

В. М. Філімонов, студент

А. Г. Мерліч, аспірант

Н. В. Ліманська, к.б.н., доцент

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ВПЛИВ КОНСОРЦІУМА ШТАМІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА РОСТОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАРОСТКІВ САЛАТУ *LACTUCA SATIVA* L.

Вивчено вплив консорціумів штамів *L. plantarum* на проростання та ростові характеристики салату *Lactuca sativa* L. в стерильних умовах *in vitro* та за висіву у ґрунт в умовах теплиці. Стимулювальна дія лактобацил краще проявлялася у ґрунті. Усі тестовані консорціуми (*L. plantarum* ОНУ 12+991; ОНУ 12+991+311; ОНУ 12+991+311+313 у концентраціях 2 % від добових культур) та штам *L. plantarum* окремо покращували середню довжину стебел і листків салату, а середня площа листка і маса рослин збільшувалася за усіх варіантів обробок, крім консорціуму з чотирьох штамів. Найефективнішим виявився консорціум з двох штамів *L. plantarum* ОНУ 12+991: середня маса рослин з насіння, обробленого сумішшю ОНУ 12+991, збільшилася у 8,6 разів, середня площа листової пластинки – у 3,2 рази, а схожість в умовах ґрунту – на 43,3 %.

Ключові слова: схожість; морфометричні показники; молочнокислі бактерії; бактеріальні препарати; *Lactuca sativa*.

Бактерії виду *L. plantarum* широко відомі як мікроорганізми, які застосовуються для ферментації продуктів рослинного походження і створення пробіотиків, а роль їх у покращенні ростових характеристик рослин і захисту їх від фітопатогенів відома менше. Натомість застосування лактобацил може бути надзвичайно корисним для органічного землеробства, оскільки дані мікроорганізми є абсолютно безпечними для здоров'я людини і тварин. Внесення лактобацил у комбінації з іншими корисними мікроорганізмами приводить до покращення розкладання органічних речовин у ґрунті. Ростові характеристики редису, гірчиці, огірків, кукурудзи, фасолі, цибулі були збільшені завдяки більшому вмісту гумусу порівняно з такими, що росли у необробленому ґрунті [5, 8, 9]. Кількість якісних плодів з томатів, що росли у ґрунті, інокульованому сумішшю, що містила *Lactobacillus*, була на 51,8 % вищою, ніж така з ґрунту з внесеними хімічними добривами [5, 6]. Такий самий позитивний ефект лактобацил було описано для ґрунтів, заражених *Fusarium oxysporum*, і цей вплив був штамоспецифічним [4]. *Lactobacillus* з *Bacillus subtilis* і у комбінаціях з живильними розчинами позитивно впливали на ріст *Sedum* [10].

Метою роботи було вивчення впливу консорціуму штамів *L. plantarum*, виділених на півдні України, на проростання та ростові характеристики паростків салату.

Матеріали і методи дослідження

Як тест-об'єкт використовували насіння салату (*Lactuca sativa* L.) сорту „Кучерявець Одеський”. Штами *L. plantarum*, використані у цьому дослідженні, були виділені з різних джерел півдня України: *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311, *L. plantarum* ОНУ 313 – з суслу винограду сортів, які широко культивуються в Одеській області; *L. plantarum* ОНУ 991 – з кисломолочних продуктів домашнього виробництва (цій штам був люб'язно наданий к.т.н. Г. В. Ямборко). Для приготування бактеріальних інокулюмів лактобацили висівали у MRS-бульон [2] та культивували добу при 37 °С. Бактеріальні суспензії змішували у рівних об'ємах для отримання 2 % суспензії та відразу ж використовували для бактеризації насіння. У експерименті використовували одну чисту культуру ОНУ 12 та три суміші: ОНУ 12+991; ОНУ 12+991+311; ОНУ 12+991+311+313. Штами ОНУ 12 та ОНУ 991 було обрано як основу консорціуму за результатами попередніх досліджень, які вказували на високу стимулювальну активність даних штамів на томатах [7].

Концентрації лактобацил різних штамів у інокулюмах варіювали від $(2,3 \pm 0,8) \times 10^9$ до $(5,2 \pm 0,9) \times 10^9$ колонієутворювальних одиниць (КУО/мл).

Насіння стерилізували 30 сек у 25 % розчині перекису водню, а потім промиванням три рази у стерильній дистильованій воді (СДВ). Підготовлене насіння поміщали у чашки Петрі з бактеріальними суспензіями, контрольними розчинами та залишали на 1 годину при 25 ± 2 °С. У контролі насіння вимочували у СДВ та 2 % розчині живільного середовища MRS замість бактеріальних інокулюмів.

У другій схемі оброблене насіння після експозиції висівали у горщики об'єму 2,5 літрів із субстратом, які надалі були поміщені в умови теплиці (температура 23 ± 2 °С, 12-годинне освітлення). Використовували комерційний субстрат універсальний «Поліський». Попередньо субстрат не обробляли.

Проводили по три незалежних експерименти з 20–30 насінинами у кожному варіанті. Підрахунок результатів здійснювали через 7 днів для насіння, яке проростало в лабораторних умовах, і через два місяці для рослин в умовах теплиці. Враховували такі параметри: кількість листків, довжина кореня та надземної частини рослини, маса кореня та надземної частини, довжина та ширина листової пластинки [11].

Графічне оформлення результатів роботи та статистичне опрацювання проводили за допомогою програми Excel Microsoft Office 2000. Довжини коренів і пагонів були виражені як середні з 95 % конфіденційним інтервалом.

Середню помилку при альтернативній варіації розраховували за формулою [1]:

$$S_p = \sqrt{\frac{p \times q}{n}}, \text{ де } p \text{ та } q - \text{ частки альтернативних ознак, } n - \text{ вибірка.}$$

Суттєві відмінності між вимірюваннями контролю та інокульованих сіянців були виявлені у t-тесті ($P < 0,05$).

Розрахунок площі листової пластинки здійснювався за допомогою формули:

$$A = a + bLW + cW^2 + dL [11],$$

де A – площа, L – довжина, W – ширина, а маленькими буквами вказані коефіцієнти: $a = -1,636$, $b = 0,193$, $c = 0,74$, $d = 0,975$.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати експериментів, проведених у стерильних чашках Петрі в лабораторних умовах та у ґрунті в умовах теплиці відрізнялися.

Так, схожість насіння салату в стерильних умовах у чашках Петрі збільшувалась на 5,0–16,6 % за усіх варіантів обробок, крім суміші ОНУ 12+991+311+313. Найвища схожість була у насіння, обробленого сумішшю ОНУ 12+991, та складала 61,6 %, тобто збільшилася від контролю на 16,6 % (рис. 1).

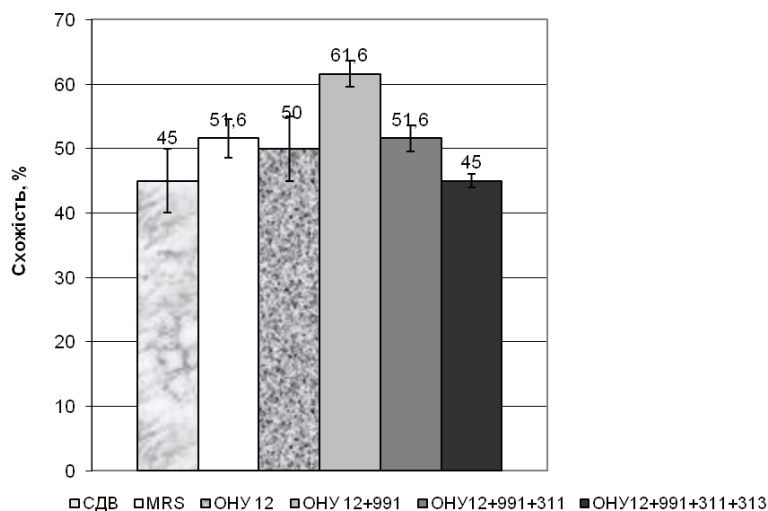


Рис. 1. Схожість насіння салату, обробленого сумішами лактобацил і пророщеного в лабораторних умовах.

Довжини коренів салату з насіння, обробленого усіма препаратами, були дещо нижчі за контроль, але відрізнялися від нього недостовірно крім сумішей ОНУ 12, ОНУ 12+ 991+311+313, котрі були достовірно нижче, ніж контроль СДВ (рис. 2).

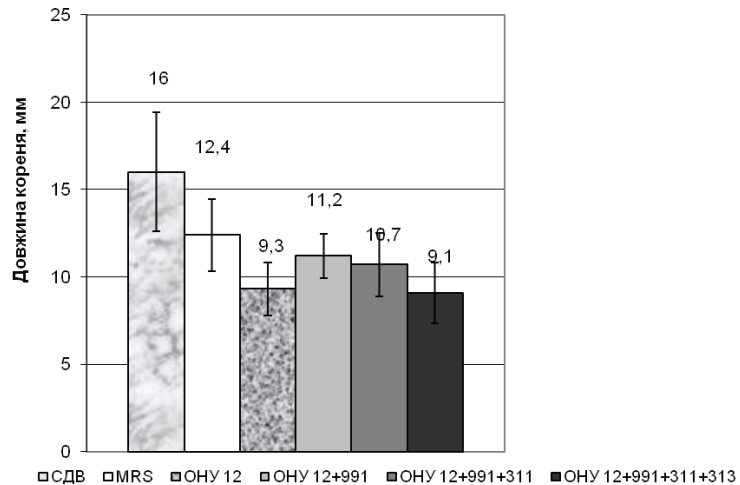


Рис. 2. Довжина коренів сіянців салату з насіння, обробленого сумішами лактобацил і пророщеного в лабораторних умовах

Goffin et al. (2010) показали зменшення коренів паростків редису після обробок культурою *L. plantarum* ОНУ 12+991 і висловили припущення про ймовірний синтез лактобацилами рослинних гормонів, надлишок яких може інгібувати розвиток коренів, адже одні й тіж самі концентрації гормонів, наприклад, ауксину, можуть стимулювати ріст пагона та пригнічувати ріст кореня. Подальші дослідження можливої продукції гормонів лактобацилами, на жаль, не проводилися [3].

Довжина стебел сіянців салату була найбільшою в групі насіння, обробленого сумішшю ОНУ 12+991+311, хоча цей показник не відрізнявся достовірно від такого у насіння, вимоченого у СДВ (рис. 3).

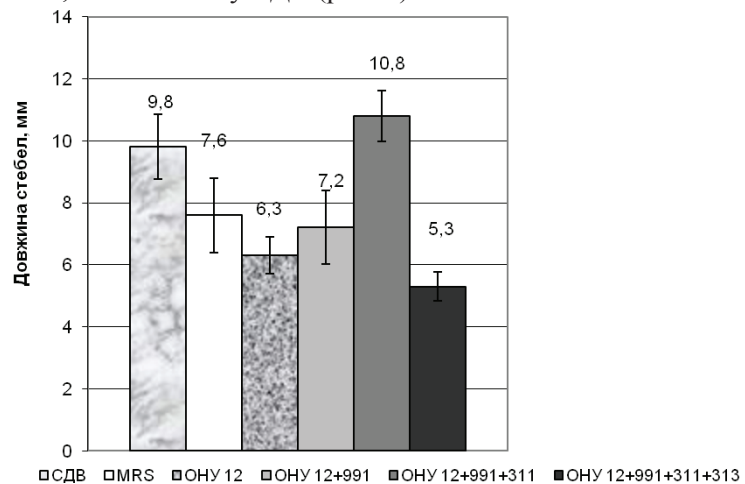


Рис. 3. Довжина стебел сіянців салату з насіння, обробленого сумішами лактобацил і пророщеного в лабораторних умовах

Стимулювальна дія штаму ОНУ 12 більш проявилася тільки на етапі проростання насіння.

Що стосується салату, то його схожість у ґрунті за обробки усіма сумішами значно підвищувалася – на 10–43,3 % (рис. 4).

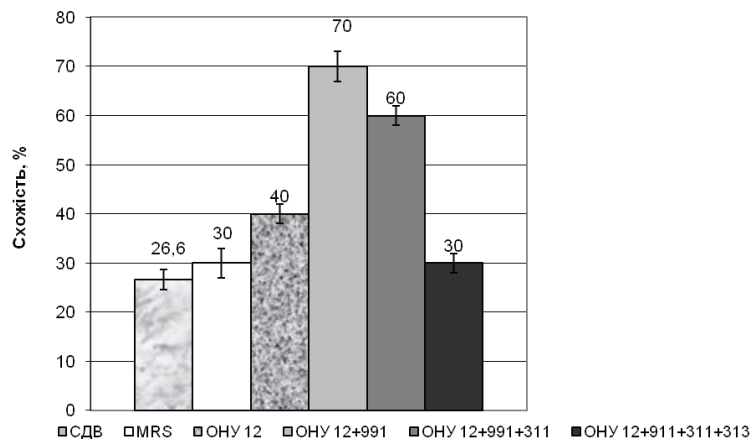


Рис. 4. Схожість насіння салату у ґрунті

Результати є особливо цінними, вважаючи на те, що первинна схожість насіння салату була дуже низькою – 26,6 %. Найкращі результати були отримані з сумішами штамів ОНУ 12+991 та ОНУ 12+991+311 (збільшення на 43,3–33,4 % відповідно). А от середня довжина кореня салату, так само, як і у випадку лабораторних дослідів у чашках Петрі, зменшувалася за обробки будь якими бактеріями та їх консорціумами (рис. 5).

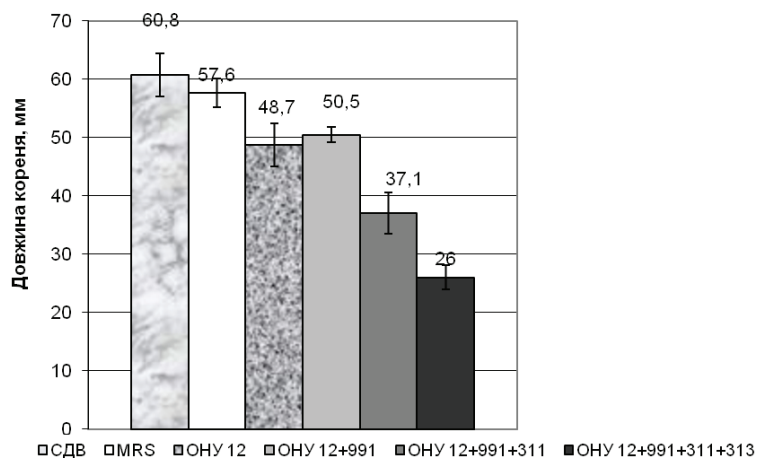


Рис. 5. Середня довжина кореня рослин салату з насіння, обробленого сумішами лактобацил і висіяного в ґрунт

Що стосується довжини та площі листків, які є основними цінними морфометричними показниками для культури салату, то вони покращувалися за обробки усіма варіантами лактобацил (рис. 6, рис. 7). Так, довжина листків разом зі стеблом збільшувалася на 23,2–48,7 % (рис. 6).

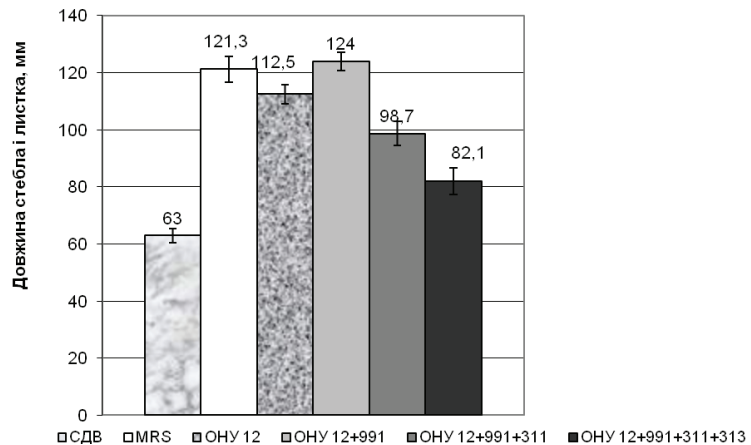


Рис. 6. Середня довжина стебел і листків салату з насіння, обробленого сумішами лактобацил і висіяного в ґрунт

Найкращий результат було отримано із сумішшю ОНУ 12+991 (збільшення на 48,7%).

У цілому по цій групі показників спостерігається тенденція, яка може свідчити про те, що корисні поживні речовини, які надходять до складу МРС, та бактерії із сумішей надають сприятливі умови для росту листя салату.

Найбільша площа листової пластинки спостерігалась за обробки сумішшю ОНУ12+991 – збільшення у 3,2 рази порівняно з контролем (рис. 7).

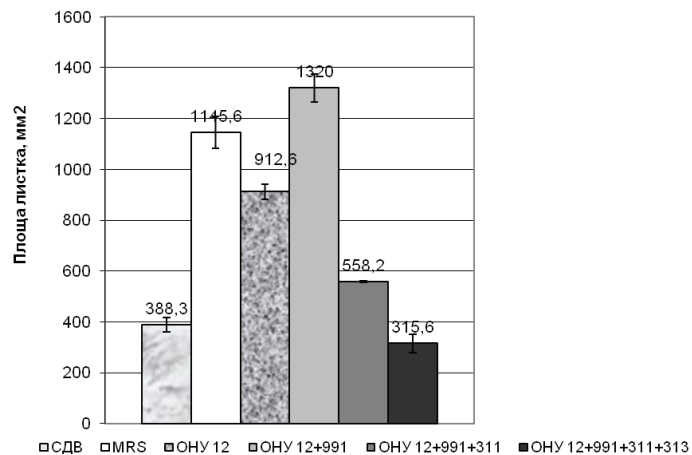


Рис. 7. Середня площа листка рослин салату з насіння, обробленого сумішами лактобацил і висіяного в ґрунт

Площу листової пластинки збільшували усі суміші лактобацил, крім консорціуму з чотирьох штамів. Ймовірно, у такому складному консорціумі починається конкурентний антагонізм між штамми, і їх корисні властивості взаємно пригнічуються.

За результатами вимірювання середньої маси найбільший стимулювальний вплив також спостерігається у рослин, оброблених сумішшю ОНУ 12+991, в яких середня маса рослин збільшилася у 8,6 разів (рис. 8).

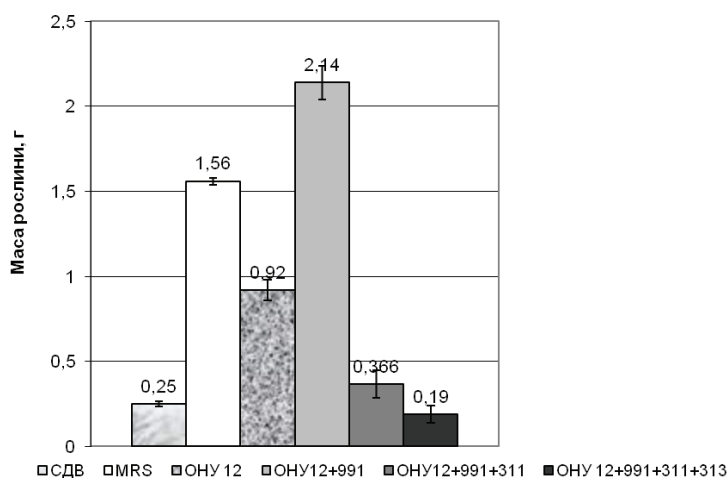


Рис. 8. Середня маса рослин салату, вирощених у ґрунті

Усі варіанти обробок лактобацилами, крім суміші з чотирьох штамів, підвищували масу рослин. За обробки лише одним штамом ОНУ 12 також спостерігалось збільшення маси паростків у 3,7 разів. Консорціум з трьох штамів збільшував масу на 44%.

Отже, найкраще позитивний вплив консорціумів *L. plantarum* було видно на рослинах, висаджених у ґрунт, і на таких показниках, як середня площа листка і середня маса паростка, тобто на найбільш важливих для даної культури показниках. У чашках Петрі результати не були такими різкими, оскільки стерильні умови не враховують впливу патогенної мікробіоти ґрунту, яка активно впливає на рослину і може інгібувати її ріст. При висадженні у ґрунт контрольне насіння, вимочене лише у воді, інфікується фітопатогенами. Обробка дослідних варіантів лактобацилами з їх відомими антагоністичними властивостями запобігає негативному впливу мікроорганізмів ґрунту. Саме тому в умовах ґрунту спостерігається більша різниця між контрольними рослинами і рослинами, що проросли з насіння, інокульованому лактобацилами.

Так само й вимочування насіння у одному з контролів – середовищі МРС, речовини якого позитивно впливають на ріст рослин, але й за висадки у ґрунт активно приваблюють ґрунтові патогени. Тому для найважливіших показників

середньої площі листка і середньої маси паростка вплив бактеріальної суміші, вирощеної в MRS, виявився кращим.

Отримані результати підтверджують дані літератури щодо стимулювального впливу лактобацил на ростові характеристики рослин [6; 10].

Висновки

1. Стимулювальна дія лактобацил проявлялася краще у ґрунті, ніж у стерильних лабораторних умовах у чашках Петрі, що свідчить про доцільність тестування активності штамів за висівах обробленого насіння безпосередньо у ґрунт, без стадії досліджень *in vitro*.

2. Найкращий вплив на схожість насіння салату проявив консорціум *L. plantarum* ОНУ 12+991 (збільшення на 43,3% у ґрунті і на 16,6% у чашках Петрі порівняно з насінням, вимоченим у воді).

3. Усі варіанти обробок лактобацилами, крім суміші з чотирьох штамів (*L. plantarum* ОНУ 12+991+311+313), підвищували середню площу листка і масу рослин, а середня довжина стебел і листків покращувалася за обробок насіння салату усіма консорціумами і окремим штамом ОНУ 12.

4. Найбільше стимулювальний вплив лактобацил проявився на таких показниках, як середня площа листка і середня маса паростка салату, тобто на найбільш важливих для даної культури показниках. Середня маса рослин з насіння, обробленого сумішшю ОНУ 12+991, збільшилася у 8,6 разів, а середня площа листової пластинки – у 3,2 рази порівняно з контролем.

Висловлюємо щиру вдячність к.т.н., доценту Г. В. Ямборко за люб'язно наданий штам *L. plantarum* ОНУ 991.

Список використаної літератури

1. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.
2. de Man J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. de Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // Journal of Applied Bacteriology. – 1960. – № 23. – P. 130-135.
3. Goffin P. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth / P. Goffin, B. De Bunt, M. Giovane, J. H. J. Leveaue, S. Hoppener-Ogawa, B. Teusink, J. Hugenholtz // Molecular Systems Biology. – 2010. – Vol. 6, № 431. doi: 10.1038/msb.2010.67.
4. Hamed H. A. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant / H. A. Hamed, Y. A. Moustafa, S. M. Abdel-Aziz // Life science J. – 2011. – Vol. 8. – P. 462–468.
5. Higa T. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation / T. Higa, S. Kinjo // Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand. – 1989. – P. 140–147.
6. Higa T. Changes in the soil microflora induced by effective microorganisms / T. Higa, G. N. Wididana // Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand – 1989. – P. 153–162.
7. Limanska N. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings / N. Limanska, T. Ivanytsia, O. Basiul, K. Krylova, V. Biscola, J.-M. Chobert, V. Ivanytsia, T. Haertle // Acta Physiologiae Plantarum. – 2013. – Vol. 35, № 5. – P. 1587–1595.
8. Panchaban S. Effect of EM on growth and yield of corn // Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand. – 1989. – P. 132–139.

9. *Primavesi A. M.* Effect of *Lactobacillus* inoculants, organic amendments and mineral elements on yield of onion and field bean // Proceedings of 4th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Paris, France. – 1995. – P. 121–128.
10. *Sadif D.* Use of *Bacillus subtilis* and a *Lactobacillus* strain in the remediation of rail tracks / D. Sadif, T. Kistner, H. Grueneberg, C. Oschmann, C. Ulrichs // Gesunde Pflanzen. – 2005. – Vol. 57. – P. 193–198.
11. *Salerno A.* Leaf area estimation of radish from simple linear measurements / A. Salerno, C. M. Rivera, Y. Roupheal, G. Colla, M. Cardarelli, F. Pierandrei, E. Rea, F. Saccardo // Adv. Hort. Sci. – 2005. – Vol. 19. – P. 213–215.

Стаття надійшла до редакції 14.04.2016

В. М. Филимонов, А. Г. Мерлич, Н. В. Лиманская

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра микробиологии, вирусологии и биотехнологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

ВЛИЯНИЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САЛАТА *LACTUCA SATIVA* L.

Резюме

Изучено влияние консорциумов штаммов *L. plantarum* на прорастание и ростовые характеристики салата *Lactuca sativa* L. в стерильных условиях *in vitro* и в почве в условиях теплицы. Стимулирующее действие лактобацилл лучше проявлялось в почве. Все протестированные консорциумы (*L. plantarum* ОНУ 12+991; ОНУ 12+991+311; ОНУ 12+991+311+313 в концентрациях 2 % от суточных культур) и штамм *L. plantarum* в отдельности увеличивали среднюю длину стеблей и листьев салата, а средняя площадь листа и масса растений увеличивалась в результате всех вариантов обработок, кроме консорциума из четырех штаммов. Наиболее эффективным выявился консорциум из двух штаммов *L. plantarum* ОНУ 12+991: средняя масса растений из семян, обработанных смесью ОНУ 12+991, увеличилась в 8,6 раз, средняя площадь листовой пластинки – в 3,2 раз, а всхожесть в условиях почвы – на 43,3 %.

Ключевые слова: всхожесть; морфометрические показатели; молочнокислые бактерии; бактериальные препараты; *Lactuca sativa*.

V. M. Filimonov, A. G. Merlich, N.V. Limanska

Odesa National Mechnykov University, Department of Microbiology, Virology and Biotechnology,
2, Dvorianska str., Odesa 65082, Ukraine

EFFECT OF CONSORTIA OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* STRAINS ON GROWTH CHARACTERISTICS OF *LACTUCA SATIVA* L. SEEDLINGS

Abstract

Being absolutely safe for human and animal health, bacteria of *Lactobacillus* genus are the perspective agents for biological control and plant growth stimulation in organic agriculture. The **aim** of the investigation was to study the effect of consortia

of *L. plantarum* strains on germination and growth characteristics of lettuce *Lactuca sativa* L. **Materials and methods.** Germination and growth characteristics were studied under sterile conditions *in vitro* and in soil in a greenhouse. 2% of overnight cultures of lactobacilli mixed in equal proportions were used. Seeds were treated with bacterial suspensions for one hour. **Results.** In soil lactobacilli exhibited better stimulation activity than under the laboratory conditions in Petri dishes. All the tested consortia (*L. plantarum* ONU 12+991; ONU 12+991+311; ONU 12+991+311+313) and the strain *L. plantarum* ONU 12 separately increased the mean lengths of lettuce stems and leaves. The mean leaf area and weight of the plants were improved by all variants of the treatments except the consortium from the four strains. **Conclusion.** The most effective was the consortium from the two strains – *L. plantarum* ONU 12+991: the mean lengths of the plants germinated from the seeds treated with the mixture ONU 12+991 increased 8.6 times, mean leaf area – 3.2 times, and germination under soil conditions increased by 43.3%.

Key words: germination; morphometric characteristics; lactic acid bacteria; bacterial preparations

References

1. Rokitski PF (1973) Biological Statistics [Biologicheskaiia statistika], Minsk: Vesheishaia shkola, 320 p.
2. de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) "A medium for the cultivation of lactobacilli", Journal of Applied Bacteriology, No 23, pp 130-135.
3. Goffin P, de Bunt B, Giovane M, Leveaue JHI, Hoppener-Ogawa S, Teusink B, Hugenholtz J (2010) "Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth", Molecular Systems Biology, No 6, 431. doi: 10.1038/msb.2010.67.
4. Hamed HA, Moustafa YA, Abdel-Aziz SM (2011) "In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant", Life science J., No 8, pp 462–468.
5. Higa T, Kinjo S (1989) "Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation", Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand. P. 140–147.
6. Higa T, Wididana GN (1989) "Changes in the soil microflora induced by effective microorganisms", Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand. P. 153–162.
7. Limanska, Ivanytsia T, Basiul O, Krylova K, Biscola V, Chobert J.-M, Ivanytsia V, Haertle T (2013) "Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings", Acta Physiologiae Plantarum, Vol. 35, No 5, pp 1587-1595.
8. Panchaban S (1989) "Effect of EM on growth and yield of corn", Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand. P. 132–139.
9. Primavesi AM (1995) "Effect of *Lactobacillus* inoculants, organic amendments and mineral elements on yield of onion and field bean", Proceedings of 4th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Paris, France. P. 121 –128.
10. Sadif D, Kistner T, Grueneberg H, Oschmann C, Ulrichs C (2005) "Use of *Bacillus subtilis* and a *Lactobacillus* strain in the remediation of rail tracks", Gesunde Pflanzen, Vol 57, pp 193–198.
11. Salerno A, Rivera CM, Roupheal Y, Colla G, Cardarelli M, Pierandrei F, Rea E, Saccardo F. (2005) "Leaf area estimation of radish from simple linear measurements", Adv. Hort. Sci., No 19, pp 213–215.