

В литературата съществуват данни, че *S. diastaticus* синтезира както антибиотици, така и ензими с практическо приложение (Shiba and Mukunoki,

1975; Tajana et al., 1992). Yang et al. (2010) докладват за синтезата от този вид на антибиотици с антагонистично действие срещу гъби *A. niger*, *A. alternata*, *B. cinerea* и *P. capsici*, докато изследваният от нас щам не показва антигъбна активност. *S. cyaneus* също синтезира антибиотици (Uyeda et al., 1997; Atta et al., 2011), като е установено че те имат различна химична природа и проявяват съответно антихерпесна и антибактериална активност. Няма данни в литературата, че видът има антагонистично действие срещу фитопатогенни бактерии и гъби. Актиномицетен щам 30 е анализиран от Енчева-Малинова (2016) за гени за антибиотикови синтетази и е показано, че той притежава такива за синтезата само на поликетиди от тип II, към които се отнасят много антибиотици.

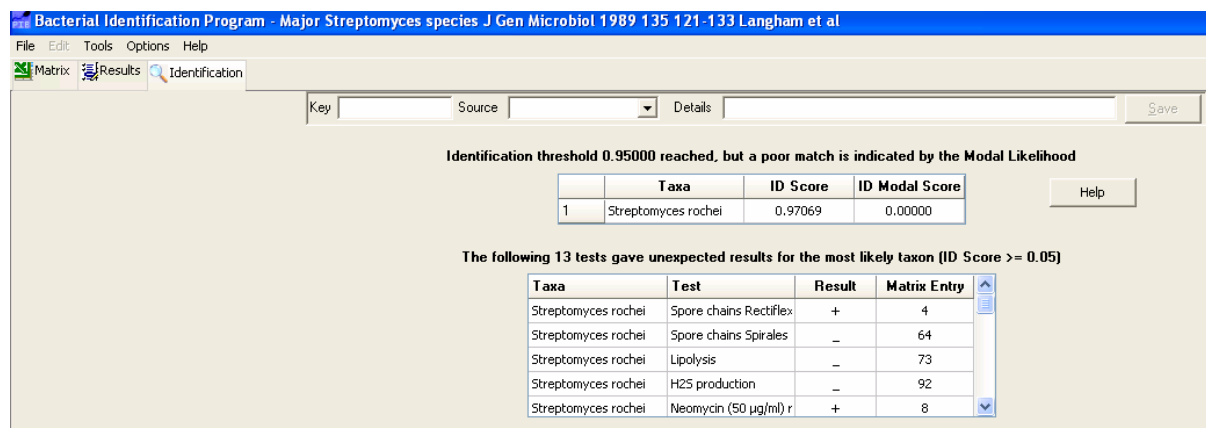
Щам 47 се идентифицира към вида *Streptomyces rochei* (Фиг. 11) с висок процент на сходство (97%).



Фиг. 10. Резултати от идентификацията на щам 30 по фенотипни признаци

За този вид е известно, че синтезира както антибактериални субстанции, така и редица ензими. Синтезираните от него антибиотични субстанции са активни както срещу Грам-положителни, така и срещу Грам-отрицателни бактерии. Щамове, принадлежащи към този вид синтезират и антигъбни субстанции (Kavitha and Vijayalakshmi, 2007; Kanini et al., 2013). Показана е също устойчивостта на *S. rochei* към редица антибиотици, подобно на установеното от нас за щам 47. Подобно на щам 30 за актиномицетен щам 47 също е

установено, че притежава гени за продуциране на поликетидни антибиотици от тип II (Енчева-Малинова, 2016).



Фиг. 11. Резултати от идентификацията на щам 47

Kanini et al. (2013) изследват антигъбната активност на актиномицетни изолати, като определят един от тях чрез секвениране на 16 S р ДНК като *S. rochei*. Те изучават влиянието на различни фактори на средата върху продукцията на антибактериални вещества и установяват, че щамът синтезира антимикробен комплекс, състоящ се от повече от едно вещество с добре изразен антигъбен ефект *in vivo* срещу *F. oxysporum*. Освен това щамът притежава промотиращо действие по отношение на домати семена в отсъствие на патогена. Авторите допускат, че щамът може да бъде използван като АБК срещу *F. oxysporum*. Изследваният от нас *Streptomyces* sp. 47 не показва антигъбно действие. На този етап, въпреки високият процент на сходство между щам 47 и вида *S. rochei*, не бихме могли да приемем, че те са идентични.

Щам 54N се идентифицира до род *Streptomyces* с 99% сходство, като показва най-голяма близост до вида *Streptomyces exfoliatus*, но не е идентичен с него (Фиг. 12). Той се различава от последния по 13 признака (Kämpfer, 2012). Данните в литературата за този вид са оскъдни, като няма сведения за синтезиране от него на антибиотици. *S. exfoliatus* обаче синтезира други биологично-активни вещества като инхибитори на бета-лактамази (Kang, 2000), целулолитични и ксиланолитични ензими (Kurniawati et al., 2016), които намират практическо приложение.

Bacterial Identification Program - Major Streptomyces species J Gen Microbiol 1989 135 121-133 Langham et al

File Edit Tools Options Help

Matrix Results Identification

Key  Source  Details  Save

Identification threshold 0.95000 reached, but a poor match is indicated by the Modal Likelihood

	Taxa	ID Score	ID Modal Score
1	Streptomyces	0.99974	0.00000

Help

The following 13 tests gave unexpected results for the most likely taxon (ID Score >= 0.05)

Taxa	Test	Result	Matrix Entry
Streptomyces exfoliatus	NaN3 (0.01% w/v) gr	+	23
Streptomyces exfoliatus	Mannitol utilization	+	1
Streptomyces exfoliatus	L-Rhamnose utilization	-	61
Streptomyces exfoliatus	Dextran utilization	+	6

Фиг. 12. Резултати от идентификацията на щам 54N

Традиционните методи за идентификация на филаментозните актиномицети дават ценна информация за морфологичните, културалните и физиолого-биохимичните особености на щамовете, която улеснява по-нататъшната работа с тях. Те са обаче трудоемки, изискват доста време и с прилагането единствено на тях, често резултатът който се постига е незадоволителен (Harvey et al., 2001; Cook and Meyers, 2003). Това се потвърждава и от получените от нас резултати. Причините за това може да са различни – недостатъчно пълна база данни в използваната идентификационна програма, недостатъчен брой на изследваните признаци, както и възможност да се касае за нови видове, предвид на това, че почвите на Антарктида са слабо проучено местообитание по отношение на микрофлората и по-специално на актиномицетите.

### 3.2. Молекулни методи

Идентификацията на актиномицетите на базата на фенотипни признаци вече се измества от тази, основаваща се на данни, получени с методите на молекулярната таксономия чрез бързото секвениране на генома. Един от най-често използваните методи за идентификация с методите на молекулярната биология е секвенирането на гените за 16S рПНК (Barka et al., 2015).

Опит за идентификация на трите стрептомицетни щамове - 30, 47 и 54N, е направен и чрез секвениране на гена за 16S рРНК, получен чрез амплификация с двойката универсални праймери - 9f/1542 г .

Сравняването на последователността на нуклеотидите от секвенирания участък от 16S рДНК на щамовете с наличните в базата данни на електронния сайт за сравняване на секвенции [http://cme.msu.edu/ Ribosomal Data Base Project: Release 10](http://cme.msu.edu/Ribosomal%20Data%20Base%20Project), потвърди тяхната принадлежност към род *Streptomyces*.

Резултатите за всеки щам са показани съответно в Табл. 3, 4 и 5.

Табл. 3 Резултати от секвенирането на гена за 16S рРНК на *Streptomyces* sp. 30

№ за достъп	Най-близко родтсвени представители по гена за 16S рРНК	Максимален % на идентификация
<a href="#">AJ308573.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. Nu40 partial 16S rRNA gene, strain Nu40	99%
<a href="#">AJ308572.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. Soll14 partial 16S rRNA gene, strain Soll14	99%
<a href="#">EU423876.1</a>	Uncultured actinomycete clone Z851024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">EU585776.1</a>	Uncultured actinomycete clone Z851031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">EU423875.1</a>	Uncultured actinomycete clone Z851013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">EF471902.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. GW25-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%

От получените резултати се вижда, че след секвенирането на гените за 16S рРНК на анализиранияте щамове те остават с неизяснена видова принадлежност, като показват различна близост до няколко щамове, които съществуват в базата данни (частично секвенирани), но също неидентифицирани до вид. Прави впечатление, че щамовете *Streptomyces* sp. 30 и sp. 47 са доста сходни помежду си и се доближават с най-висок процент на подобие (макар и различен при всеки един), към едни и същи щамове от базата данни. Въпреки това те не са идентични помежду си, което се вижда и от съществуващите фенотипни различия между тях. Голямо е секвенционното подобие на двата щамове с некултивируеми клонове. За разлика от тях, *Streptomyces* sp. 54N показва сходство, но не по-високо от 96% към няколко

частично секвенирани щамове, различни от тези, към които другите два показват подобие. Това потвърждава различната, макар и неясна, видова принадлежност на този щам, която е показана и на базата на фенотипните признаци.

Табл. 4 Резултати от секвенирането на гена за 16S рРНК на *Streptomyces* sp. 47

№ за достъп	Най-близко родствени представители по гена за 16S рРНК	Максимален % на идентификация
<a href="#">AJ308573.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. Nu40 partial 16S rRNA gene, strain Nu40	98%
<a href="#">AJ308572.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. Soll14 partial 16S rRNA gene, strain Soll14	98%
<a href="#">EU423876.1</a>	Uncultured actinomycete clone Z851024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EU585776.1</a>	Uncultured actinomycete clone Z851031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EU423875.1</a>	Uncultured actinomycete clone Z851013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EF471902.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. GW25-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%

Невъзможността щамовете да бъдат идентифицирани чрез секвенционен анализ на гените за 16S рРНК би могла да се дължи на недостатъчна информация в базата данни, а също така и на вероятността, използваните от нас щамове да принадлежат към неописани до момента видове стрептомицети, за доказването на което са необходими допълнителни изследвания.

При използването на секвенирането на гените за 16S рРНК за целите на идентификацията се препоръчва резултатите да бъдат интерпретирани заедно с тези от фенотипните тестове (Woo et al., 2009). В нашия случай това обаче не е възможно, тъй като близостта на нашите щамове е до такива, които са частично секвенирани и неописани по фенотипни признаци, както и некултивируеми.

Табл. 5 Резултати от секвенирането на гена за 16S рРНК на *Streptomyces* sp. 54N

№ за достъп	Най-близко родтсвени представители по гена за 16S рРНК	Максимален % на идентификация
<a href="#">EU864311.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. 2482 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%
<a href="#">EU797798.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. P127 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%
<a href="#">EU603368.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. MJM8790 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%
<a href="#">EU603347.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. MJM3859 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%
<a href="#">EU603346.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. MJM3635 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%

При невъзможност за видова идентификация чрез секвениране на гените за 16S рРНК се препоръчва провеждането на допълнителни биохимични тестове или секвениране на допълнителни генни локуси (Woo et al., 2009), което ще бъде обект на по-нататъшни изследвания.

Принадлежността на използваните от нас щамове към род *Streptomyces* е в потвърждение на немалкото данни в литературата, че продуцентите на антимикробни вещества сред актиномицетите са най-многобройни при представителите на този род. Досега са открити около 23 000 биологичноактивни вторични метаболити, синтезирани от микроорганизми и повече от 10 000 от тях се продуцират от актиномицети, което представлява 45% от всички открити досега вторични метаболити (Vimal, 2009). Сред актиномицетите, около 7600 съединения се продуцират от видове на род *Streptomyces* (Ramesh, 2009).

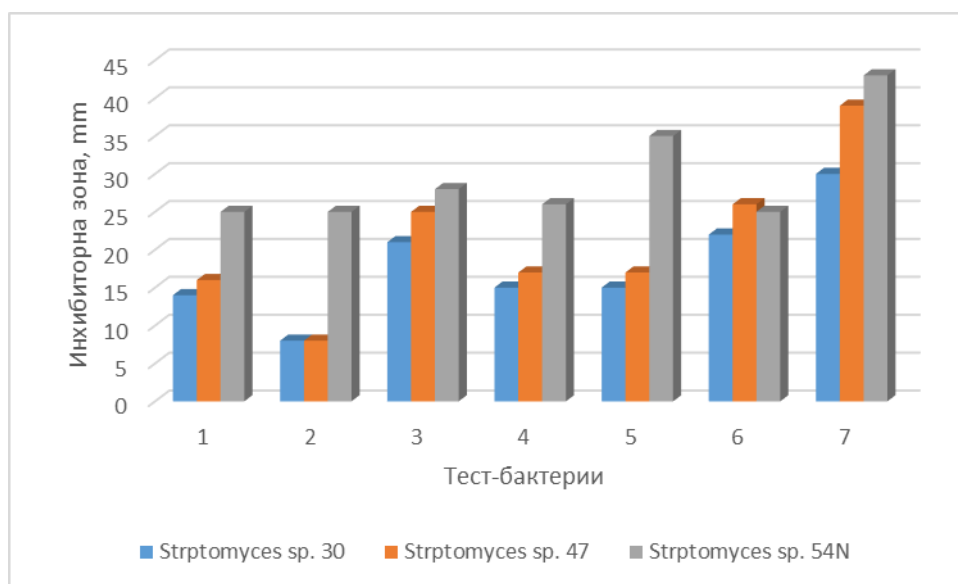
#### **4. Избор на продуцент и подходяща хранителна среда за синтезата на антибактериални вещества**

Продукцията на вторични метаболити от актиномицети се определя от компонентния състав на хранителните среди, както и от условията на култивиране. В много случаи съставът на хранителните среди се базира на използването на отпадъчни продукти от други индустриални процеси, като напр. продукти от процесите на преработка на захари, лигноцелулоза, царевича



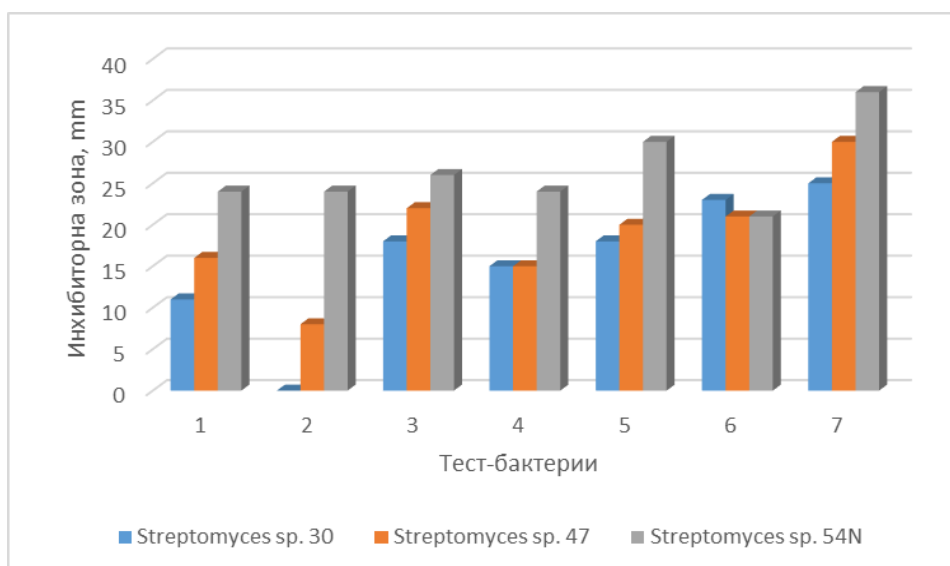
и др. В рамките на предварителни експерименти при периодично култивиране на тези щамове е изследван широк набор от хранителни среди с различен компонентен състав, взаймствани от литературни източници и е определяна антибактериалната активност на филтрата от културалните среди срещу фитопатогенни бактерии. Въз основа на тези експерименти е установено, че при култивирането на щамовете на три от средите (съставът е посочен в раздел «Материали и методи») те проявяват най-висока антибактериална активност. Тези среди са означени условно като среди 1, 9 и 14 и съдържат комплексни източници на въглерод и азот, които се усвояват бавно и не упражняват репресия върху процесите на синтезиране на вторични метаболити. Повечето среди за производство на антибиотици от различни групи имат подобен компонентен състав и са широко използвани в разнообразни изследвания, свързани най-често с продукцията на антибиотици (Hobbs et al., 1989; Panthee et al., 2011; Hong and Yan, 2012). Най-висока активност при посочените среди се постига при температура на култивиране 28°C, разбъркване на средата при 240 об./min и продължителност на култивирането 144 h, установено в наши предварителни експерименти., което потвърждава изследвания с други стрептомицети от различни автори. Резултатите за антибактериалната активност на щамовете в посочените по-горе среди при избраните условия на култивиране са показани на Фиг. 13, 14 и 15.

Анализът на данните показва, че култивирането на щамовете в среда 1 осигурява най-висока активност и при трите щамове, а най-активен е *Streptomyces* sp. 54N. От Фиг. 13, 14 и 15 се вижда, че на тази среда антибактериалният спектър на действие и при трите продуцента е най-широк. В качеството на въглероден източник в нея встъпва манитол и царевично брашно, а като азотен източник – соев шрот. Тази хранителна среда е с прост състав, удобна за подготовка и евтина от гледна точка на нейните ingredienti.



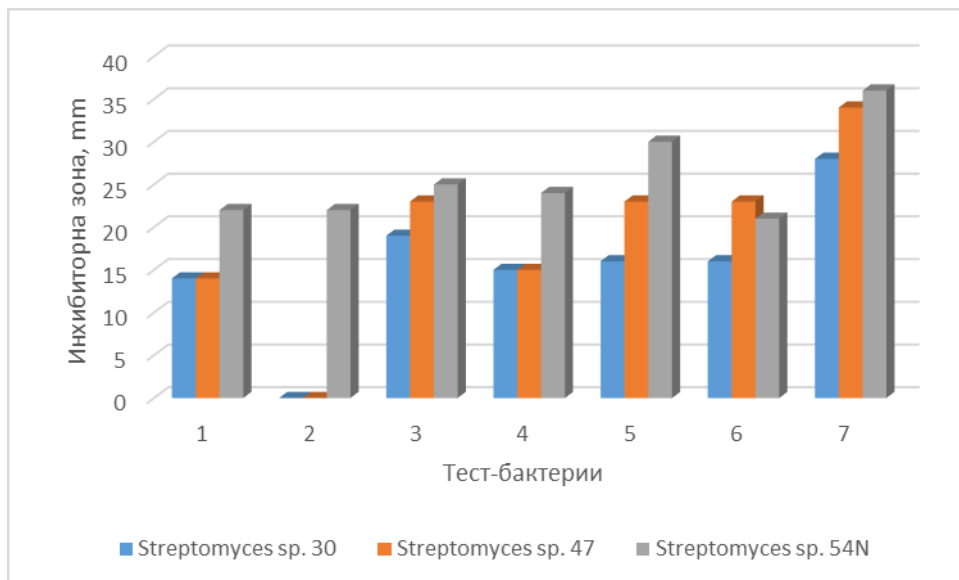
Фиг. 13. Антибактериална активност на актиномицетните щамове, култивирани в Среда 1

1 – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; 2 – *X. axonopodis* pv. *glycines*; 3 – *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип); 4 – *X. vesicatoria* (доматен патотип); 5 – *X. euvesicatoria* (пиперен патотип); 6 – *P. syringae* pv. *tomato* Ro; 7 – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*



Фиг. 14. Антибактериална активност на актиномицетните щамове, култивирани в Среда 9

1 – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; 2 – *X. axonopodis* pv. *glycines*; 3 – *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип); 4 – *X. vesicatoria* (доматен патотип); 5 – *X. euvesicatoria* (пиперен патотип); 6 – *P. syringae* pv. *tomato* Ro; 7 – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*



Фиг. 15. Антибактериална активност на актиномицетните щамове, култивирани в Среда 14

1 – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; 2 – *X. axonopodis* pv. *glycines*; 3 – *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип); 4 – *X. vesicatoria* (доматен патотип); 5 – *X. euvesicatoria* (пиперен патотип); 6 – *P. syringae* pv. *tomato* Ro; 7 – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Най-често използваната стратегия, прилагана в скрининговите програми, е изпитването на различни по състав хранителни среди, продължителност на култивиране и други култивационни условия, което увеличава шансовете за продукция на желаните вещества (Vilella et al., 2000; Lauren and Yit-Heng, 2011; Arasu et al., 2013).

За избор на най-добър продуцент сред изследваните 3 стрептомицетни щамове са проведени поредица от 5 независими ферментации при еднакви условия (среда 1, обороти на разклащане – 240 об./min, продължителност на ферментацията – 144 h, температура на култивиране – 28°C), които са изпълнени в продължение на 5 месеца при пет пасажа на продуцентите. Критериите, по които най-добрият продуцент е избран са висока и стабилна във времето активност и възможно най-широк спектър на действие срещу избраните тест-фитопатогенни бактерии. Активността е определяна по метода на “ямките в агар” чрез използването на филтрат от културалната среда. За всяка ферментация активността е определяна в 4 повторения. Осреднените

данни за активността от проведените 5 ферментации в 4 повторения са представени в Табл. 6.

Табл. 6 Антибактериална активност на актиномицетните щамове на Среда 1

Актиномицетен щам	Тест-микроорганизми*, инхибиторна зона, mm						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Streptomyces</i> sp.30	16	8	21	15	18	22	30
<i>Streptomyces</i> sp 47	19	8	25	17	23	26	39
<i>Streptomyces</i> sp. 54N	25	26	29	27	35	26	44

1 – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; 2 – *X. axonopodis* pv. *glycines*; 3 – *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип); 4 – *X. vesicatoria* (доматен патотип); 5 – *X. euvesicatoria* (пиперен патотип); 6 – *P. syringae* pv. *tomato* Ro; 7 – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Резултатите показват, че щамовете поддържат активността си почти постоянна през периода на изследването, като проявяват активност срещу всички тест-бактерии, но с най-висока активност се характеризират *Streptomyces* sp. 47 и *Streptomyces* sp. 54N. Най-чувствителен към антибактериалните вещества е *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. От Грам-отрицателните тест-фитопатогенни бактерии най-висока чувствителност имат *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria*.

По-нататъшните изследвания са проведени с двата щама, показали най-висока активност.

## 5. Оптимизиране на състава на избраната хранителна среда

Изменението на количеството и съотношението на компонентите на култивационната среда оказват голямо влияние на растежа на микроорганизмите. При подбора на хранителна среда с оглед на повишаване на добива на биомаса или натрупване на определени продукти от обмяната на веществата, широко приложение намират методите на математическо планиране на експеримента. Съставът на среда 1, при култивирането в която щамовете показват най-висока активност е подложен на оптимизиране, като е използвано математическо планиране на експеримента – пълен факторен експеримент (план  $3^2$ ). Оптимизацията е проведена по два фактора (източници на въглерод и азот, съответно) – царевично брашно ( $x_1$ ) и соев шрот ( $x_2$ ), чиито концентрации са варирани на три нива (-1, 0 и +1). Единицата на вариране е

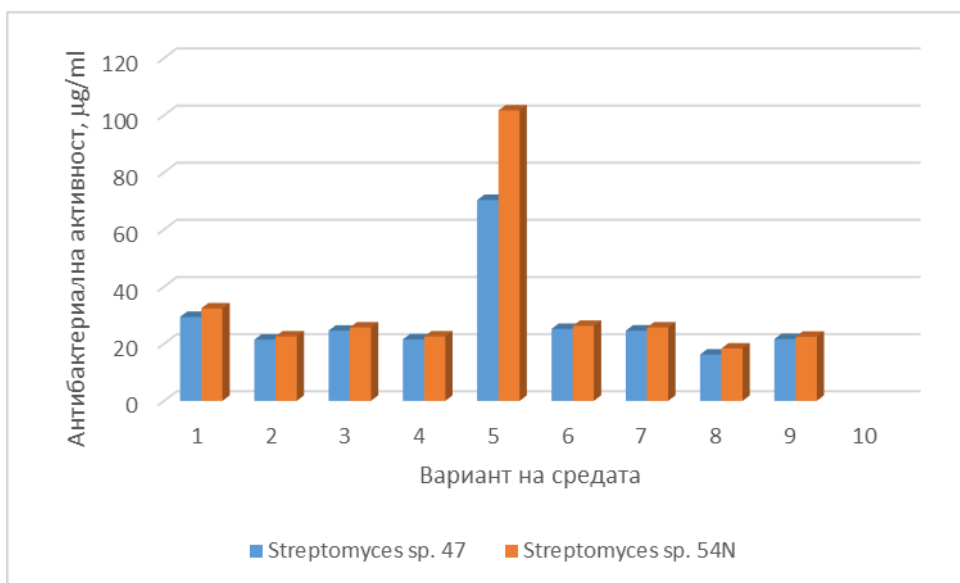
0.2. Отделните фактори, техните нива и вариантите на изследваната среда са показани в Табл. 7. Активността на антибактериалния комплекс е изразявана в  $\mu\text{g/ml}$ . Като стандарт е използван пандавир с концентрация  $1\mu\text{g/ml}$  (Тодоров и др., 1983). Резултатите за активността на щамовете в зависимост от концентрациите на изследваните компоненти са показани на Фиг. 16.

Получените данни показват, че и при двата щама най-висока антибактериална активност се постига при култивиране в среда с концентрации на царевичното брашно и соевия шрот от 1%, каквато тя е в основния състав на средата (вариант 5 на средата), взимстван от литературата (Фиг. 16). *Streptomyces* sp. 54N има значително по-висока активност от щам 47. Повишаването на концентрацията на соевия шрот значително понижава активността и при двата щама, по-силно изразено при *Streptomyces* sp. 47 (вариант 8 на средата). Концентрации на двата източника на минус ниво (0.8%, вариант 1 на средата) осигуряват по-добра активност и при двата щама, в сравнение с другите варианти на средата, при които антибактериалната активност се движи в приблизително еднакви граници.

В по-нататъшните експерименти е използвана среда 1 с концентрация на царевичното брашно и соевия шрот 1%.

Табл. 7 План на експеримента за оптимизиране на състава на Среда 1

Вариант	Нива на факторите		Концентрации на компонентите	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Царевично брашно %	Соев шрот %
1	-1	-1	0.8	0.8
2	0	-1	1.0	0.8
3	+1	-1	1.2	0.8
4	-1	0	0.8	1.0
5	0	0	1.0	1.0
6	+1	0	1.2	1.0
7	-1	+1	0.8	1.2
8	0	+1	1.0	1.2
9	+1	+1	1.2	1.2



Фиг. 16 Антибактериална активност на *Streptomyces* sp. 47 и *Streptomyces* sp. 54N при различни концентрации на царевично брашно и соев шрот в средата

## 6. Начална характеристика на антибактериалните вещества, синтезирани от избраните актиномицетни щамове

### 6.1. *Streptomyces* sp. 47

#### 6.1.1. Култивиране

За характеризиране на антибактериалните вещества, които се синтезират от *Streptomyces* sp. 47, щамът е култивиран двустепенно на клатачен апарат при 240 об/мин в оптимизирана хранителна среда 1 в продължение на 144 h при 28°C.

След края на ферментацията е изпитана термостабилността на антибактериалните вещества, синтезирани от щама, като филтратът от културалната среда (без клетки) е третиран термично при 100° за 30 min, след което е изпитана антибактериалната активност срещу тест *B. subtilis* ATCC 6633. Като контрола е използван филтрат, който не е третиран термично. Установено е, че 85% от началната активност се запазва, което показва, че термична коагулация на белтъците, намиращи се в културалната течност, при 85-90°C за 30 min би могла да се използва за улесняване на процедурата по начално изолиране и характеризиране на антибактериалните вещества.

### **6.1.2. Екстракция на активните компоненти и определяне на някои техни свойства**

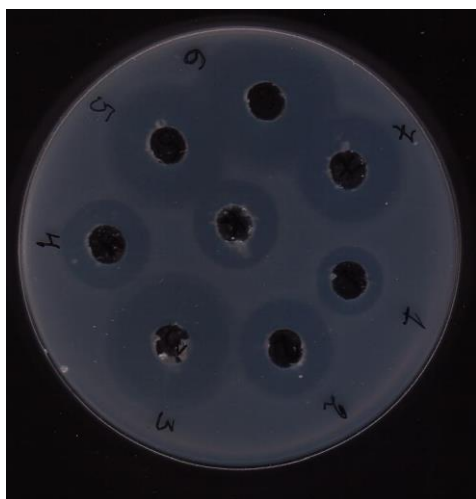
В процеса на развитие на микроорганизмите, образуваните от тях антибиотици, в по-голяма част от случаите, се отделят почти напълно във външната среда. В редица случаи обаче, в културалната среда се отделя само част от антибиотика, а друга част се съхранява вътре в клетките. Има и такива продуценти, при които антибиотикът се съдържа почти напълно в клетките (Егоров, 1986). При предварителния скрининг, проведен от нас бе показано, че антибактериалните вещества се отделят в културалната среда, но част от тях се задържа и в мицела, като активността на мицелните екстракти е по-ниска, което ни насочи към използване на средата. За отделянето на активните вещества, натрупани в нея се използва обикновено екстракция с разтворители, които не се смесват с течната фаза. За тази цел ние използвахме седем разтворители с различна полярност и при различни стойности на рН, което цели селективна екстракция на активните компоненти от културалната среда и получаване на информация за тяхната химична природа. Тези разтворители покриват голям спектър на полярност, което спомага за по-правилното характеризиране на природата на активните компоненти. Четири от разтворителите имат неполярен характер (хлороформ, дихлорметан, бензен, 1,2-дихлоретан), а останалите три (изо-бутанол, етилацетат и бутилацетат) имат биполярен характер. Резултатите за активността на екстрактите, получени с различните разтворители са представени в Табл. 8.

Табл. 8 Активност на екстракти от културалната среда, получени с различни разтворители

Разтворител	Диелектрична константа	Антибактериална активност (диаметър на инхибиторната зона , mm)
Хлороформ	4.8	14
Дихлорметан	9.1	18
iso-Бутанол	15.8	24
Бензен	2.3	19
Етилацетат	6.0	24
Бутилацетат	5.0	26
1,2- Дихлоретан	10.6	22
Културална среда	-	17

От представените резултати се вижда, че антибактериалните вещества се екстрахират в най-голяма степен с разтворители, които имат средна полярност (бутилацетат, iso-бутанол и етилацетат), което може да показва присъствието в тяхната структура както на хидрофилни, така и на липофилни участъци. Прави впечатление, че разликата в антибактериалната активност на тези три екстракта е много малка, което разширява възможностите за избор на разтворител.

На Фиг. 17 е показана антибактериалната активност на екстрактите, получени с различни разтворители срещу *B. subtilis* ATCC 6633.



Фиг. 17. Анализ на антибактериалната активност на екстракти от културалната среда, получени с различни разтворители върху *B. subtilis* ATCC 6633

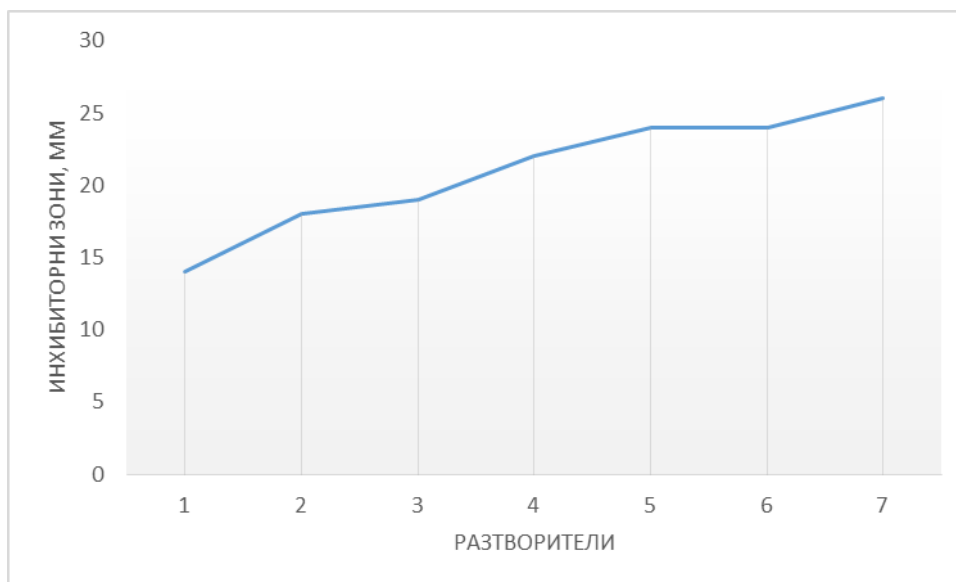
1 – хлороформ, 2 – дихлорметан, 3 – изо-бутанол, 4 – бензен, 5 – етилацетат, 6 – бутилацетат, 7 – 1,2-дихлоретан; В средата - контрола (филтрат от културалната среда)

Филтратът от културалната среда има по-слаба активност от всички екстракти, с изключение на този с хлороформ. Възможно обяснение за това е, че след премахването на разтворителя се получава значително по-концентриран активен продукт, което се отразява на активността.

Зависимостта между биологичната активност и използваните разтворители е показана на Фиг. 18. Тези резултати могат да се обяснят с наличието на няколко активни компонента, както и със сложната им структура, която се



характеризира с наличието както на хидрофилни участъци, така и на хидрофобни. Вероятно по тази причина най-добра активност имат екстрактите, получени чрез използване на разтворители с междинна полярност.



Фиг. 18. Зависимост между антибактериалната активност на екстрактите и използваните разтворители

1 – хлороформ; 2 – дихлорметан; 3 – бензен; 4 – 1,2 дихлоретан; 5 – изо-бутанол; 6 – етилацетат; 7 – бутилацетат

За характеризиране на химичната структура на активните компоненти е необходимо определянето на техните киселинно-основни свойства. За тази цел е направена екстракция с бутилацетат, при която екстрактите са с най-висока антибактериална активност и който лесно се изпарява при 25-29°C. Анализът е проведен при различни стойности на рН, а влиянието на рН върху екстракцията е показано в Табл. 9. Активните компоненти се екстрахират главно в кисела среда, което показва, че те имат киселинна природа (екстрахират се като неутрални протонирани молекули).

Табл. 9 Влияние на рН върху екстракцията на антибактериалните вещества

рН	Антибактериална активност (диаметър на инхибиторна зона, mm)
>7	0
~7	23
<7	25
Културална среда	19

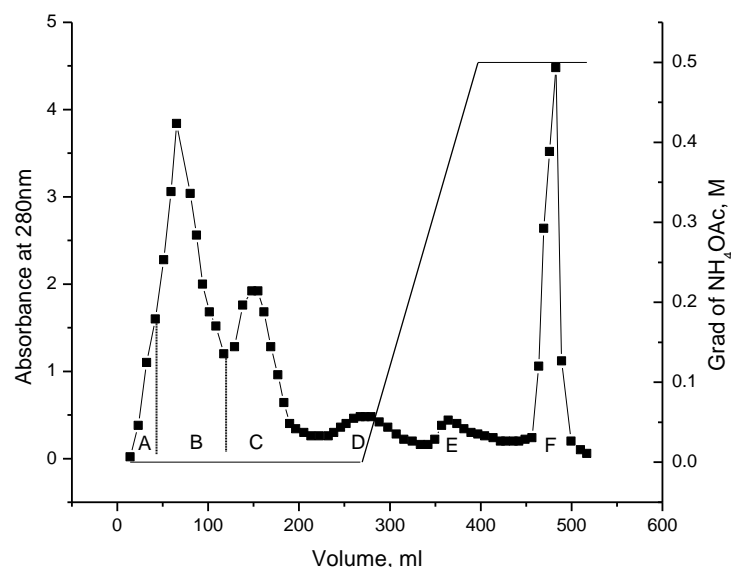
### **6.1.3. Сепариране на активните компоненти чрез катионообменна колонна хроматография**

Сепарирането на основните компоненти от баластните вещества, съдържащи се в хранителната среда и крайните продукти от микробния метаболизъм е извършено чрез катионообменна колонна хроматография със Sephadex-SP C-50, което е подходящ начин за нашите цели, тъй като позволява елиминиране на високомолекулните съединения, необходимо за по-нататъшното разделяне на съединенията. Кривата на елуиране (Фиг. 19) на базата на абсорбцията при 280 nm показва получаването на шест основни групи фракции, означени от А до F.

Четири от фракциите (А – D) са елуирани преди прилагането на градиент, а останалите две (Е и F) са елуирани в условия на градиент. Би могло да се заключи, че първите три фракции (А, В и С) се състоят главно от високомолекулни вещества, които не могат да се задържат при дадените условия. Фракции Е и F се държат като катиони. Разпределението на фракциите по хроматографски пикове е показано в Табл. 10.

Табл. 10 Разпределение на фракциите по хроматографски пикове

Фракция	Обем на задържане volume, cm <sup>3</sup>	Площ на пика, интеграционни единици	% от общата площ
A+B	65.4	142.36	49.24
C	154.8	42.72	14.78
D	279.3	12.87	4.45
E	364.2	9.45	3.27
F	482.8	81.70	28.26



Фиг. 19. Крива на елуиране при разделянето на културалната среда върху Sephadex-SP C-50 (колона 27x340 mm, скорост на потока 0.8 cm<sup>3</sup>/mm, колекторни епруветки 7cm<sup>3</sup>)

#### **6.1.4. Тънкослойна хроматография на отделните фракции**

Комплексността на отделните фракции, получени след катионообменна колонна хроматография е анализирана чрез тънкослойна хроматография (TLC) като са използвани 5 системи. Тънкослойната хроматография е метод за разделяне и идентифициране на компонентите на дадена смес посредством придвижването им върху закрепен тънък слой от твърд, раздробен неорганичен или органичен материал чрез разтворител или система от разтворители. При придвижването компонентите на сместа се задържат от материала на слоя в различна степен според техните индивидуални физикохимични свойства, вследствие на което те се разделят (Илинов, 1988). Резултатите от анализа са представени в Табл. 11.

Табл. 11 Анализ на получените фракции ( $R_f$  – стойности при различните системи от разтворители) чрез TLC

Фракция	Система от разтворители*				
	1	2	3	4	5
A	0.08	-	-	-	-
B	0.08	0.03 / 0.06	0.81	0.24 / 0.37	0.64 / 0.78
C	0.15	-	-	0.13 / 0.82 / 0.87	0.83
D	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-
F	-	0.79	-	-	-

\*Система 1:  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH}$  (3:1); Система 2:  $\text{MeOH}$ :  $\text{CHCl}_3$ ; Система 3:  $\text{MeOH}$  : Ацетон : Хексан (3:2:1); Система 4:  $n\text{-PrOH}$  :  $\text{MeOH}$  (3:1); Система 5:  $n\text{-PrOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (3:1)

На базата на получените резултати може да се заключи, че системата  $n\text{-PrOH}$  :  $\text{MeOH}$  (3:1) е най-подходяща за разделяне на отделните компоненти на фракциите. Фракция В се състои поне от две индивидуални съединения, а фракция С – от три компонента. Разделяне на останалите фракции при тези условия не е постигнато и на този етап не могат да се правят заключения за техния компонентен състав.

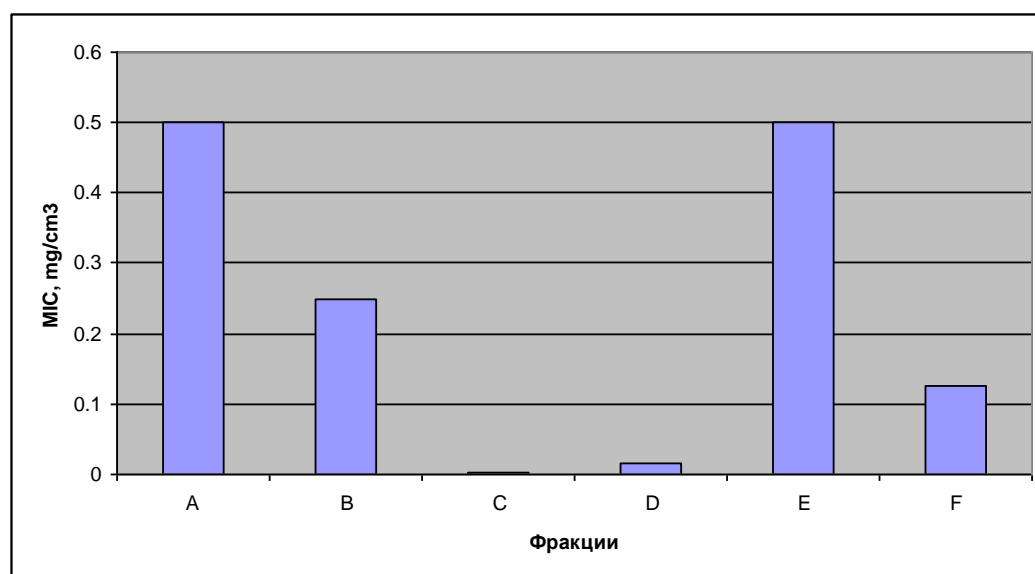
#### **6.1.5. Определяне на минималната инхибираща концентрация (MIC) на отделните фракции**

За да се оцени антибактериалната активност на всяка от получените фракции, е определена тяхната минимална инхибираща концентрация (MIC) спрямо *B. subtilis* ATCC 6633. Резултатите са отразени в Табл. 12 и Фиг. 20.

Фракция С притежава най-ниска MIC (Фиг. 20), което показва, че тя е с най-висока активност. Обратно – фракция А има най-ниска активност. На базата на стойностите на MIC би могло да се каже, че се формират три групи фракции – с ниска активност (фракции А и Е), със средна активност (фракции В и F) и с висока активност (фракции С и D).

Табл. 12 Резултати от определяне на MIC на индивидуалните фракции срещу *B. subtilis* ATCC 6633

№	Концентрация, mg/cm <sup>3</sup>	Антибактериална активност (диаметър на инхибиторната зона, mm)					
		A	B	C	D	E	F
1	1	14	20	25	22	15	16
2	0.5	0	20	21	20	9	15
3	0.25	0	18	24	19	0	14
4	0.125	0	12	21	17	0	10
5	6.25 x10 <sup>-2</sup>	0	0	14	10	0	0
6	3.12 x10 <sup>-2</sup>	0	0	14	10	0	0
7	1.56 x10 <sup>-2</sup>	0	0	14	10	0	0
8	0.78 x10 <sup>-2</sup>	0	0	12	0	0	0
9	0.39 x10 <sup>-2</sup>	0	0	12	0	0	0
10	0.19 x10 <sup>-2</sup>	0	0	0	0	0	0



Фиг. 20. Минимална инхибираща концентрация на отделните фракции от антибактериалния комплекс на *Streptomyces* sp. 47

#### 6.1.6. UV-VIS спектрален анализ на отделните фракции

Фракциите, получени чрез катионообменна колонна хроматография са подложени на UV-VIS спектрален анализ. UV-VIS спектроскопията е най-широко използваният метод за аналитични изследвания, който се използва за качествени и количествени анализи при определяне на различни класове

компоненти както в чисто състояние, така и в смеси, а също и за идентификация на химичната структура и междинните състояния на системи от вещества. При облъчването на молекула с електромагнитно лъчение от ултравиолетовата (100 – 400 nm ) и видимата област (400 – 800 nm) произтича изменение в енергията на най-външните (валентните) електрони, участващи в химичните връзки, ето защо тези спектри се наричат електронни. Енергията на ултравиолетовата и видимата светлина предизвиква също и изменение във вибрационната енергия на молекулите (трептението на отделните атоми), както и в ротационната енергия (въртенето на молекулите). Това е причината в УВ спектрите да се получават широки ивици на поглъщане със заоблени върхове.

Снети са електронни спектри на получените от нас фракции при 200-700 nm за определяне на типа на пиковете и на някои структурни характеристики. Резултатите са показани в Табл. 13.

Табл. 13 Абсорбционни ивици в електронните спектри

Фракции	Пикове, nm		
A	206	217	275
B	210	220	290
C	210	255	430
D	220	275	310
E	220	270	305
F	225	275	-

Спектърът на фракция А разкрива присъствието на абсорбционни ивици при 206 nm, 217 nm и 275 nm, което може да показва присъствие на ароматно ядро (бензен, толуен, пирол или фенол), прикрепено към хетероатом (O, N). Фракция В има аналогични ивици, но леко изместени. Те могат да се дължат на същите структурни елементи, но с друго пространствено обкръжение. Аналогията в електронните спектри на двете фракции предполага подобна структура на съставните съединения. Фракция С се характеризира с пик при 210 nm, 255 nm и друг, много ясен, във видимата част на спектъра – 430 nm (вероятно наличие на NO<sub>2</sub> група). Фракция D показва пикове при 220 nm и 275 nm и един недобре оформен при 310 nm (вероятно монозаместена H<sub>2</sub>C=CH-CH=O група). Разположението на ивиците индикира присъствието на карбонилна група или на ароматно ядро, което не е свързано към хетероатом. Подобен спектър е регистриран и за фракция Е, което предполага структурно

подобие. Фракция F се характеризира с абсорбционни ивици при 225 nm и 275 nm. Не се регистрират ивици в диапазона 330-350 nm (т.е вероятна липса на N=N връзка).

За да поглъща едно съединение в УВ областта от 200-400 nm, то трябва да притежава сложни връзки, съответно  $\pi$ -електрони, или несвързващи молекулни орбитали (неподелени електронни двойки, n-електрони). От месторазположението на ивиците на поглъщане може да се съди за наличието на хромофори и за спрежение на двойни връзки в молекулите на изследваното от нас съединение. При наличие на определени заместители в молекулата на определени места абсорбционните ивици претърпяват батохромно или хипсохромно отместване. Това най-вероятно се дължи на заместители като -NH<sub>2</sub>, -OH, -OR, -COOH, SO<sub>3</sub>H и др., които са слаби хромофори и влияят върху интензитета на поглъщане на останалите хромофори в молекулата. При ароматните съединения тези групи отместват поглъщането и увеличават интензивността му, например бензен ( $\lambda=204$  nm), анилин ( $\lambda=230$  nm), бензоена киселина ( $\lambda=230$  nm), бензонитрил ( $\lambda=224$  nm) или бромбензен ( $\lambda=210$  nm), или техни производни които регистрират сходни спектри с тези в резултатите, които описваме.

#### **6.1.7. Инфрачервена спектроскопия на най-активната фракция**

Основните функционални групи в най-активната фракция – фракция C са анализирани чрез инфрачервена спектроскопия.

Инфрачервената спектроскопия е дял от спектроскопията, обхващащ дълговълновата област на спектъра ( $> 730$  nm след червената граница на видимия спектър). Инфрачервените спектри възникват в резултат на вибрационното (отчасти ротационно) движение на молекулите, а именно – в резултат на преходи между вибрационните нива на основното електронно състояние на молекулите. Енергията на повечето молекулни вибрации има честота, кореспондираща с инфрачервения регион от електромагнитния спектър. Тези вибрации могат да се детектират директно в инфрачервения спектър или индиректно в чрез измерване на разсеяната светлина в т. нар. Раман спектроскопия. При облъчване на дадена молекула с електромагнитна радиация от инфрачервения спектър, отделните функционални групи в молекулата абсорбират енергия със строго определена честота, съответстваща

на тяхната честота на вибрация. Формира се инфрачервен спектър , който след визуализация представлява графика на абсорбцията на радиацията като функция на дължината на вълната и се характеризира единствено чрез позицията на максимума на всеки радиационен сектор. Инфрачервената спектроскопия се използва за идентификация и изследване структурата на молекули със средна големина като лекарства, антибиотици, междинни метаболити, малки пептиди и др. (Кръстанов и Славчев, 2012).

Резултатите от инфрачервената спектроскопия на фракция С са представени в Табл. 14.

Табл. 14 Инфрачервена спектроскопия на фракция С

Фракция "С"	
Банд, $\text{cm}^{-1}$	Описание
3580	$\nu \text{NH}_2$
3400-3200	$\nu \text{OH}$
3015	$\nu \text{NH}_3^+$
2930-2860	$\nu^{\text{s,as}} \text{CH}_2, \text{CH}_3$
1720	$\nu \text{C=O}$ (амид-I)
1620	$\nu \text{N-H}$ (амид-II)
1580	$\nu^{\text{as}} \text{COO}^-$
1565	$\delta^{\text{as}} \text{NH}_3^+$
1530-1510	$\delta \text{N-H}$
1470-1460, 1290	$\delta \text{CH}_2, \text{CH}_3$
1210	$\nu \text{C-O}$
840-780	<i>p</i> -заместена ароматна структура
770-730	Монозаместена ароматна структура

Фракция С притежава много интензивен пик при  $3580 \text{ cm}^{-1}$ , което е резултат от валентна вибрация ( $\nu$ ) на  $\text{NH}_2^-$  група; пик при  $3400\text{-}3280 \text{ cm}^{-1}$  – в резултат на симетрично валентно ( $\nu^{\text{s}}$ ) и асиметрично ( $\nu^{\text{as}}$ ) вибриране на недепротонирана  $\text{OH}^-$  група, и пик при  $3015 \text{ cm}^{-1}$  от валентно вибриране на протонирана аминогрупа; пикове при  $2930 \text{ cm}^{-1}$  – от валентно вибриране на метил- и метиленови групи. Пиковете при  $1720 \text{ cm}^{-1}$  и при  $1620 \text{ cm}^{-1}$  биха могли да се дължат на амидна структура (валентна вибрация).

Пик от валентна асиметрична вибрация на  $\text{COO}^-$  е представена около  $1580 \text{ cm}^{-1}$ . Деформационната вибрация ( $\delta$ ) при  $1565 \text{ cm}^{-1}$  разкрива присъствие на амино група, която е разположена в диапазона  $1530\text{-}1510 \text{ cm}^{-1}$  и на метилова и метиленова групи при  $1470\text{-}1460 \text{ cm}^{-1}$  и  $1290 \text{ cm}^{-1}$ . Диапазонът от  $1210 \text{ cm}^{-1}$  е



типичен за валентна вибрация на обикновена C-O връзка. Следващият диапазон представя типични пикове за ароматна структура – 840-780 cm<sup>-1</sup> на *p*-заместена ароматна структура, и 770-730 cm<sup>-1</sup> на монозаместена ароматна структура.

Пълното изучаване на структурата на активните компоненти би могло да се реализира след изолиране на чистите съединения в препаративни количества и използването на допълнителни структуроопределящи спектрални методи (Раман спектроскопия, MS, FTIR, H-NMR, C-NMR).

При скрининг-процедура за функционални гени кодиращи ензими, участващи в синтезата на нерибозомно синтезирани пептидни, полиенови и гликопептидни антибиотици, както и поликетиди от тип I и тип II на актиномицетни щамове, сред които и *Streptomyces* sp. 47, Енчева-Малинова (2016) установява, че от анализираните гени, този щам притежава само такива за поликетидни антибиотици от тип II. Поликетидите са семейство природни продукти, синтезирани от различни организми (бактерии, гъби, растения, животни), много разнообразни в структурно отношение и с различна биологична активност и фармакологични свойства. Тип II поликетидите представляват често ароматни молекули, образувани от повтарящото се действие на дисоциирани ензими. Тип II поликетидните синтази са семейство от мулти-ензимни системи, които катализират синтезата на естествени ароматни продукти като актинородин (продуциран от *Streptomyces coelicolor*), тетраценомицин (продуциран от *Streptomyces glaucescens*) и окситетрациклин (продуциран от *Streptomyces rimosus*) (Shapiro, 1989). Потенциалът на антарктически почвени актиномицети да синтезират антибиотици с участието на тип II поликетидни синтази е установен и от други автори. Така напр. Bruntner et al. (2005) докладват нов ангуциклинонов антибиотик, наречен фригоциклинон, синтезиран от антарктически почвен щам *Streptomyces griseus* NTK 97 и активен срещу Грам-положителни бактерии. Ангуциклиноните са ароматни поликетиди с тетрацикличен бенз[а]антраценен скелет, като този скелет се синтезира от от тип II поликетидни синтази (Ma et al., 2015).

Данните от изследването на Енчева-Малинова (2016) за присъствието в *Streptomyces* sp. 47 на гени за синтезата на поликетиди от тип II са в подкрепа на резултатите от проведения от нас спектрален анализ на изолираните фракции, които допускат наличието на ароматни структури в тях, подобно на

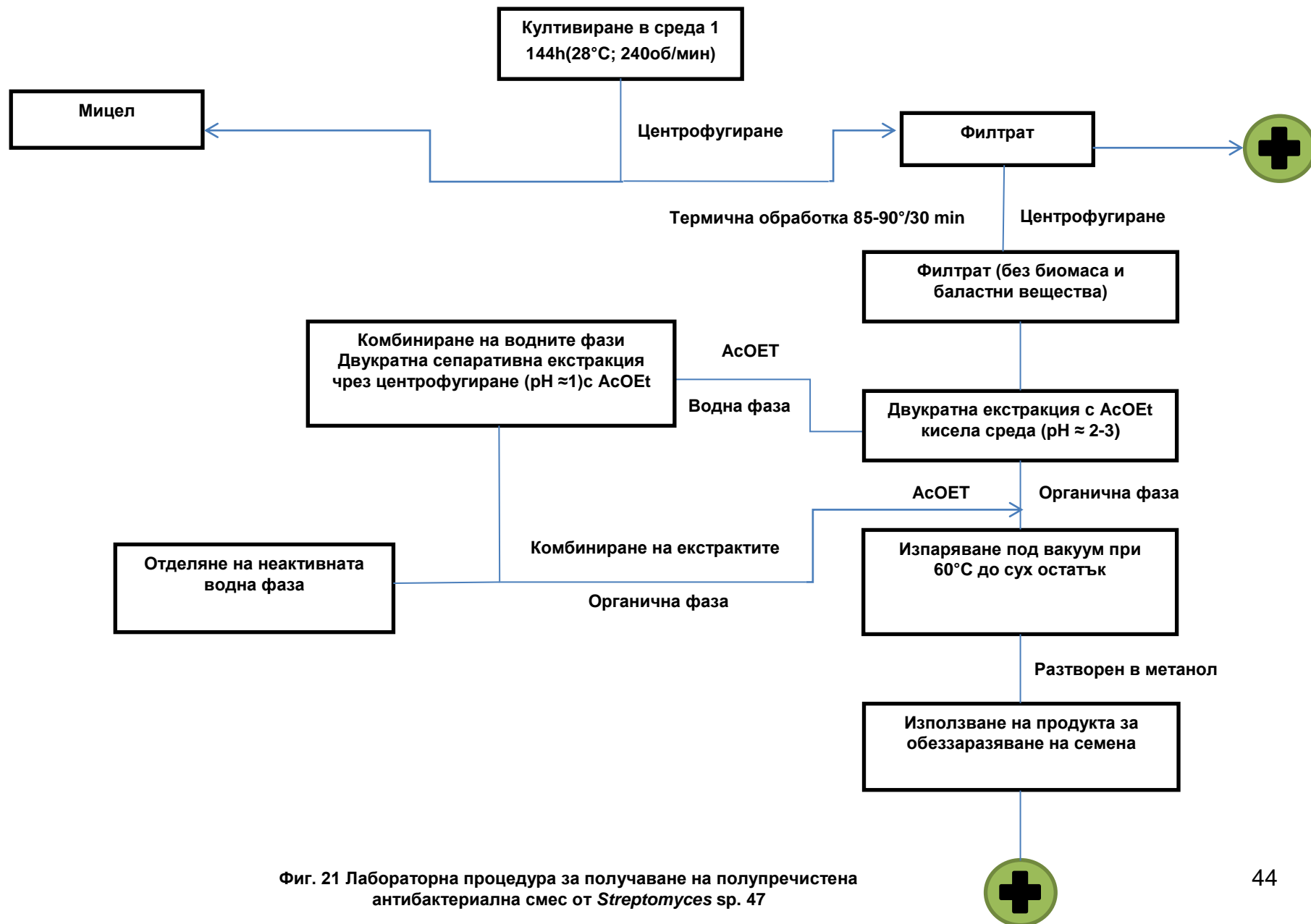
поликетидите от този тип. Следователно, твърде вероятно е *Streptomyces* sp. 47 да синтезира комплекс от вещества с поликетидна природа, имащи антибактериална активност. На базата на изследвания на антибактериалната активност на *Streptomyces* sp. 39 Dimitrova et al. (2013) и Енчева-Малинова (2016) допускат поликетидна структура на синтезираните от щама вещества, които също потискат растежа на фитопатогенни бактерии в *in vitro* условия. В литературата има сведения за използването на вещества с поликетидна природа, синтезирани от бактерии (*P. fluorescens*) и актиномицети (*Streptomyces* sp. AP-123) за целите на биологичния контрол на фитопатогенни гъби (Bangera and Thomashow, 1999; Arazu et al., 2013).

#### **6.1.8. Лабораторна процедура за получаване на антибактериален комплекс от *Streptomyces* sp. 47**

Както бе показано по-горе *Streptomyces* sp. 47 продуцира антибактериален комплекс активен срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни фитопатогенни бактерии. Комплексът се състои поне от шест фракции, две от които показват висока активност и по всяка вероятност са определящи за антибактериалното действие на щама. На базата на получените резултати от проведените експерименти, описани по-горе и във връзка с приложението на този комплекс за деконтаминиране на семена, както и предвид изискванията за степента на пречистване на препаратите за растителна защита, ние приложихме разработена от нас лабораторна процедура (Фиг. 21) за получаване на частично пречистена антибактериална смес, синтезирана от *Streptomyces* sp. 47. Тя включва следните етапи:

- Култивиране на щама в оптимизирана хранителна среда 1 при 28° С, скорост на разбъркване 240 об/мин, продължителост на култивирането 144 h (оптимални стойности на тези параметри, при които се постигна максимална активност на антибактериалните вещества в културалната среда).
- Термична обработка на културалната среда при 85-90°С за 30 min и отстраняване на биомасата и баластните вещества чрез центрофугиране - необходима стъпка за преципитиране на белтъци и по-бързо предварително очистване. В предварителни изследвания е установено, че антибактериалният комплекс няма белтъчна природа.

- Двукратна екстракция в кисела среда (pH ~ 2-3) с етилацетат до насищане на органичната фаза. За увеличаване на добива и с оглед оптимизиране на разходите по получаване на антибактериалния комплекс двукратната екстракция е достатъчна. Икономически обосновано е използването на етилацетат вместо бутилацетат (при който активността е най-висока), тъй като етилацетатът е около 20-25% по-евтин, а и активността на екстракта не се отличава съществено от този, получен с бутилацетат.
- Комбиниране на водните фази, последвано от двукратна сепаративна екстракция (чрез центрофугиране в кисела среда (pH ~ 1) с етилацетат. С оглед повишаване добива на активния компонент е извършена допълнителна екстракция с етилацетат при по-агресивни условия (pH ~ 1). Това осигурява минимална загуба на активен компонент в изхвърлената водна фаза.
- Комбиниране на екстрактите и изпаряване под вакуум при 60°C до сухо
- Използване на продукта за обеззаразяване на семена



Фиг. 21 Лабораторна процедура за получаване на полупречистена антибактериална смес от *Streptomyces* sp. 47

**6.1.9. *In vivo* активност на антибактериалния комплекс, синтезиран от *Streptomyces* sp. 47**

За потвърждаване на активността на синтезирания от *Streptomyces* sp. 47 антибактериален комплекс в *in vivo* условия са използвани домати семена сорт „Идеал“, изкуствено заразени с фитопатогенни бактерии чрез вакуумна инфилтрация (Bogatzevska et al., 1989). За деконтаминирането им е използван препарат, получен от *Streptomyces* sp. 47 по процедура, описана в т. 11 от раздел Материали и методи, като полученото след комбинирането на екстрактите сухо вещество е разтворено в метанол. Семената са третирани с препарата, използвайки също вакуумна инфилтрация. Експериментът е проведен в няколко варианта, които заедно с резултатите са показани в Табл. 15. Използването на семена в експеримента *in vivo* се базира на факта, че в естествени условия тестваните фитопатогенни бактерии, причинители на бактериози по домати, се съхраняват в тях и разпространяват върху поникналите растения, т.е. семената са източник на начален инокулум за възникване на болестта.

Табл. 15 *In vivo* активност на антибактериалния комплекс, синтезиран от *Streptomyces* sp. 47 върху инфектирани с фитопатогенни бактерии домати семена

№	Варианти	Кълняемост, %		Средна степен на нападение
		Лабораторна	Полска	
1	Контрола (незаразени и нетретирани семена)	86	86	0
2	Контрола (незаразени семена и третирани с антибактериалния препарат)	85	72	0
3	Семена, инокулирани с <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	81	62	1.28
4	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoria</i>	82	74	1.42
5	Семена, инокулирани с <i>C. michiganensis</i> pv. <i>michiganensis</i>	77	48	45% здрави
6	Семена, инокулирани с <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> и третирани с антибактериалния комплекс	86	76	0.83
7	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoria</i> и третирани с антибактериалния комплекс	86	76	0.91
8	Семена, инокулирани с <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> и третирани с антибактериалния комплекс	87	75	92% здрави

За оценяване на обеззаразяващия ефект на антибактериалния препарат по отношение на *P. syringae* pv. *tomato* и *X. vesicatoria* е изчислена средната степен на нападение по скалата на Sotirova and Beleva (1975) на поникнали от обеззаразените семена домати растения във фаза 5-6 лист (Фиг. 22 и 23) . За оценка на признаците на болестта във варианта с *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, растенията са срязвани за да се наблюдава възникнала вследствие на патогените кафява некроза на проводящата система (Фиг. 24) и е определен процентът на здрави и болни растения до фаза 5-6 лист. От Табл. 15 се вижда, че при варианти 6 и 7 средната степен на нападението намалява приблизително с 64%. Почти двойно се увеличава процентът на здравите растения при семената, инокулирани с *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* след третиране с препарата. Третирането не променя съществено както лабораторната, така и полската кълняемост на семената. Изключение правят семената, инокулирани с *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, при които полската кълняемост се увеличава с 56% след третиране с антибактериалния комплекс в сравнение с нетретираните и инокулирани семена, което показва промотиращ ефект на комплекса. Не се наблюдава фитотоксичен ефект на препарата по отношение на тест-растенията.



Фиг. 22 Симптоми по листата на домати сорт „Идеал”, предизвикани от *P. syringae* pv. *tomato*, причинител на черно бактериюно струпяване



Фиг. 23 Симптоми по листата на домати сорт „Идеал”, предизвикани от *X. vesicatoria*, причинител на бактериюно струпяване



Фиг. 24 Симптоми по корени и стъбла на домати сорт «Идеал», предизвикани от *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, причинител на бактерию увяхване

Изследвайки антибактериалната активност на набор от антарктически актиномицети в условия *in vivo*, Енчева-Малинова (2016) доказва обеззаразяващия ефект на екстракти от мицела на три от изследваните от нея щамове по отношение на причинителите на бактерию струпяване по пипер. Способността на актиномицетите да синтезират вещества с потенциал за приложение в растителната защита и по-специално за борба с бактериози по домати е показана от Bogatzevska et al. (1989). Авторите прилагат препарат за растителна защита (бактерицин), който е комплекс от няколко вещества, синтезиран от *Streptomyces hygroscopicus* 155 (Тишков и др., 1991). Редица, базирани се на актиномицети биоконтролни агенти са разработени като търговски препарати (Aggarwal et al., 2016). Сред тях най-експлоатирани са актиномицетите от род *Streptomyces*, които синтезират антибиотици, фунгициди, хербициди, инсектициди, акарициди и др. Те се прилагат към целевите култури основно под формата на културална среда, спорови суспензии, прахове и др. (Aggarwal et al., 2016). Други автори доказват активността на актиномицети като биоконтролни агенти като използват инхибиторни вещества, синтезирани от тях под формата на бутанолни (Kekuda et al., 2010) и етилацетатни екстракти (Haque et al., 2014) или просто филтрати от културална среда (Xiong et al., 2004; Kekuda et al., 2012; Rishikesh et al., 2013).

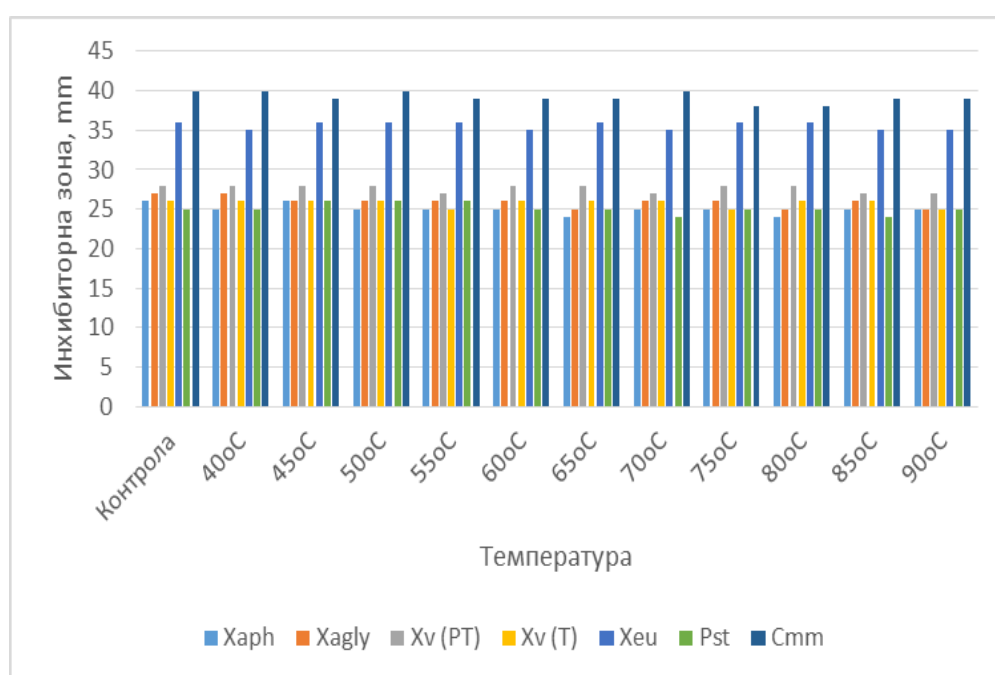
## **6.2. *Streptomyces* sp. 54N**

### **6.2.1. Култивиране**

За начално характеризиране на антибактериалните вещества, синтезирани от *Streptomyces* sp. 54N щамът е култивиран в оптимизирана среда 1 чрез

двустепенна ферментация (240 об/мин, 28°C, 144 h). След края на култивирането биомасата е отделена чрез центрофугиране при 8 хил. об/мин на центрофуга Jouan. За по-нататъшни анализи е използван филтратът (супернатантата) от културалната среда.

Филтратът е термично третиран при 11 различни температури за проверка на термостабилността на активните вещества, след което е изпитана неговата активност срещу тест-фитопатогенни бактерии. Резултатите са показани на Фиг. 25. Вижда се, че активността не се повлиява от термичната обработка, което показва, че активните вещества са термостабилни.



Фиг. 25. Антибактериална активност на филтрат от културална среда на *Streptomyces* sp. 54N след термообработка

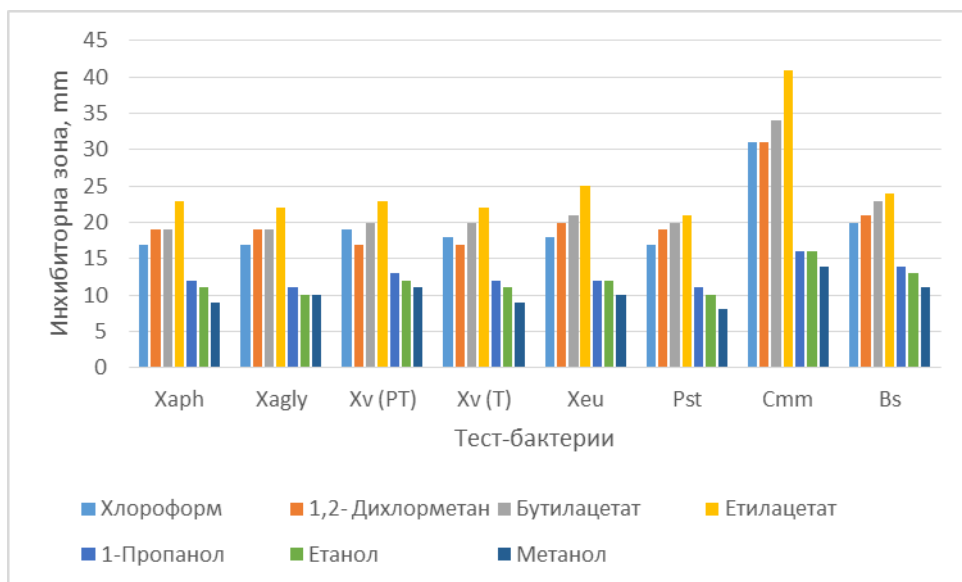
Xaph – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; Xagly – *X. axonopodis* pv. *glycines*; XvPT – *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип); XvT – *X. vesicatoria* (доматен патотип); Xeu – *X. euvesicatoria* (пиперен патотип); Pst – *P. syringae* pv. *tomato* Ro; Cmm – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

### 6.2.2. Екстракция на активните компоненти и определяне на антибактериалната им активност

За екстракция на активните компоненти, културалната среда е третирана със седем разтворителя с оглед на избор на най-подходящ – хлороформ, 1,2-



дихлорметан, бутилацетат, етилацетат, 1-пропанол, етанол и метанол, след което е определена антибактериалната активност на всеки екстракт срещу 8 тест-фитопатогенни бактерии. Установено е, че с най-висока активност е екстрактът, получен с етилацетат, с който бяха проведени по-нататъшните изследвания (Фиг. 26).



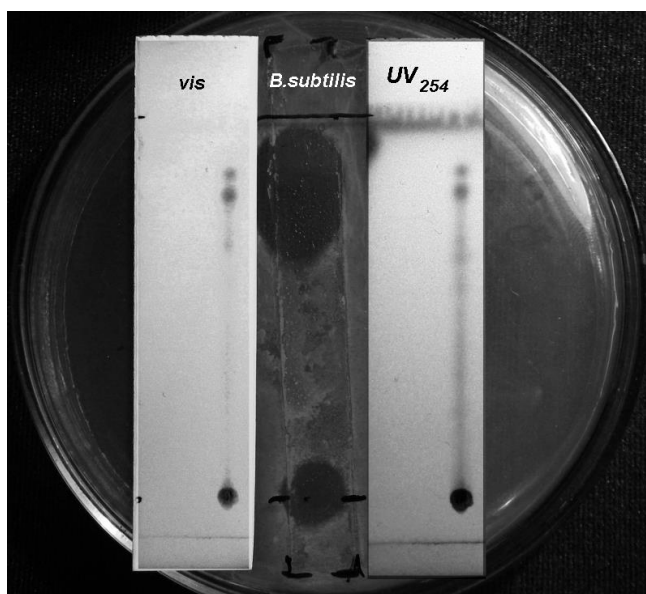
Фиг. 26. Антибактериална активност на различни екстракти от културалната среда

Xaph – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; Xagly – *X. axonopodis* pv. *glycines*; XvPT – *X. vesicatoria* (пиперено-доматен патотип); XvT – *X. vesicatoria* (доматен патотип); Xeu – *X. euvesicatoria* (пиперен патотип); Pst – *P. syringae* pv. *tomato* Ro; Cmm – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

### 6.2.3. Тънкослойна хроматография и биоавтография

Анализът на компонентния състав на антибактериалния комплекс, синтезиран от щам *Streptomyces* sp. 54N е продължен с тънкослойна хроматография и биоавтография на активните компоненти, съдържащи се в етилацетатния екстракт. Резултатите от тези анализи са показани на Фиг. 27. От хроматограмата (Фиг. 27) се вижда, че в резултат на проведената TLC се разграничават три добре изразени петна във видимата област. Под UV светлина се откриват поне пет петна. Присъствието на петно близо до старта показва, че използваната система (хлорофор:метанол – 90:10) не позволява миграция на всички компоненти. Възможно е това да се дължи на тяхната

полярна природа, което има за резултат абсорбирането им от силикагела на плаката.



Фиг. 27. Тънкослойна хроматография (хлороформ:метанол – 90:10) и биоавтография на етилацетатни екстракти от филтрати от течна култура на щам 54 N

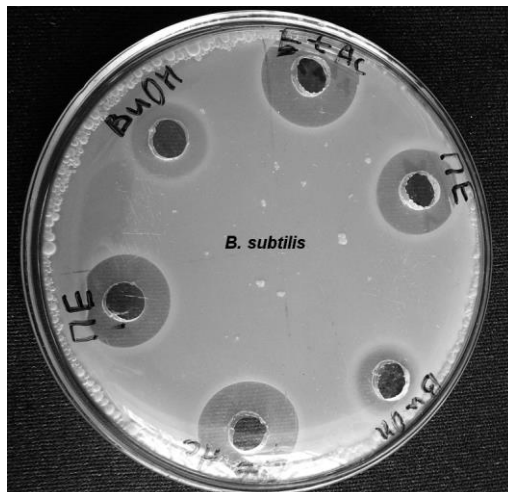
След биоавтография, използвайки хроматографската плака с разделените компоненти срещу тест *B. subtilis* ATCC 6633 се наблюдават две ясно обособени инхибиторни зони – една, съответстваща на петното от старта и друга – на петната от фронта на хроматограмата (Фиг. 27). Формата на инхибиторната зона в областта на фронта показва, че тя се дължи на антибактериално действие на повече от един компонент. От сравняването на биоавтограмата с хроматограмата се вижда, че на плаката се формират поне три петна.

#### **6.2.4. Сепариране, частично пречистване на активния комплекс и определяне на антибактериалната активност на отделните фракции**

По-нататъшното сепариране и частично пречистване включва екстракция на водната фаза, получена след изпаряване на етилацетата, с петролеев етер и отстраняване на типичните неполярни компоненти. Екстрактът се промива с наситен разтвор на NaCl, след което се изпарява. В резултат се получава сух

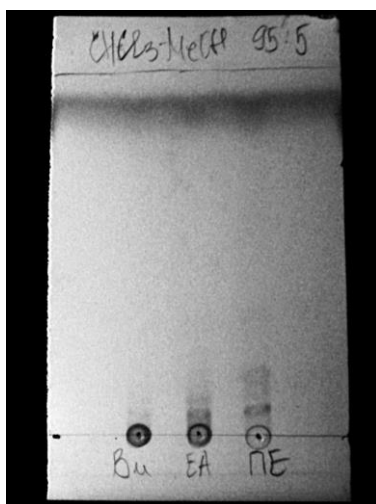
субстрат. Промивната вода, съдържаща NaCl се добавя към водната фаза и се екстрахира двукратно с n-бутанол за отстраняване на полярните активни вещества от другите полярни компоненти. В резултат на това фракциониране се получават три фракции с различна полярност. След изпаряване сухите субстанции се разтварят в метанол и се подлагат на микробиологичен и хроматографски анализ (Фиг. 28 и 29). От Фиг. 28 се вижда, че фракцията, получена с етилацетат има най-висока активност, а тази с бутанол – най-ниска.

TLC на трите фракции е проведена в система хлорофор:метанол – 95:5 (по-малко полярна), за да може най-активните компоненти в етилацетатния екстракт да се разделят по-добре. Наблюдават се две петна, които поглъщат в UV област.



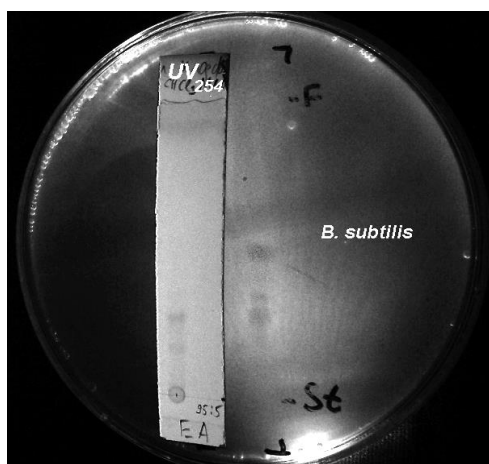
PE – петролев етер; BuOH  
– бутанол; EtAc. - етилацетат

Фиг. 28. Антибактериална активност на получените фракции срещу *B. subtilis* ATCC 6633



Фиг. 29. Тънкослойна хроматография на получените фракции

След TLC се наблюдават четири инхибиторни зони (Фиг. 30) и две разграничаващи се петна, които са видими в UV – областта (Фиг. 30) и биоавтография на етилацетатната фракция. Само едно от петната притежава антибактериална активност. Другите две инхибиторни зони се дължат на компоненти, които не поглъщат в UV около 250 nm, вероятно поради липса на сложни връзки или несвързващи молекулни орбитали, т.е липса на хромофори. Активността на екстракта с петролеев етер показва, че част от активните компоненти притежават строга неполярна природа. Необходимо е допълнително сепариране на получените фракции за анализ на индивидуалните субстанции чрез физикохимични методи.



Фиг. 30. Тънкослойна хроматография (хлороформ:метанол - 95:5) и биоавтография на крайния етиалацетатен екстракт

#### **6.2.5. Лабораторна процедура за получаване на антибактериален комплекс от *Streptomyces* sp. 54N**

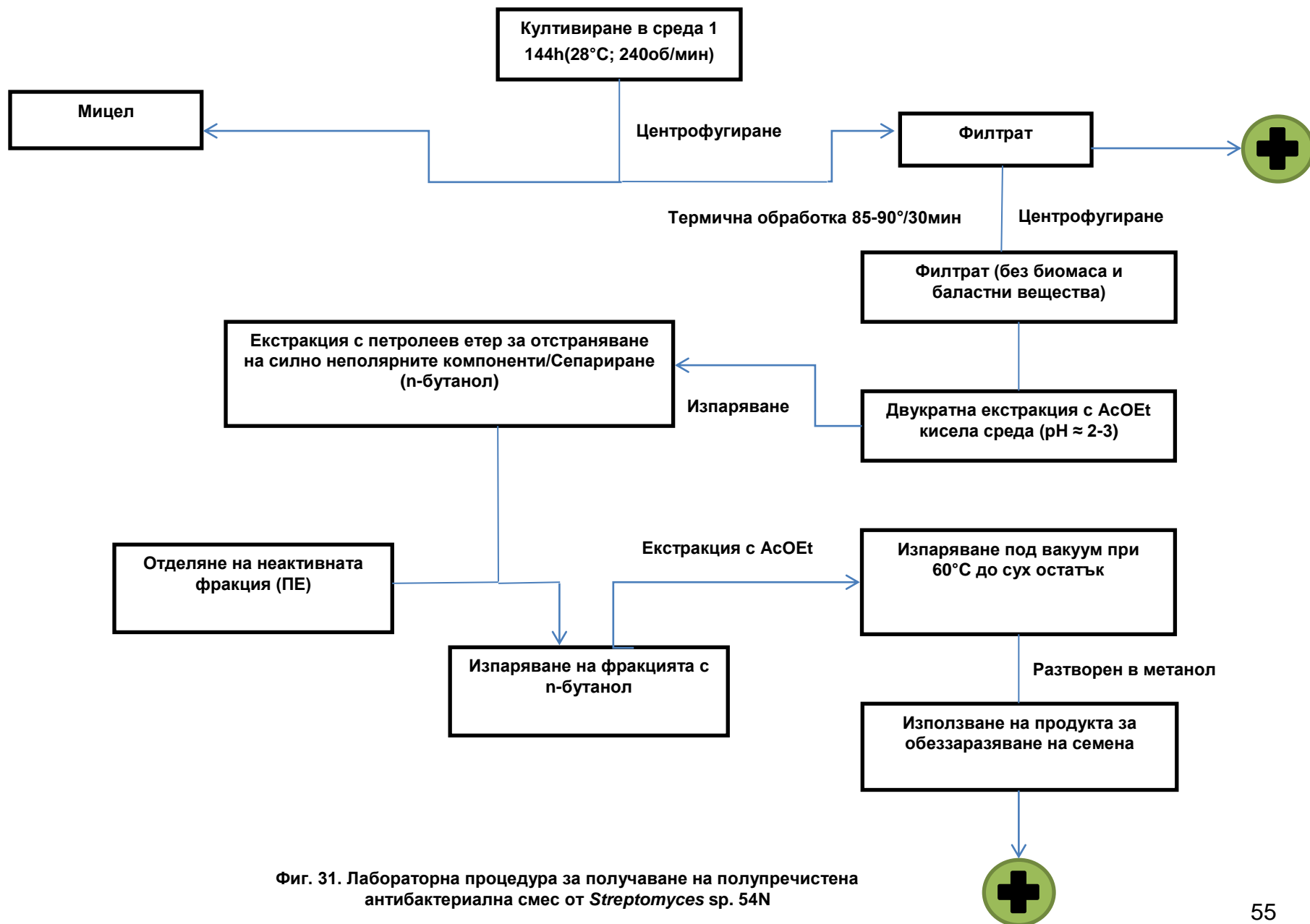
От проведените до момента анализи с този щам се вижда, че той подобно на *Streptomyces* sp. 47, а така също и на други видове, синтезира смес от антибактериални вещества, която проявява антибактериална активност спрямо включените в експеримента тест-фитопатогенни бактерии. Въз основа на получените резултати и във връзка с изпитването на активността в *in vivo* условия и потенциално практическо приложение би могла да се предложи следната лабораторна процедура (Фиг. 31) за получаване на полупречистена антибактериална смес от *Streptomyces* sp. 54N:

- Култивиране на щама в оптимизирана хранителна среда 1 при 28° С, скорост на разбъркване 240 об/min, продължителост на култивирането 144 h (оптималните стойности на тези параметри, при които се постигна максимална активност на продуцираната от щама смес от антибактериални вещества)
- Термична обработка на културалната среда при 85-90°С за 30 min и отстраняване на биомасата и баластните вещества чрез центрофугиране. Тази стъпка е необходима за преципитиране на белтъците и по-бързо последващо предварително очистване. В предварителни изследвания е установено, че антибактериалният комплекс няма белтъчна природа.
- Двукратна екстракция в кисела среда (pH ~ 2-3) с етилацетат до насищане на органичната фаза.
- Отстраняване на силно неполярните компоненти от етилацетатния екстракт чрез екстракция с петролеев етер на остатъка, получен след изпаряване на етилацетатния екстракт
- Екстракция на водната фаза, получена след екстракцията с петролев етер с етилацетат (pH ~ 2-3) с оглед на максимално извличане на активните вещества при условие на икономическа рентабилност и улеснена лабораторна процедура.
- Сепарация с n-бутанол за отделяне на полярната фаза и изпаряване
- Екстракция с етилацетат и изпаряване под вакуум при 60°С до сухо
- Разтваряне в метанол и използване за обеззаразяване на семена на домати

### **6.2.7. *In vivo* активност на антибактериалния комплекс, синтезиран от *Streptomyces* sp. 54N.**

Много често щамове показали висока активност в условия *in vitro* не я потвърждават при опити *in vivo*. Ето защо следваща задача е определянето на действието на синтезирания антибактериален комплекс върху домати и пиперени семена, инокулирани изкуствено с фитопатогенни бактерии. Процедурата по заразяването на семената с бактериите, както и третирането им с антибактериалните вещества е описана подробно в раздел материали и методи (т. 11). В случая с доматените семена е използван частично пречистен антибактериален препарат, като е използван остатъкът, получен след изпаряване на етилацетата в края на лабораторната схема, разтворен в метанол. С него са обеззаразявани домати семена, предварително инокулирани с три тест-фитопатогенни бактерии (Табл. 16). Поставяни са и контроли (инокулирани с фитопатогените и нетретирани с препарата семена, както и такива третирани с метанол). Определянето на жизнеността на бактериите е извършвано чрез инкубиране на семената върху диагностични за всяка бактерия хранителни среди, върху които те се развиват със специфични признаци. От Табл. 16 се вижда, че третирането на семената с антибактериалния препарат има най-силен обеззаразяващ ефект по отношение на *C. michiganensis* pv. *michiganensis*, където болните семена са само 5% рещу 98% при контролата. Малко по-слаб е ефектът при *X. vesicatoria* и значително по-слаб при *P. syringae* pv. *tomato*. Там обеззаразяващият ефект на препарата е най-нисък - процентът на болните семена е значителен – 72%.

В случая с пиперените семена са използвани филтрати от културалната среда и екстракти от мицела на щама. Резултатите от третирането на семената с екстрактите са показани в Табл. 17 и Фиг. 32.



Фиг. 31. Лабораторна процедура за получаване на полупречистена антибактериална смес от *Streptomyces* sp. 54N

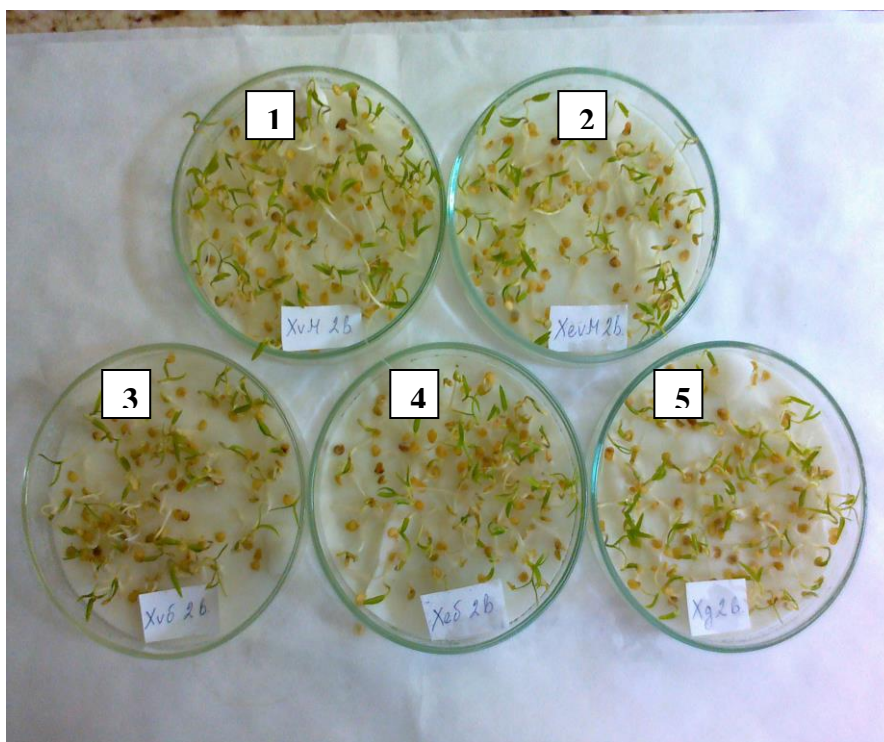
Табл. 16 Антибактериална активност на *Streptomyces* sp. 54N в условия *in vivo*

No	Варианти	Брой семена		Общ брой третираны семена
		здрави	болни	
1	Семена, инокулирани с <i>C. michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> и третираны с антибактериалния препарат	190	10	200
2	Семена, инокулирани с <i>C. michiganensis</i> subsp.. <i>michiganensis</i>	2	98	100
3	Семена, инокулирани с <i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i> Ro и третираны с антибактериалния препарат	56	144	200
4	Семена, инокулирани с <i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i> Ro	0	100	100
5	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoriae</i> T <sub>1</sub> и третираны с антибактериалния препарат	170	30	200
6	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoriae</i> T <sub>1</sub>	2	98	100

Табл. 17 *In vivo* антибактериална активност на *Streptomyces* sp. 54N срещу причинители на бактериено струпяване по пипер

№	Вариант на експеримента	Здрави семена, Кълняемост,	
		%	%
1	Контрола (неинокулирани с патогените семена и третираны с екстрактите)	100	89
2	Семена, инокулирани с <i>X. gardneri</i> 66 и третираны с екстракта	96	79
3	Семена, инокулирани с <i>X. gardneri</i> 66 и нетретираны	-	83
4	Семена, инокулирани с <i>X. euvesicatoria</i> 41b и третираны	99	90
5	Семена, инокулирани с <i>X. euvesicatoria</i> 41b и нетретираны	-	84
6	Семена, инокулирани с <i>X. euvesicatoria</i> 37M и третираны	100	89
7	Семена, инокулирани с <i>X. euvesicatoria</i> 37M и нетретираны	-	84
8	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoria</i> 8b и третираны	98	88
9	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoria</i> 8b и нетретираны	-	89
10	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoria</i> 44M и третираны	98	89
11	Семена, инокулирани с <i>X. vesicatoria</i> 44M и нетретираны	-	90





Фиг. 32. *In vivo* антибактериален ефект на щам *Streptomyces* sp. 54N при семена от пипер, инокулирани с фитопатогенни бактерии и третирани с екстракти от мицел

1 – семена, инокулирани с *X. vesicatoria* 44M и; 2 – семена, инокулирани с *X. euvesicatoria* 37M; 3 – семена, инокулирани с *X. vesicatoria* 8b; 4 – семена, инокулирани с *X. euvesicatoria* 41b; 5 – семена, инокулирани с *X. gardneri* 66.

Експериментите показват, че филтратите от културалната течност не показват обеззаразяващ ефект в условия *in vivo* към използваните тест-фитопатогенни бактерии, независимо че в *in vitro* условия такъв е регистриран. Възможно е това да е свързано с пропускливостта на пиперените семена или на недостатъчно висока концентрация на активните вещества за постигане на обеззаразяващ ефект. Екстрактите значително инхибират бактериите, като процентът на здравите семена се доближава до този на контролата. Процентът на кълняемост на заразените и третирани с екстрактите семена е близък до този на контролата, като най-нисък той е при вида *X. gardneri*, където и процентът на обеззаразяване е сравнително най-нисък.

Редица автори описват *in vitro* и *in vivo* антимикуробна активност на много актиномицетни видове, вкл. и на такива изолирани от Антарктида (Moncheva et al., 2002; Nedialkova and Naidenova, 2005; Manian and Sowndhararajan, 2010; Karkouri et al., 2010; Dhanasekaran et al., 2012). Сред тест-бактериите, срещу

които е определяна антимицробната активност са и фитопатогенни бактерии, но въпреки това данните не са много. В някои страни за контрол на бактериози, причинявани от видове от род *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* приложение са намерили антибиотиците стрептомицин, продуциран от *S. griseus* и окситетрациклин, синтезиран от *S. rimosus* (Aggarwal et al., 2016), както и на други вторични метаболити, синтезирани от *S. lavendulae*, ефективни срещу кореново гниене по лука, предизвикано от *E. carotovora* и *Burkholderia cepacia* (Abdallah et al., 2013).

Обработването на семената на домати и пипер с вещества, продуцирани от изследваните от нас стрептомицетни щамове е начална, но необходима процедура в посока на разработване на средства за защита от бактериози на тези два гостоприемника, предизвикани от тестваните фитопатогенни бактерии и базирани на синтезираните от щамовете антибактериални вещества. Значението на получените резултати се увеличава от факта, че причинителите на тези болести се съхраняват в семената и се предават чрез тях на поникналите растения. Установено е, че инфектираните семена са основен източник на инокулум за поява на бактериен струпясване по пипер и домати (Mirik and Aysan, 2009; Dutta et al., 2014). Това означава, че предварителната обработка на семенния материал е от голяма важност за разпространението на патогените, нормалното развитие на растенията и получаването на качествена продукция. Обеззаразяването на семената трябва да се разглежда като важна стъпка в растителната защита и селекцията на специфични вещества и би могло да бъде ключ в ограничаването на болестта. Значението на вещества с природен произход е важно, тъй като използваните конвенционални техники за контрол на фитопатогените, преди всичко базирани на химически вещества, имат редица ограничения, свързани с появата на резистентни щамове и нежелани ефекти върху околната среда.

# ИЗВОДИ

На базата на проведените експерименти и получените от тях резултати биха могли да се направят следните по-важни изводи:

1. Най-висока антибактериална активност и потенциал като агенти за биологичен контрол на фитопатогенни бактерии в условия *in vitro* притежават актиномицетните щамове, изолирани от Антарктически почви, като три от тях (30, 47 и 54N) се характеризират с най-широк спектър на действие.
2. Инхибиращото действие на щамове 30, 47 и 54N не се дължи на ензими потискащи функционирането на *Quorum sensing* регулаторния механизъм при изследваните тест-фитопатогенни бактерии.
3. Щамове 30, 47 и 54N принадлежат към род *Streptomyces*, установено с класически фенотипен подход и потвърдено чрез секвениране на гена за 16S рРНК. Не се изключва възможността те да са нови видове, за доказването на което са необходими допълнителни молекулярни анализи.
4. Най-висока антибактериална активност на щамове *Streptomyces* sp. 47 и *Streptomyces* sp. 54N се постига при култивирането им в среда 1, съдържаща манитол, царевично брашно и соев шрот, като оптималната концентрация на царевичното брашно и соевия шрот е 1%.
5. *Streptomyces* sp. 47 продуцира антибактериален комплекс, който се екстрахира от културалната среда най-добре с разтворители със средна полярност и е съставен поне от 6 фракции, установено на базата на катионообменна колонна и тънкослойна хроматография.
6. Въз основа на UV-VIS спектроскопски анализ фракциите на антибактериалния комплекс на *Streptomyces* sp. 47 се разделят на четири групи на базата на структурното им подобие и на три групи на базата на установените минимални инхибиращи концентрации. Най-ниска MIC ( $0.39 \cdot 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$ ) притежава една от фракциите (фракция С).
7. Сравняването на резултатите от инфрачервената спектроскопия на най-активната фракция на антибактериалния комплекс на *Streptomyces* sp. 47 с тези от скрининг на щама за присъствието на антибиотикови синтетази

допуска наличието в комплекса на вещества с поликетидна природа от тип II.

8. *Streptomyces* sp. 54N синтезира комплекс от антибактериални вещества, който се състои най-малко от три фракции, установено с тънкослойна хроматография и биоавтография. Част от фракциите не са определящи за активността на комплекса.
9. Щамове *Streptomyces* sp. 47 и *Streptomyces* sp. 54N проявяват антибактериално действие срещу причинители на бактеријни болести по растения от сем. Solanaceae в *in vivo* условия което ги прави потенциални агенти за биологичен контрол на фитопатогени, пренасящи се със семена на домати и пипер.

## ПРИНОСИ

1. Разработена е лабораторна процедура за получаване на антибактериални вещества от два почвени актиномицетни щама, изолирани от Антарктида, с активност срещу фитопатогенни бактерии, причинители на болести по растения от сем. Solanaceae.
2. Получена е информация за първичната характеристика на антибактериалните вещества, синтезирани от актиномицетните щамове, която може да се използва за по-нататъшни изследвания.
3. Успешно е разработена и експериментирана схема за обеззаразяване на домати и пиперени семена от фитопатогенни бактерии, разпространяващи се чрез тях, с антибактериални вещества от двата антарктически актиномицетни щама.

## ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Encheva-Malinova M., Vancheva T., **Badzhinerov N.**, Koleva V., Tishkov S., Bogatzevska N., Moncheva P. (2015) Antimicrobial activity of Antarctic Streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. *Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski" Faculte de Biologie*, volume 100, livre 4, pp. 216-222. First National Conference of Biotechnology, Sofia 2014.
2. Licheva, Ts., **Badzhinerov, N.**, Savov, V., Moncheva, P. 2009. Physiological effect of Streptomyces on cyclamen pot flower. *Biotechnol. & Biotechnol. EQ.*, 23, 709-712. (impact factor 0.291)
3. **Badzhinerov N.**, Tishkov S., Stoyanova M., Bogatzevska N., Moncheva P. (2009). Activity of antarctic streptomycetes strains against phytopathogenic bacteria. *Ecologica* 16, 307-311.
4. **Badzhinerov N.**, Bogatzevska N., Moncheva P. (2008). Compounds from Streptomycetes with Activity against Plant Pathogenic Bacteria and their Application in Biological Control. *Ecology and Future*, 7 (1), 26-31.
5. **Badzhinerov N.**, Atanasov V., Dorkov P., Moncheva P. (2005). Isolation and partially characterization of antimicrobial substance produced by an antarctic streptomycete strain. *Ecological engineering and environment protection*, 2, 24-32.

## УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Encheva-Malinova, M., Vancheva T., **Badzhinerov N.**, Koleva V., Tishkov S., Bogatzevska N., Moncheva P. 2014. Antimicrobial activity of Antarctic streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. Първа Национална конференция по Биотехнология "30 години Биотехнология в България", 17-18 октомври, София, Биологически факултет, АВТН 7, 76 (постер).
2. Licheva T., **Badzhinerov N.**, Savov V., Moncheva P. 2009. Physiological effect of *Streptomyces* on cyclamen pot flower. XI Anniversary Scientific Conference "Biology – Traditions and challenges", 27-29 May, 2009 - Sofia, Bulgaria, МВ-р63. (постер)
3. Licheva T., **Badzhinerov N.**, T., Moncheva P., Groudeva V. 2009. Actinomyces as a member of the biodestruction microbial community in Rila Monastery. XI Anniversary Scientific Conference "Biology – Traditions and challenges", 27-29 May, 2009 - Sofia, Bulgaria, ВТ-р42. (постер)

## УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. Договор No 196/2009, Фонд „Научни изследвания» на СУ „Св. Кл. Охридски” „Скрининг на някои родове прокариоти за продуциране на протеиназни инхибитори»
2. Договор No 71/08, Фонд „Научни изследвания на СУ „Св. Кл. Охридски” ”Интегриран подход за търсене на биологични средства за борба срещу бактериози по културните растения”
3. Договор No ВУ-Б-206/06, Дирекция „Научни изследвания”, МОН, България: “Идентификация, фенотипно и генотипно разнообразие и междувидови взаимоотношения на фитопатогенните бактерии от род *Burkholderia*”.

## ЦИТИРАНИЯ НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

**1. Encheva-Malinova M., Vancheva T., Badzhinerov N., Koleva V., Tishkov S., Bogatzevska N., Moncheva P. (2015) Antimicrobial activity of Antarctic Streptomyces against pepper bacterial spot causing agents. *Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski" Faculte de Biologie*, volume 100, livre 4, pp. 216-222. First National Conference of Biotechnology, Sofia 2014.**

1. Yarzabal, L.A. **2016**. Antarctic Psychrophilic Microorganisms and Biotechnology: History, Current Trends, Applications, and Challenges. In *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability* (pp. 83-118). Springer Singapore.
2. Ferrarezi, J.H., Vieira, G., Vianna, M.V., Morão, L.G., Sette, L.D., Ferreira, H. and Sass, D.C. **2016**. Extratos de fungos da Antártica: Avaliação da atividade contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Ciência & Tecnologia*, 8 (esp.).

**2. Badzhinerov N., Tishkov S., Stoyanova M., Bogatzevska N., Moncheva P. (2009). Activity of antarctic streptomyces strains against phytopathogenic bacteria. *Ecologica* 16, 307-311.**

1. Dimitrova, D., Dorkov, P. and Gocheva, B. **2013**. Antibiotic complex, produced by an Antarctic actinomycete strain *S. anulatus* 39 LBG09. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19 (2), pp.72-76.

**3. Badzhinerov N., Bogatzevska N., Moncheva P. (2008). Compounds from Streptomyces with Activity against Plant Pathogenic Bacteria and their Application in Biological Control. *Ecology and Future*, 7 (1), 26-31.**

1. Alvarez-Fernandez, R. Patented applications of gene silencing in plants: Manipulation of traits and phytopathogen resistance. **2010**. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences*, 4 (3), pp. 167-180.

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79952753149&doi=10.2174%2f187221510794751613&partnerID=40&md5=957f35d6bd227cd69d57519e69befe36>

DOI: 10.2174/187221510794751613

DOCUMENT TYPE: Article

SOURCE: Scopus

2. Burtseva S., Sirbu T., Slanina V. **2009**. Antimicrobial activity of streptomyces from soils of the central zone of Moldova. *Stiinta agricola*, 1, 20-24.