

## ПОЛУЧАВАНЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА БИОПРЕПАРАТ С АНТИБИОТИЧНО ДЕЙСТВИЕ ОТ *BACILLUS SUBTILIS* TS 01

Севдалина Тодорова

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

## OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF A BIOPREPARATION WITH ANTIBIOTIC ACTION FROM *BACILLUS SUBTILIS* TS 01

Sevdalina Todorova

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

### ABSTRACT

An exemplary technological scheme has been developed for obtaining a preparation with antibiotic action from *Bacillus subtilis* TS 01. A dried powder-like preparation with moisture of 6 %, standardized to a content of  $1.10^{11}$  cfu g<sup>-1</sup>, has been obtained. The antifungal activity of the preparation at a concentration of 0.1 % has been a 50 mm sterile zone while the antibacterial activity has been 49 mm. After two-year storage of the preparation at 20 °C the count of cfu g<sup>-1</sup> has decreased insignificantly – only by 8 % while the antibiotic activity has remained almost unchanged.

**Key words:** *Bacillus subtilis* TS 01, biopesticide, antimicrobial activity, phytopathogens

В системите на биологична и интегрирана растителна защита за борба с фитопатогенните микроорганизми и за стимулиране растежа на растенията успешно се прилагат биопестициди, получени на базата на микроби-антагонисти. Те са лесно разтворими и лесно разградими биопрепарати, безопасни от екологична гледна точка.

*Bacillus subtilis* е първият антагонист, използван с голям комерсиален успех. Има редица щамове, регистрирани като микробни биопестициди и стимулатори на растежа на растенията. Разрешени са в страни като САЩ, Англия, Германия, Австрия, ЮАР. *B. subtilis* се култивират лесно и жизнеспособността им е висока. Приготвянето им като безопасни биологични препарати под форма на живи култури не представлява трудност, те имат относително ниска себестойност, а приложението им в практически условия е лесно. Присъствието на ендоспори е предимство за много промишлени форми при биотехнологичното им получаване.

От 1983 год. (Weller, 1988) *B. subtilis* A13 се продава в САЩ като средство за лечение при фъстъци под името QUANTUM-4000 (Gustafson Inc., Dallas, Texas).

През средата на 90-те в САЩ стартира приложението на шам GB03, регистриран като KODIAK<sup>®</sup>, за инокулиране на семената на повече от седем култури на площ повече от 2 милиона ha (Kilian et al., 2000). На база този и други щамове *B. subtilis* е препаратът Companion, а на база *B. subtilis* MBI600 е търговският препарат HiStick N/T (Gardener and Fravel, 2002).

*B. subtilis* QST716 е регистриран под търговското име QST716, Serenade<sup>™</sup> (U.S.Environmental Protection Agency, 2005).

От 1999 FZB Biotechnik GmbH в Германия пуска в производство препарата FZB24<sup>®</sup> *Bacillus subtilis*, като общо укрепващо средство за растенията (ABiTEP GmbH, 2009).

Prophyta произвежда Phytovit<sup>®</sup> WG като микробиален фунгицид за борба с почвените фитопатогени ([www.prophyta.de/englisch/index1024.html?phytovit\\_04.html](http://www.prophyta.de/englisch/index1024.html?phytovit_04.html)).

В ЮАР, през 1997 г., е регистриран препаратът Avogreen за контрол на болестите по авокадо на база природния епифит *B. subtilis* (Korsten et al., 1998).

Препаратите на база *B. subtilis* се получават във вид на културална среда, филтрат от културална течност, спорова или клетъчна суспензия, прахообразен препарат, гранули или химически чист антибиотик. Изходен материал за получаване на препаратите е културалната среда. Тя е сложна многофазна система, съдържаща биомаса, метаболити, остатъци от хранителната среда. Количеството на антибиотици в нея достига до 1 %, понякога < 1 %. Съществуват различни възможности за получаване на препарати от *B. subtilis*:

- ❖ Използване на културална среда директно като препарат.
- ❖ Концентриране на културална среда във вакуумсушилни, стандартизиране до съдържание на клетки 10 % и метаболити 10 %, и използване като готов продукт.
- ❖ Получаване на прахообразен или гранулиран препарат от културална среда - културалната среда се изсушава и се прибавят инертни материали, колоиди и др. добавки, пълнители.
- ❖ Използване на биомасата – като клетъчна или спорова суспензия, прахообразен или гранулиран препарат. Биомасата се отделя чрез центрофугиране, изсушава се при температура над 60 °С, като могат да се прибавят и инградиенти.
- ❖ Използване на филтрат от културална течност (или супернатант) – може да се използва директно или след концентриране чрез вакуумизпаряване.

FZB24<sup>®</sup> *Bacillus subtilis* представлява гранулиран препарат (Junge et al., 2000). За получаването му спорите се отделят от културалната среда чрез центрофугиране и се подлагат на сушене при температура над 60 °С, заедно с инертни материали, колоиди и други добавки. Като носител на спорите на *B. subtilis*, отначало се използва кварцов пясък, а след това разтворими соли, като калиев нитрат или амониев сулфат. Получава се гранулиран продукт със съдържание на спори над  $5 \cdot 10^{10}$  кое  $g^{-1}$  и влажност около 1 %. Срокът на годност на крайната препаративна форма е не по-малко от 2 години. Приложението му е при декоративни, зеленчукови и други култури като стимулатор на растежа и като биоконтролиращ агент срещу почвени патогени.

Търговската форма KODIAK<sub>TM</sub> HB е на база щам GB03 и представлява намокрит прах със съдържание на  $6 \cdot 10^9$  жизнеспособни спори/g (Mahaffee and Backman, 1993; [www.tracechemicals.com/trace/labels/kodiakhb.pdf](http://www.tracechemicals.com/trace/labels/kodiakhb.pdf)).

От българска почва е изолиран природен, не модифициран щам *Bacillus subtilis* TS 01 и таксономично определен в проведени предишни изследвания (Todorova and Kozhuharova, 2010). Той проявява висока антибиотична активност и широк спектър на действие срещу фитопатогенни микроорганизми и е добър биоконтролиращ агент за растителна защита.

Целта на настоящата работа е получаване на препарат на база *B. subtilis* TS 01 и характеристика на антибиотичното му действие върху фитопатогенни микроорганизми.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Биоагент

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

### 2. Тест-микроорганизми

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

### 3. Определяне на антиминокробна активност

Антиминокробната активност на *B. subtilis* TS 01 е определяна по метода на дифузия в картофено декстрозен агар (КДА) с ямки (Бешков и др., 1986). Посяването на *B. cinerea* е

повърхностно с 0.1 ml суспензия. *Ps. syringae* pv. *tomato* Ro е дозирана в хранителната среда, след охлаждане до 45 – 48 °С, в съотношение 1:100. В петриевите пънички са изрязани по 4 ямки с диаметър 7 mm, като във всяка ямка са накапани по 30 µl от стерилните филтрати на *B. subtilis* TS 01. Петриевите панички са темперираны при стайна температура за 30 min, след което са термостатирани при 28 °С за три денонощия. Антимикробната активност на *B. subtilis* TS 01 е изразена с размера на стерилните зони (диаметър в mm)

#### 4. Определяне броя на микробните клетки

Използват се метод на Брид и метод на броене на микробните клетки в твърда хранителна среда (Бешков и др., 1986).

#### 5. Определяне на рН

рН се определя потенциометрично с рН-метър ТМ6.

#### 6. Определяне на влажността

Влажността се определя по тегловния метод след сушене при 105 °С до постоянна маса и се изразява в %.

### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Тъй като *B. subtilis* TS 01 няма да се използва за фармацевтични цели, не е нужно антибиотичните вещества да бъдат извлечени и пречистени. Бактерията е предназначена за приложение като биологичен агент в растениевъдството, затова е целесъобразно да се използва цялата култура. Това може да стане под форма на културална среда, спорова суспензия или изсушена културална среда във вид на прах или гранули.

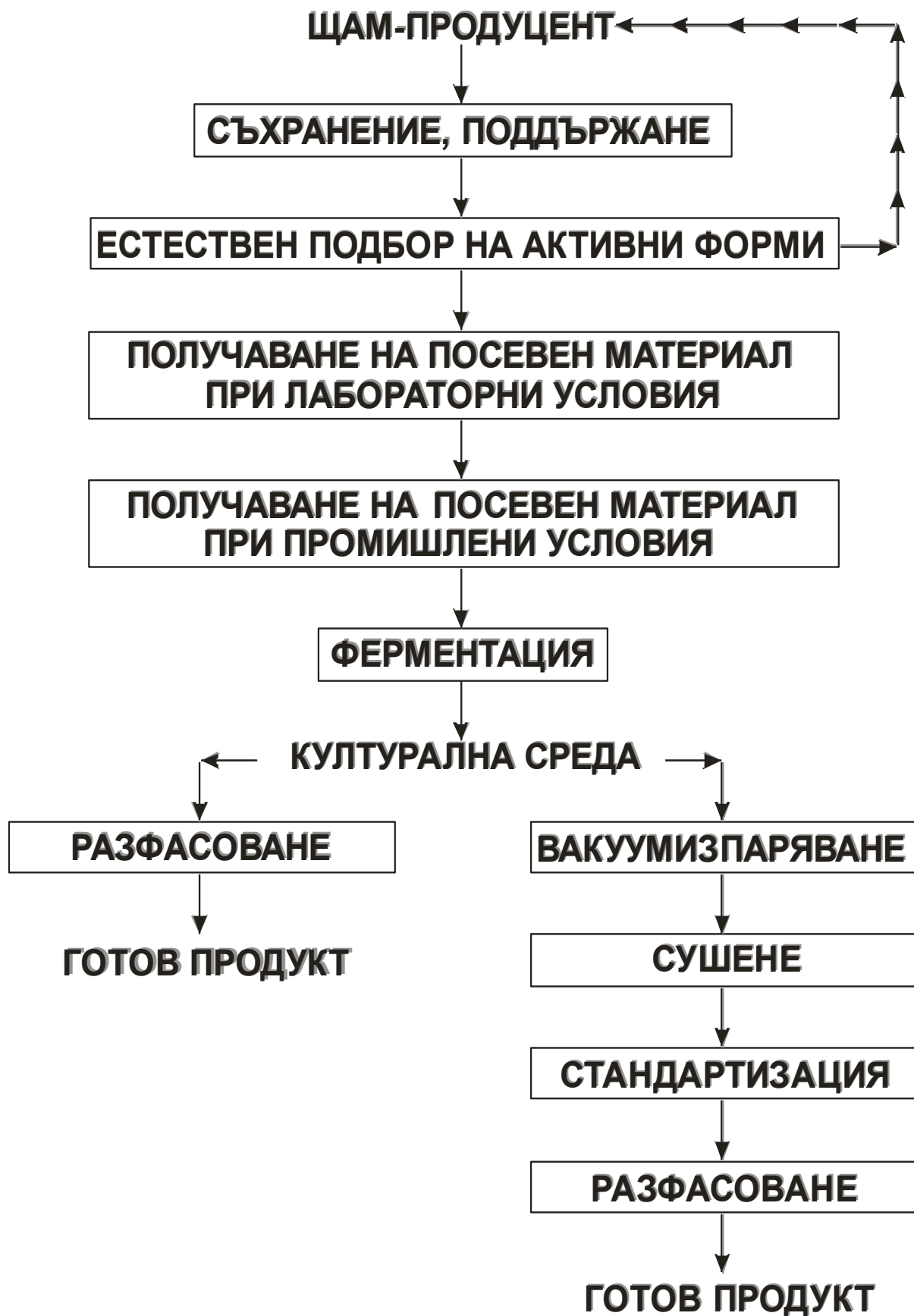
За получаването на препарат от *B. subtilis* TS 01 е разработена следната примерна технологична схема, представена на фигура 1.

Въз основа на разработената технологична схема е получен сух (прахообразен) препарат от *B. subtilis* TS 01 на база цялата културална среда. Тя представлява тъмнокафява, хетерогенна, многофазна система. Съставена е от твърда фаза, която съдържа биомаса (спори и клетки) с вътреклетъчни метаболити и неразтворими твърди остатъци от хранителната среда, и течна фаза, която съдържа антибиотични вещества и други външно клетъчни метаболити от жизнената дейност на бактерията, и не усвоими компоненти на хранителната среда. Културалната среда се концентрира 5-кратно във вакуумизпарител при 40 - 45 °С, след което се суши във вакуумсушилня при 60 °С до съдържание на влага 6 %. Полученият изсушен продукт съдържа  $8 \cdot 10^{13}$  кое  $g^{-1}$ . Стандартизира се до съдържание на  $1 \cdot 10^{11}$  кое  $g^{-1}$  чрез прибавяне на пълнител каолин. Готовият препарат е съхраняван на сухо при 20 °С в продължение на две години. Характеристиката му при получаването и след двугодишен период на съхранение е представена в таблица 1. От данните в таблицата се вижда, че броят на кое  $g^{-1}$  след две години е намалел незначително – само с 8 %, и антибиотичната активност на препарата остава почти непроменена.

Таблица 1

Характеристика на препарат от *B. subtilis* TS 01

Показател	При получаване на препарата	При съхранение 2 год.
Влажност, %	6.0	6.5
кое $g^{-1}$	$1 \cdot 10^{11}$	$9,2 \cdot 10^{10}$
Активност срещу <i>B. cinerea</i> , mm в концентрация: 0,1 % 0,01%	50.0	49.0
	49.0	48.5
Активност срещу <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Ro, mm в концентрация: 0,1 % 0,01%	49.0	49.0
	48.0	47.6



Фиг. 1 Примерна технологична схема за получаване на препарат от *B. subtilis* TS 01

## ИЗВОДИ

Въз основа на разработена технологична схема е получен сух прахообразен биопрепарат на база цялата културална среда на *B. subtilis* TS 01. Получен е изсушен прахообразен продукт с влажност 6 %, стандартизиран до съдържание на  $1.10^{11}$  кое  $g^{-1}$ . Антибиотичната активност на препарата, приложен в концентрация 0,1 и 0.01 %, остава почти непроменена след двугодишното му съхранение при 20 °C.

*B. subtilis* TS 01 се проявява като много подходящ биологичен агент и отговаря на световното търсене на антагонистични щамове *B. subtilis* за производство на екологично безопасни биологични препарати.

Полученият препарат от *B. subtilis* TS 01 е предназначен за приложение в растениевъдството, за успешна борба с причинители на редица болести по растенията. Използването му би било алтернативен или допълващ метод на химическата растителна защита.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бешков, М. Н., Е. А. Карова, И. Мургов. 1986. Ръководство за упражнения по микробиология. Земиздат, София
2. ABiTEP GmbH. 2009. [www.abitep.de](http://www.abitep.de)
3. Gardener, B. B., D. R. Fravel. 2002. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/top.html>
4. Junge, H., B. Krebs, M. Kilian. 2000. Strain Selection, Production, and Formulation of the Biological Plant Vitality Enhancing Agent FZB24<sup>®</sup> *Bacillus subtilis*. In: Pflanzenschutz Nachrichten Bayer. Bayer AG, Leverkusen, 53, 1, 94-104
5. Kilian, M., U. Steiner, B. Krebs, H. Junge, G. Schmiedeknecht, R. Hain. 2000. FZB24<sup>®</sup> *Bacillus subtilis* – Mode of Action of a Microbial Agent Enhancing Plant Vitality. In: Pflanzenschutz Nachrichten Bayer. Bayer AG, Leverkusen, 53, 1, 72-93
6. Korsten, L., E. Towsen, V. Claasens. 1998. Evaluation of Avogreen as Post-harvest Treatment for Controlling Anthracnose and Stem-end Rot on Avocado Fruit. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 21, 83-87
7. Mahaffee, W. F., P. A. Backman. 1993. Effects of Seed Factors on Spermosphere and Rhizosphere Colonization of Cotton by *Bacillus subtilis* GB03. Phytopathology. 83, 10, 1120-1125
8. Prophyta. [www.prophyta.de/englisch/index1024.html?phytovit\\_04.html](http://www.prophyta.de/englisch/index1024.html?phytovit_04.html)
9. Todorova, S., L. Kozhuharova. 2010. Characteristics and Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Soil. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 26, 7, 1207 – 1216.
10. U.S.Environmental Protection Agency. 2005. *Bacillus subtilis* Strain QST 713 (006479) Biopesticide Registration Action Document. [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/tech\\_006479.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006479.htm)
11. Weller, D. M. 1988. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26, 379-407
12. [www.tracechemicals.com/trace/labels/kodiakhb.pdf](http://www.tracechemicals.com/trace/labels/kodiakhb.pdf)