

**УДК 579.64:581.14(635.63)**

## **ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

*Ржевская В.С., Отурина И.П., Теплицкая Л.М.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: viktoriyar45@mail.ru*

Изучены морфолого-культуральные и некоторые физиолого-биохимические свойства выделенных из природных источников штаммов молочнокислых бактерий, обладающих антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, высокой ферментативной активностью, устойчивостью к агрессивным факторам среды. Исследовано влияние молочнокислых бактерий на прорастание семян и скорость роста огурцов сортов Конкурент и Феникс. Показано, что эффективность стимуляции ростовых процессов под влиянием молочнокислых бактерий зависит как от биологических особенностей и концентрации бактериальной культуры, так и от специфических характеристик сортов исследуемых растений.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, огурцы, прорастание семян, ростовые процессы.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Проявление положительного влияния микроорганизмов на жизнедеятельность растений различно [1 – 3]. В практике выращивания сельскохозяйственных растений накоплен большой материал, убедительно подтверждающий эффективность использования различных микроорганизмов, в частности, ризосферных азотфиксирующих [4, 5] и фосфатмобилизующих бактерий [6] для стимуляции роста и развития растений [7 – 11]. Менее изучена в этом направлении группа разнообразных молочнокислых бактерий [12 – 14], одной из сред обитания которых является почва и ризосфера растений.

Молочнокислые бактерии синтезируют разнообразные биологически активные вещества: органические кислоты, этанол, углекислоту, ферменты. Характерное свойство молочнокислых бактерий – их способность продуцировать вещества с антибиотической активностью [15 – 20], что позволяет им проявлять выраженный антагонизм в отношении различных микроорганизмов, в том числе и фитопатогенных. В настоящее время одним из перспективных и востребованных направлений в сельскохозяйственной микробиологии является скрининг штаммов молочнокислых бактерий, обладающих как антифунгальным, так и фитостимулирующим свойствами. Такие штаммы – основа эффективных и экологически безопасных микробиологических препаратов, которые могут быть использованы для защиты растений и стимуляции процессов их жизнедеятельности.

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилось изучение некоторых физиолого-биохимических и ростстимулирующих свойств штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из природной среды обитания.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили штаммы молочнокислых стрептобацилл *Lactobacillus casei* 6 и *Lactobacillus plantarum* 20, а также стрептококков *Lactococcus lactis* 4/6. Выделение, идентификацию и изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий проводили по стандартным методикам [12, 21]. Штаммы стрептобактерий *L. casei* 6, *L. plantarum* 20 выращивали на питательной среде MRS, штамм стрептококка *L. lactis* 4/6 – на среде S [12]. Чистые культуры микроорганизмов имели титр  $1 \times 10^7$  КОЕ, из которого готовили три разведения – 1:100, 1:200 и 1:1000.

В качестве тест-объектов служили семена огурцов (*Cucumis sativus* L.) сортов Конкурент и Феникс, которые проращивали в кюветах, содержащих жидкие культуры микроорганизмов в указанных разведениях при температуре 25 °С. В контрольном варианте семена проращивались на отстоянной водопроводной воде. Энергию прорастания семян определяли на 3-и сутки, всхожесть – на 7-е сутки с момента замачивания семян [22].

Исследование влияния молочнокислых бактерий на рост огурцов проводилось при выращивании растений в условиях лабораторно-вегетационного опыта в водной культуре. При анализе величин морфометрических показателей длину корня и побега в контрольном варианте принимали за 100 %.

Полученные результаты статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ *Microsoft Office*.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *Lactobacillus plantarum* 20 выделен из силосного зерна. Морфологически – это тонкие длинные неподвижные одиночные или парные неспорообразующие грамположительные палочки. *L. plantarum* 20 на твердых питательных средах образует круглые колонии белого цвета. Профиль колоний выпуклый, край волнистый. По штриху рост умеренный, видна цепь изолированных колоний. В жидких питательных средах образуют однородную суспензию.

Штамм *Lactobacillus casei* 6 выделен из самоквасных домашних кисломолочных продуктов. Морфологически – это короткие толстые неподвижные неспорообразующие грамположительные палочки, собранные в короткие цепочки. *L. casei* 6 на твердых питательных средах образует круглые полупрозрачные колонии белого цвета. Профиль колоний выпуклый, край ровный. По штриху рост умеренный, видна цепь изолированных колоний. В жидких питательных средах образуют однородную суспензию.

Штамм *Lactococcus lactis* 4/6 изолирован из эпифитной сферы растений. Морфологически – это неспорообразующие, неподвижные, грамположительные слегка овальные кокки, расположенные парами или в коротких цепочках по 4-6 клеток. *L. lactis* 4/6 на твердых питательных средах образует круглые точечные

колонии, белого цвета. Колонии плоские, гладкие, полупрозрачные, край ровный. По штриху рост умеренный, видна цепь изолированных колоний. В жидких питательных средах образуют однородную суспензию.

Метаболизм молочнокислых стрептобактерий *Lactobacillus plantarum 20* и *Lactobacillus casei 6* бродильный, но они могут расти и в присутствии кислорода (факультативные анаэробы). Исследуемые штаммы рода *Lactobacillus* являются гомоферментативными, способны к росту в средах с углеродсодержащими соединениями, что может положительно сказываться на их интеграции с растением и совместном функционировании в системе бактерии – растение – фитопатогены [23]. *L. casei 6* сбраживает фруктозу, мальтозу, глюкозу, галактозу, манит, сорбит, маннозу, сахарозу; не сбраживает арабинозу, рамнозу, рафинозу, ксилозу. *L. plantarum 20* сбраживает фруктозу, галактозу, глюкозу, маннозу, сорбит, маннит, рафинозу, сахарозу, лактозу, мальтозу. Арабинозу и рамнозу *L. plantarum 20* не сбраживает.

Изучение влияния на исследуемые молочнокислые бактерии фенола, желчи, хлористого натрия и этилового спирта показало, что исследуемые штаммы способны противостоять химически агрессивным факторам среды (табл. 1).

**Таблица 1**

**Устойчивость молочнокислых бактерий к химически агрессивным факторам среды**

Фактор среды	Штаммы молочнокислых бактерий		
	<i>L. casei 6</i>	<i>L. plantarum 20</i>	<i>L. lactis 4/6</i>
	Концентрация в среде культивирования, %		
фенол	0,4	0,4	0,2
желчь	50	50	40
хлорид натрия	16	16	6
этанол	34	28	30

Как следует из данных табл. 1, бактерии рода *Lactobacillus* продолжали расти в присутствии 0,4 %-ной концентрации фенолов в среде культивирования. *L. lactis 4/6* проявил меньшую фенолоустойчивость – максимальная концентрация фенолов, при которой наблюдался рост данного штамма, составила всего 0,2 %. У штаммов лактобацилл отмечена и более высокая желчеустойчивость, они росли при 50 %-ной концентрации желчи в среде, а стрептококк – лишь при 40 %. Исследуемые молочнокислые бактерии были достаточно спиртоустойчивыми: штамм *L. lactis 4/6* выдерживал 30 %-ную концентрацию этанола в среде, *L. plantarum 20* – 28 %. Самую высокую степень спиртоустойчивость проявил штамм *L. casei 6* – его рост продолжался при 34 %-ной концентрации этилового спирта в среде культивирования. Бактерии рода *Lactobacillus* оказались и достаточно солеустойчивыми: рост клеток наблюдался при 16 % натрия хлористого в среде культивирования, стрептококк развивался при более низкой концентрации поваренной соли – 6 %.

Таким образом, изученные физиолого-биохимические свойства (достаточно высокая степень феноло- спирто- желчеустойчивости) является доказательством приспособленности изучаемых микроорганизмов к агрессивным химическим факторам среды. Высокая степень солеустойчивости свидетельствует о том, что исследуемые штаммы молочнокислых бактерий можно использовать даже на засоленных почвах.

Для детальной характеристики особенностей метаболизма исследуемых штаммов молочнокислых бактерий изучалась степень их ферментативной активности (табл. 2).

**Таблица 2**

**Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий**

Физиолого-биохимические свойства	Штаммы молочнокислых бактерий		
	<i>L. casei</i> 6	<i>L. plantarum</i> 20	<i>L. lactis</i> 4/6
амилолитическая активность	–	–	+
липолитическая активность	+	+	+
протеолитическая активность	+	+	–
выделение аминокислот	валин	лейцин	лейцин, валин, глутаминовая кислота

У микроорганизмов выделенных штаммов обнаружен разный уровень протеолитической активности, проявляющийся в гидролизе белков на олиго- и полипептиды. Исследования показали, что молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* расщепляли казеин: зона гидролиза у штамма *L. plantarum* 20 составила 5 мм, у *L. casei* 6 – 4 мм, у штамма *L. lactis* 4/6 протеолиз отсутствовал. У обоих штаммов лактобацилл амилолитическая активность не выявлена, у штамма *L. lactis* 4/6 зона гидролиза крахмала составила  $6,0 \pm 0,2$  мм. У всех исследованных штаммов молочнокислых бактерий выявлена слабая липолитическая активность.

Достаточно высокий уровень метаболической активности выявлен у штамма *L. lactis* 4/6. Проведенный хроматографический анализ показал, что эти бактерии выделяли в среду культивирования наибольшее количество свободных аминокислот (лейцин, валин, глутаминовая кислота).

Все исследуемые штаммы сбраживали обезжиренное молоко с образованием гомогенного сгустка. Посевы в молоко позволили выявить у изучаемых бактерий разную степень кислотообразования. Титруемая кислотность у *L. lactis* 4/6 составила 72 °Т, у *L. plantarum* 20 – 55 °Т, у *L. casei* 6 – 90 °Т. Все исследуемые штаммы створаживали молоко с метиленовой синью и восстанавливали лакмусовое молоко.

Рост штамма *L. plantarum* 20 наблюдался при значениях рН 4,0 – 9,0, штамма *L. casei* 6 – при рН 4,0 – 7,0, штамма *L. lactis* 4/6 – при 6,0 – 8,0. Штамм *Lactococcus lactis* 4/6 на кровяном агаре не вызывал гемолиз крови.

Изучение степени антибиотикорезистентности молочнокислых бактерий представляется особенно интересным, поскольку в настоящее время в качестве почвенных органических удобрений вносят птичий помет и навоз крупного рогатого скота, которые содержат антибиотики, подавляющие развитие почвенной микрофлоры или микроорганизмов, входящие в состав биопрепаратов. Степень чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам, наиболее часто используемым в ветеринарии, определяли дискодиффузным методом, измеряя диаметры зон задержки роста (ДЗЗР).

Молочнокислые бактерии *L. casei* 6 и *L. plantarum* 20 были наименее чувствительны к действию офлоксацина. По отношению к тетрациклину, спирамицину, тилозину все исследуемые штаммы молочнокислых бактерий проявляли высокую чувствительность. Штамм *L. lactis* 4/6 оказался более устойчивым к антибиотикам, особенно к спирамицину, проявляя умеренную чувствительность к офлоксацину, тетрациклину и тилозину (табл. 3).

Таблица 3

**Антибиотикочувствительность молочнокислых бактерий**

Антибиотики	ДЗЗР, мм		
	<i>L. casei</i> 6	<i>L. plantarum</i> 20	<i>L. lactis</i> 4/6
офлоксацин	16,0 ± 0,8	20,0 ± 1,0	22,0 ± 0,9
тетрациклин	30,0 ± 1,0	36,0 ± 0,9	22,0 ± 1,1
спиромицин	38,0 ± 0,8	50,0 ± 0,9	17,0 ± 1,0
тилозин	40,0 ± 0,8	41,5 ± 1,5	20,0 ± 1,0

Характерной особенностью молочнокислых бактерий является подавление роста условно-патогенных бактерий, плесневых, фитопатогенных и токсинообразующих грибов.

В ходе проведенных экспериментов установлено, что исследованные штаммы молочнокислых бактерий проявляли высокую антагонистическую активность по отношению к санитарно-значимым кишечным микроорганизмам (*Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Salmonella typhimurium*), образуя зоны подавления роста тест-культур диаметром более 20 мм (табл. 4).

У штамма *L. casei* 6 выявлена слабая фунгицидная активность по отношению к таким микромицетам, как *Aspergillus candidus*, *A. fischeri* и *A. alternata*. Эти бактерии не подавляли рост *A. flavus* и *Fusarium moniliforme*, но обладали высокой антагонистической активностью по отношению к *A. pulvinus*, *F. sulphureum* и *Scopulariopsis brevicaulis*.

Штамм *L. plantarum* 20 не подавлял рост всех изученных фитопатогенных грибов, а также плесневых грибов *A. candidus*, *A. flavus*; слабая антагонистическая активность проявилась лишь по отношению к *A. fischeri*. Высокая фунгицидная активность *L. plantarum* 20 выявлена по отношению к *A. pulvinus* и *S. brevicaulis*.

Штамм *L. lactis* 4/6 обладал высокой фунгицидной активностью лишь по отношению к *S. brevicaulis*, рост других фитопатогенных грибов он подавлял слабо.

Таким образом, бактерии исследуемых штаммов обладали определенным уровнем фунгицидной и бактерицидной активности, что свидетельствует об их выраженных антагонистических свойствах по отношению к наиболее распространенным фитопатогенам.

Таблица 4

Антагонистическая активность молочнокислых бактерий

Тест - культуры		ДЗЗР, мм		
группа микроорганизмов	виды микроорганизмов	<i>L. casei</i> 6	<i>L. plantarum</i> 20	<i>L. lactis</i> 4/6
штаммы санитарно-значимых кишечных микроорганизмов	<i>S. aureus</i>	24,0 ± 0,4	25,6 ± 0,5	24,0 ± 0,5
	<i>P. vulgaris</i>	20,9 ± 0,5	38,5 ± 0,7	30,6 ± 0,4
	<i>E. coli</i>	28,0 ± 0,7	30,0 ± 0,6	32,0 ± 0,9
	<i>P. aerogenosa</i>	30,0 ± 0,6	28,5 ± 0,5	30,0 ± 0,5
	<i>S. typhimurium</i>	25,0 ± 0,4	25,8 ± 0,5	28,0 ± 0,6
плесневые грибы	<i>A. candidus</i>	15,0 ± 0,5	0	0
	<i>A. flavus</i>	0	0	0
	<i>A. pulvinus</i>	25,0 ± 1,0	23,0 ± 1,0	0
	<i>A. fischeri</i>	15,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0	0
фитопатогенные грибы	<i>F. moniliforme</i>	0	0	17,0 ± 1,0
	<i>F. sulphureum</i>	20,0 ± 2,5	0	18,0 ± 1,0
	<i>A. alternata</i>	15,0 ± 2,0	0	16,0 ± 2,0
токсикообразующие грибы	<i>S. brevicaulis</i>	23,0 ± 1,0	22,0 ± 1,0	24,0 ± 1,0

Как правило, проявление протекторных свойств метаболитов бактериальной природы часто коррелирует с их положительным воздействием на ростовые процессы.

Важность этого критерия при выборе микроорганизмов обусловлена тем, что фитостимулирующие микроорганизмы, продуцируя и выделяя экзометаболиты (ферменты, витамины, аминокислоты, витамины и другие важные биологически активные вещества) обеспечивают более высокий процент и более высокую скорость прорастания семян растений [11, 14], от чего во многом зависит направленность дальнейших процессов развития проростков.

В экспериментах по определению влияния микроорганизмов на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов использованы разные разведения каждого исследуемого штамма молочнокислых бактерий, поскольку метаболиты микроорганизмов, в зависимости от их концентрации, могут как ингибировать, так и стимулировать ростовые процессы.

Результаты проведенных экспериментов показали, что исследуемые штаммы микроорганизмов не оказали существенного влияния на прорастание семян огурцов сорта Конкурент (рис. 1).

Так, в контрольном варианте величина энергии прорастания семян огурцов сорта Конкурент практически полностью совпала с показателем всхожести (96 – 100 %), что свидетельствует о высоком ростовом потенциале семян данного сорта (рис. 1). У сорта Феникс в контрольном варианте значения энергии прорастания составили 36–56 %, всхожести – 38–62 % (рис. 2), что свидетельствует о более низком ростовом потенциале семян данного сорта. Штамм *L. casei* б не оказал существенного влияния на энергию прорастания и всхожесть семян данного сорта.

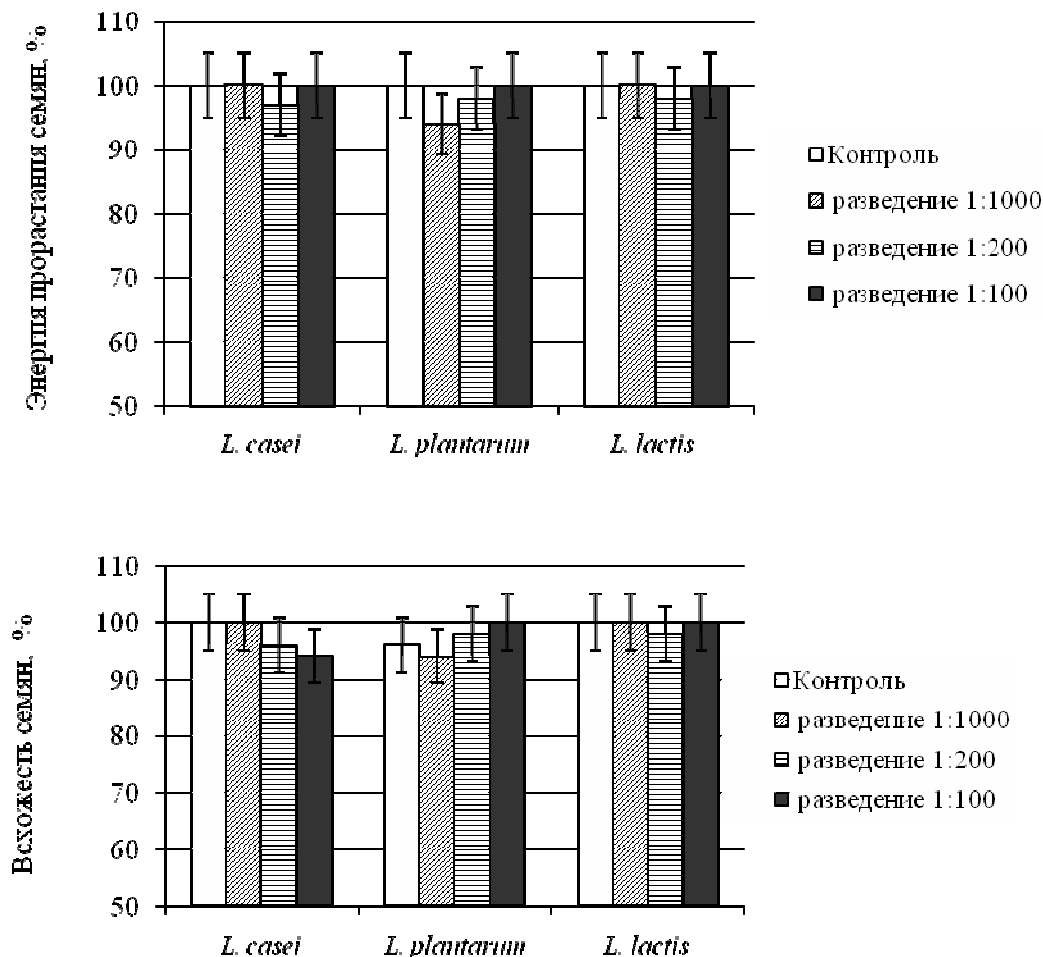


Рис. 1. Влияние штаммов молочнокислых бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов сорта Конкурент

При изучении влияния штамма *L. plantarum* 20 на прорастание семян у сорта Феникс установлено, что в контрольном варианте всхожесть семян составила 54 %,

в присутствии различных разведений культуры данного микроорганизма значения исследуемого показателя возросли до 59 %.

Таким образом, бактерии штамма *L. plantarum* 20 увеличили всхожесть семян сорта Феникс в среднем на 5 % по сравнению с контролем (рис. 2).

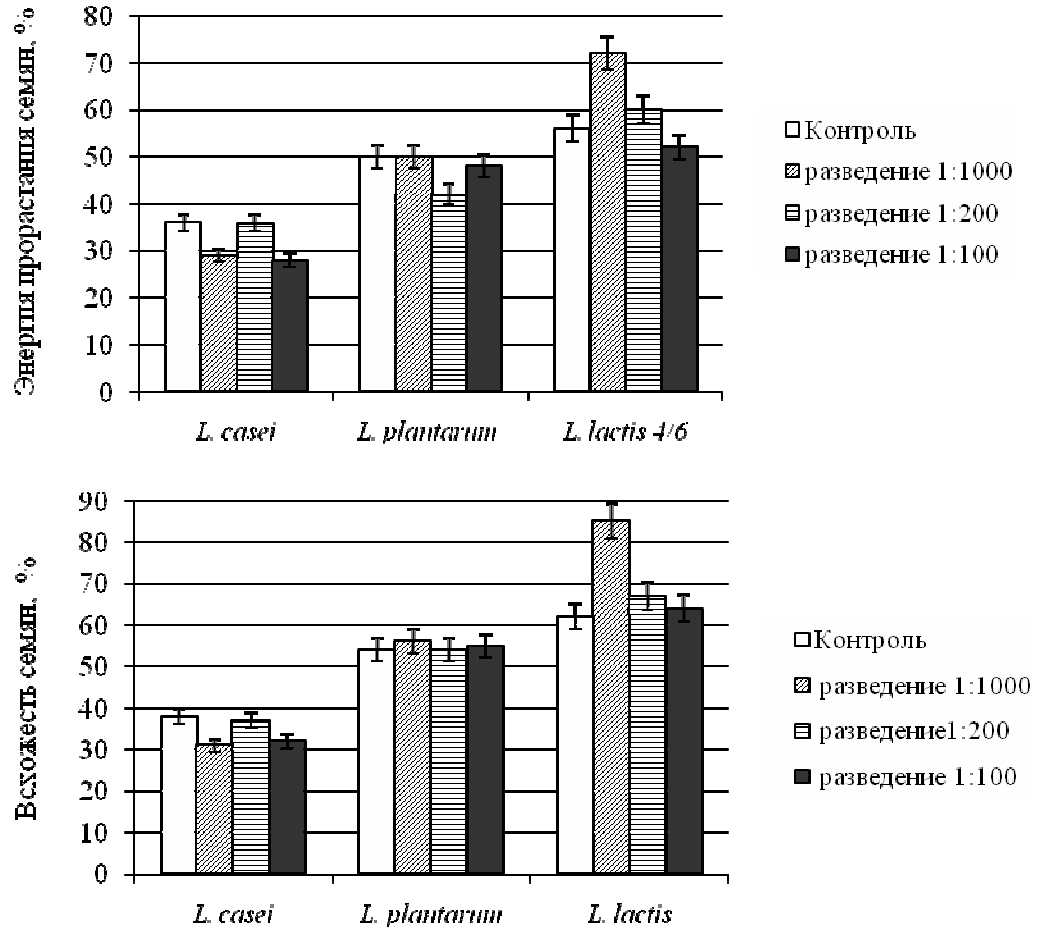


Рис. 2. Влияние штаммов молочнокислых бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов сорта Феникс

При проращивании семян сорта Феникс в различных разведениях штамма *L. lactis 4/6* в контрольном варианте энергия прорастания составила 56 %, всхожесть – 62 %, в разведении 1:1000 – 72 % и 85 % соответственно.

Таким образом, штамм *L. lactis 4/6* увеличил энергию прорастания семян сорта Феникс на 16 %, всхожесть – на 13 % по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

В результате изучения влияния штаммов молочнокислых бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов установлено, что исследованные



микроорганизмы оказывают положительное воздействие в большей степени на всхожесть, чем на энергию прорастания (рис. 2). При сравнении эффективности штаммов молочнокислых бактерий между собой установлено, что наибольшее увеличение энергии прорастания и всхожести как у сорта Феникс, так и у сорта Конкурент вызывал штамм *L. lactis* 4/6. Бактерии *L. plantarum* 20 увеличили всхожесть семян сорта Феникс на 5 % по сравнению с контролем, не изменяя при этом величину энергии прорастания. Штамм *L. casei* 6 не оказал существенного влияния ни на энергию прорастания, ни на всхожесть семян огурцов обоих исследованных сортов.

Изучение морфометрических показателей проростков на ранних этапах онтогенеза при выращивании их в водной культуре с добавлением культур лактобактерий показало, что исследуемые микроорганизмы оказывают положительное влияние на ростовые процессы огурцов сортов Конкурент (рис. 3) и Феникс (рис. 4).

Как следует из данных рис. 3, штамм *L. casei* 6 в разведениях 1:200 и 1:1000 увеличивал длину корневой системы проростков сорта Конкурент на 1,4 % и 8,0 % соответственно по сравнению с контролем. Разведение штамма *L. casei* 6 1:100 не оказывало воздействия на длину корневой системы (рис. 3).

Наибольшее увеличение высоты растений отмечено при разведении штамма *L. casei* 6 1:100 и 1:200 – данный показатель возрос по сравнению с контролем на 19,4 % и 20,0 % соответственно (рис. 3). Разведение штамма *L. casei* 6 1:1000 стимулировало рост побега в меньшей степени: он был лишь на 7,2 % больше контроля. Таким образом, штамм *L. casei* 6 в малых разведениях стимулировал скорость роста сеянцев сорта Конкурент в большей степени, чем корня, в больших разведениях происходило равномерное увеличение как надземных, так и подземных органов растений.

Штамм *L. plantarum* 20 активировал рост корневой системы сеянцев сорта Конкурент (рис. 3) в разведении 1:1000, 1:200 и 1:100: длина корней была больше контрольных значений на 2,8 %, 9,7% и 19,4 % соответственно. В воздействии штамма *L. plantarum* 20 на рост побега наблюдалась противоположная зависимость: разведение 1:1000 вызывало увеличение высоты растений на 37,7 %, а разведение 1:200 – на 16,3 % по сравнению с контролем (рис. 3), разведение 1:100 не оказало стимулирующего эффекта. Таким образом, штамм *L. plantarum* 20 в малых разведениях стимулировал рост корневой системы проростков сорта Конкурент, в больших разведениях – побега.

Разведение штамма *L. lactis* 4/6 1:1000 не оказало воздействия на рост корневой системы (рис. 3) растений огурца сорта Конкурент, а разведение 1:200 увеличило высоту сеянцев на 4,8 % по сравнению с контролем. Разведения 1:1000 и 1:200 стимулировали рост побега (рис. 3): его высота была больше, чем в контрольном варианте на 9,6 % и 21,0 % соответственно. Разведение 1:100 ингибировало ростовые процессы как корневой системы, так и побега, их длина была меньше, чем в контроле, на 6,4 и 1,7 % соответственно. Таким образом, низкие разведения штамма *L. lactis* 4/6 способны задерживать ростовые процессы сеянцев огурца сорта Конкурент.

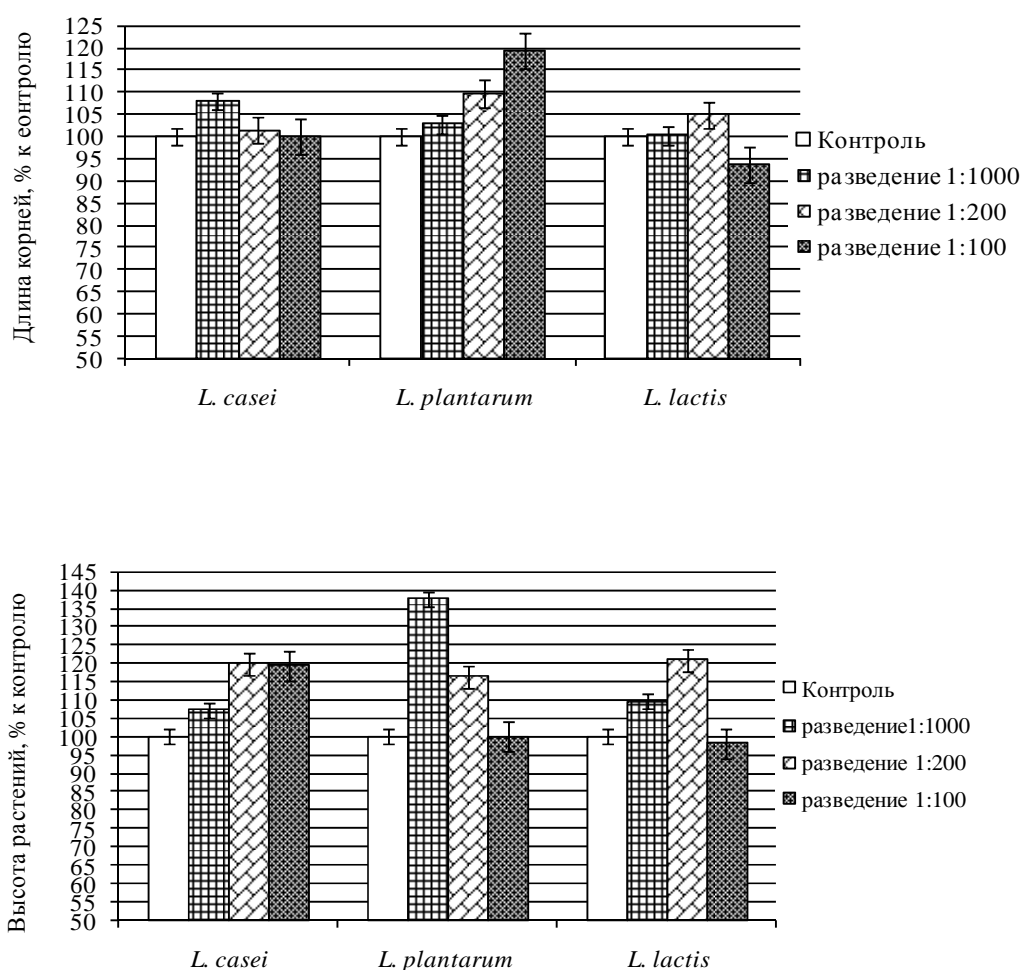


Рис. 3. Влияние молочнокислых бактерий на морфометрические показатели 7-дневных проростков растений огурца сорта Конкурент, выращенных в водной культуре

Как следует из данных рис. 4, штамм *L. casei* б в разведениях 1:1000, 1:200 и 1:100 стимулировал рост корневой системы огурцов сорта Феникс: длина корня была на 8,4, 24,0 и 13,6 % соответственно больше, чем в контроле. Рост побега при использовании разведений штамма *L. casei* б 1:100 и 1:200 также ускорился: высота растений на 22,2 и 53,1 % превышала контрольные значения. Таким образом, штамм *L. casei* б в небольших разведениях стимулировал развитие как корневой системы, так и побега.

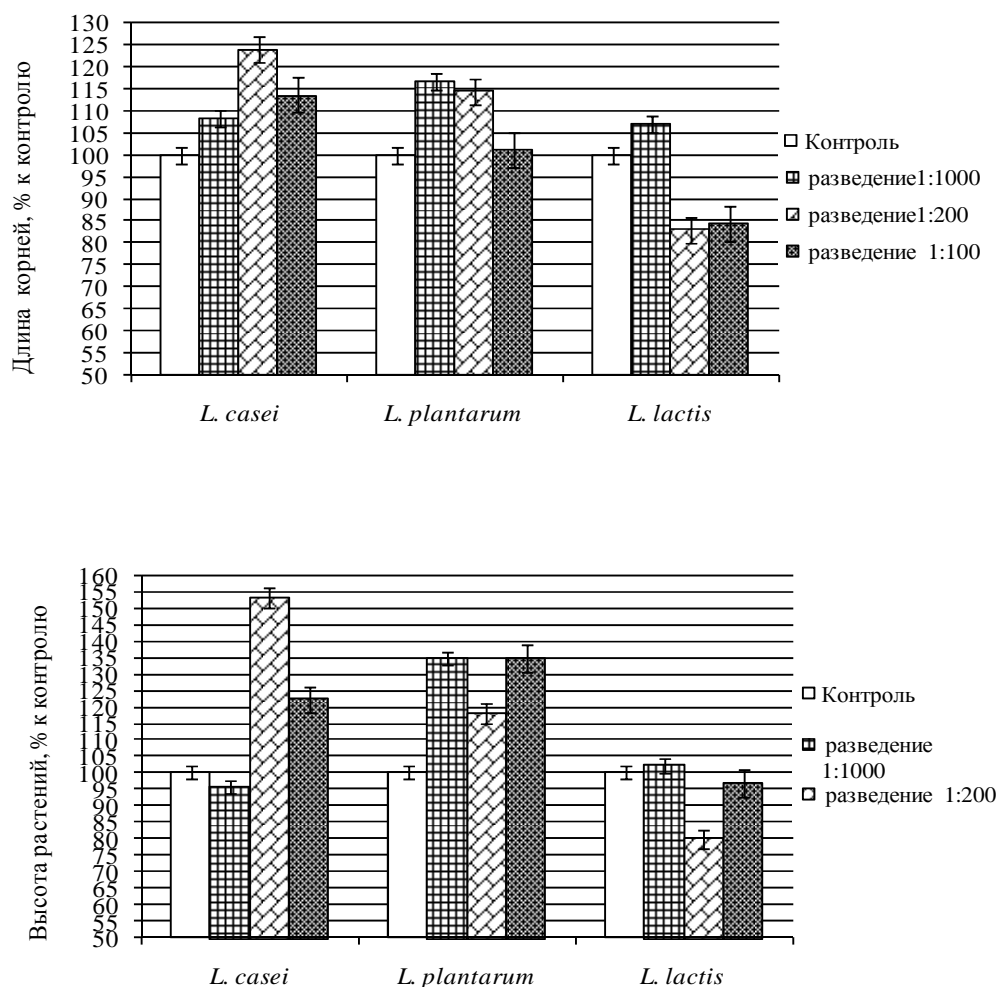


Рис. 4. Влияние молочнокислых бактерий на морфометрические показатели 7-дневных проростков растений огурца сорта Феникс, выращенных в водной культуре

Штамм *L. plantarum* 20 стимулировал рост корней сеянцев огурцов сорта Феникс в разведениях 1:100, 1:200 и 1:1000: длина корней была выше, чем в контроле на 1,2, 14,7 и 16,7 % соответственно. Высота побега под влиянием бактерий штамма *L. plantarum* 20 при разведениях 1:100, 1:200 и 1:1000 была соответственно на 34,8, 18,0 и 34,7 % выше. Таким образом, штамм *L. plantarum* 20 в больших разведениях стимулировал рост и корневой системы, и надземных побегов сеянцев огурцов сорта Феникс.

Разведения штамма *L. lactis* 4/6 1:100 и 1:200 ингибировали рост побегов: растения были ниже, чем в контроле, на 3,1 и 20,2 % соответственно.

Следовательно, морфогенетические ответные реакции растений, особенно на ранних этапах их развития, вызванные присутствием микроорганизмов в среде выращивания, не всегда однозначны: в отдельных случаях наблюдается либо значительная стимуляция, либо угнетение роста надземных побегов по сравнению с контролем, что, вероятно, связано с синтезом эндогенных биологически активных веществ, в том числе и фитогормонов, и нарушением баланса эндо- и экзогенных стимуляторов роста в водной культуре.

Таким образом, анализ результатов экспериментальной работы по изучению влияния штаммов молочнокислых бактерий на прорастание семян и скорость роста сеянцев огурцов сортов Конкурент и Феникс в водной культуре позволил выявить ряд характерных особенностей воздействия микроорганизмов на рост растений, связанных как с индивидуальными биологическими и количественными характеристиками бактериальной культуры. Выделенные штаммы микроорганизмов являются перспективными для создания бактериальных ассоциаций как основы новых микробных препаратов, эффективных для стимуляции роста и, как следствие, повышения биологической продуктивности растений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Бактерии штаммов молочнокислых лактобацилл *Lactobacillus plantarum* 20 и *Lactobacillus casei* 6, выделенные из силосного зерна и самоквасных домашних кисломолочных продуктов соответственно, а также молочнокислые стрептококки штамма *Lactococcus lactis* 4/6, изолированного из эпифитной сферы растений, обладают типичными для микроорганизмов данных видов морфолого-культуральными признаками.
2. Исследованные штаммы лактобацилл обладали липо- и протеолитической активностью, штамм стрептококка – амило- и липолитической активностью. Бактерии изучаемых штаммов проявили достаточно высокую степень феноло-, желче-, спирто- и солеустойчивости.
3. Лактобактерии были чувствительны к тетрациклину, спирамицину и тилозину, у стрептококка выявлена высокая степень устойчивости к спирамицину, умеренная чувствительность к офлоксацину, тетрациклину и тилозину.
4. Лактобактерии и стрептококк проявили высокую антагонистическую активность по отношению к санитарно-значимым кишечным микроорганизмам. У штамма *L. casei* 6 выявлена фунгицидность по отношению к *A. candidus*, *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *F. sulphureum*, *A. alternata*, *S. brevicaulis*. Штамм *L. plantarum* 20 подавлял рост *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *S. brevicaulis*, а бактерии штамма *L. lactis* 4/6 угнетали рост *S. brevicaulis*, *F. moniliforme*, *F. sulphureum*, *A. alternate*.
5. Экзометаболиты изучаемых молочнокислых бактерий стимулировали прорастание семян огурцов сорта Феникс: их всхожесть под влиянием *L. plantarum* 20 и *L. lactis* 4/6 возросла на 6–12 % и 22 % соответственно по сравнению с контролем. Штамм *L. casei* 6 не оказывал существенного влияния на процессы прорастания семян огурцов исследованных сортов, низкие его

разведения (1:100 и 1:200) угнетали ростовые процессы сеянцев огурцов сортов Конкурент и Феникс.

6. Особенности воздействия микроорганизмов на рост растений определяются как индивидуальными биологическими, так и количественными характеристиками бактериальной культуры: стимуляция роста всех вегетативных органов сеянцев огурцов сорта Конкурент проявилась при использовании штамма *L. casei* 6 в разведении 1:1000, а у сорта Феникс – в разведениях 1:100 и 1:200.
7. Низкие разведения штамма *L. plantarum* 20 вызывали увеличение длины корней, высокие разведения – высоты побегов огурцов сорта Конкурент на 19,4% и 37,7% соответственно по сравнению с контролем. У огурцов сорта Феникс этот штамм в разведении 1:1000 стимулировал рост всех вегетативных органов.

#### Список литературы

1. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н.А. Красильников. – М.: Изд-во АН СССР, 1958. – 463 с.
2. Kloepper J.W. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity / J.W. Kloepper, R. Lifshitz, R.M. Zablotowicz // Trends Biotechnol. – 1989. – № 7. – P. 39 – 43.
3. Rovira A.D. Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production / A.D. Rovira // Reviews of rural science 6: Biotechnology and recombinant DNA technology in the animal production industries. Ens. Leng R.A. et al. University New England Press. – 1985. – P. 185 – 197.
4. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров. – М.: МГУ. – 1986. – 136 с.
5. Bashan Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) / Y.Bashan, G. Holguin, L.E. De Bashan // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50. – P. 521–577.
6. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А.М. Боронин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С.25-31.
7. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А.А. Завалин. – М.: ВНИИА, 2005. – 302 с.
8. Кожемяков А.П. Биопрепараты для земледелия / А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь // В сб.: Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве). – М.: ГНУ ВНИИСХМ, 2005. – С. 18–54.
9. Моргун В.В. Ростостимулирующие ризобактерии и их практическое применение / В.В. Моргун, С.Я. Коць, Е.В. Кириченко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т 41, № 3. – С. 187 – 207.
10. Шапошников А.И. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) / А.И. Шапошников, А.А. Белимов, Л.В. Кравченко, Д.М. Виванко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 16 – 22.
11. Чудинова Ю.В. Влияние микроорганизмов на всхожесть семян и рост ростков корней редиса / Ю.В. Чудинова, Н.Н. Наплекова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2009. – № 7 (57). – С. 14-18.
12. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А.Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 390 с.
13. Патент Российской Федерации на изобретение ММ4А. Консорциум бактерий (*Lactobacillus salvaricus thermophilus*, *Streptococcus bovis*) для активации прорастания семян / Е.В. Чекакина, Кандіба Е.В., Литвинова М.Н., Дмитриева Т.В. Заявл. 31.12.1995; Опубл. 10.03.1999. Бюл. № 7 – 1999. – 3 с.
14. Limanska N. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 12 on initial stages of growth of tomatoes / N.Limanska // Microbial biotechnology: activities and future – Radostim-2012, 19 – 22 November 2012, - Kyiv, Ukrain, 2012. – P. 176 –177.
15. Краткий определитель бактерий Берги / Под редакцией Дж. Хоуга – М.: Мир, 1980. – 496 с.

16. Семёнов А. В. Характеристика антагонистической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях / Автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук. – Оренбург, 2009. – 20 с.
17. К. Дж. Карапетян. Сравнительная оценка ряда свойств новых штаммов молочнокислых бактерий / Биолог. журн. Армении. – 2009. – Т. 4 (61). – С. 36-42.
18. Эйфельд Д. А. Биологическая характеристика производственных штаммов лактобактерий / Автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук. – Пермь, 2002. – 20 с.
19. Самусенко Н. В. Научное обоснование применения бактерий-антагонистов при длительном холодильном хранении корнеплодов моркови / Автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. техн. наук, Санкт-Петербург, 2001. – 20 с.
20. Ботина С. Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии / Автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора биол. наук. – Москва, 2011. – 48 с.
21. Фадеева И. В. Разработка комплексного пробиотического препарата на основе лактобактерий : автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора биол. наук. – Пермь, 2004. – С. 48.
22. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038 [действующий от 01.07.1986]. – М.: Министерство сельского хозяйства СССР, 1984. – 60 с.
23. Четвериков С. П. Идентификация новых экзометаболитов некоторых штаммов *Pseudomonas spp.* и технология биопрепаратов на их основе / Автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора биол. наук. – Уфа, 2012. – 48 с.

**Ржевська В.С. Вивчення біологічних властивостей штамів молочнокислих бактерій / В.С.Ржевська, І.П. Отурина, Л.М. Теплицька // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І.Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 145-160.**

Вивчено морфолого-культуральні і деякі фізіолого-біохімічні властивості виділених з природних джерел штамів молочнокислих бактерій, які мають антагоністичну активність відносно до фітопатогенних мікроорганізмів, високу ферментативну активність, стійкість до агресивних факторів середовища. Досліджено вплив молочнокислих бактерій на проростання насіння і швидкість росту огірків сортів Конкурент і Фенікс при вирощуванні у водної культурі. Показано, що ефективність стимуляції ростових процесів під впливом молочнокислих бактерій залежить від їх біологічних особливостей і концентрації бактеріальної культури.

**Ключові слова:** молочнокислі бактерії, огірки, проростання насіння, ростові процеси.

## **STUDY OF THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE LACTIC ACID BACTERIA STRAINS**

*Rzhevskaya V.S., Oturina I.P., Teplitskaya L.M.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

*E-mail: viktoriyar45@mail.ru*

The morphological and cultural characteristics of two strains of bacteria of the genus *Lactobacillus* and strain of the genus *Lactococcus* isolated from natural sources were studied. The analysis of the physiological and biochemical properties showed the presence of high enzyme activity: all studied bacteria strains revealed lipolytic activity, moreover, *Lactobacillus* had proteolytic activity and *Streptococcus* – amylolytic activity. All isolated strains showed high resistance to aggressive environmental factors: phenol, bile, ethanol and sodium chloride. Studies of the antibiotic resistance showed that *Lactobacillus* is highly sensitive to tetracycline, spiramycin, tylosin, but *Streptococcus* is resistant to

antibiotics, especially spiramycin, but exhibits moderate sensitivity to ofloxacin, tetracycline and tylosin.

*Lactobacillus* and *Streptococcus* possess high antagonistic activity against intestinal sanitary significant microorganisms. Fungicidal activity of lactic acid bacteria in relation to micromycetes significantly differed. Strain of *L. casei* 6 showed fungicidal action against *A. candidus*, *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *F. sulphureum*, *A. alternata*, *S. brevicaulis*, but it did not suppress the growth of *F. moniliforme* and *A. flavus*. Strain of *L. plantarum* 20 inhibited the growth of *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *S. brevicaulis*, but had no effect on the *A. flavus* and *A. candidus*, phytopathogenic fungi *A. alternata*, *F. sulphureum*, *F. moniliforme*. Strain of *L. lactis* 4/6 had antagonistic activity against *S. brevicaulis*, *F. moniliforme*, *F. sulphureum*, *A. alternata*, but it did not suppress the growth of molds genus *Aspergillus*.

Lactic acid bacteria have different effects on the germination of cucumber seeds. Exometabolites of the studied lactic acid bacteria stimulated germination of cucumber sort Phoenix: the germination under the influence of *L. plantarum* 20 and *L. lactis* 4/6 increased by 12,6% and 22,0% respectively compared to the control group. Strain of *L. casei* 6 had no significant effect on the germination of cucumber seeds of studied sorts, its lowest dilution (1:100 and 1:200) inhibited the growth processes of cucumber seedlings of the sorts Competitor and Phoenix.

Lactic acid bacteria have intensified the growth processes of cucumber plants. Strain of *L. casei* 6 at dilutions of 1:100 and 1:200 significantly increased seedling height sort Competitor, dilution of 1:1000 caused accelerated growth both of the aerial and underground plant's organs. In the sort Phoenix this strain at dilutions of 1:100 and 1:200 stimulated the growth of the all vegetative organs. Low dilutions of strain *L. plantarum* 20 increased length of the root, high dilutions – height cucumber seedling sort Competitor by 19.4 % and 37.7 %, respectively, when compared with the control group. In cucumber sort Phoenix this strain in dilution of 1:1000 stimulated the growth of vegetative organs: the length of the root system increased by 16.7 %, and seedlings shoots – by 34,7 % compared to the control group. Low dilutions of strain *L. lactis* 4/6 inhibited the growth processes of 7-day-old seedlings in cucumber sorts Competitor and Phoenix.

Thus, investigated lactic acid bacterial strains *L. casei* 6 and *L. plantarum* 20 can be used as a basis for the creation of bacterial preparations-phytostimulants.

**Key words:** lactic acid bacteria, cucumbers, seed germination, growth processes.

#### References

1. Krasilnikov N.A. Microorganisms of soil and higher plants, 463 p. (AS USSR, 1958).
2. Kloepper J.W. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity, *Trends Biotechnol.*, **7**, 39-43, (1989).
3. Rovira A.D. Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production, Reviews of rural science: Biotechnology and recombinant DNA technology in the animal production industries, *University New England Press.*, 185-197 (1985).
4. Umarov M.M. Associative azotfixing, 136 p. (MSU, 1986).
5. Bashan Y. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), *Can. J. Microbiol.*, **50**, 521-577 (2004).

6. Boronin A.M. Rhizosphere bacteria of family *Pseudomonas* that promote a height and development of plants, *The Soros educational magazine*, **10**, 25-31 (1998).
7. Zavalin A.A. Biopreparations, fertilizers and harvest, 302 p. (USIA, 2005).
8. Kozhemyakov A.P. Biopreparations for agriculture, *Biopreparations in agriculture*, 18–54 (SNU SSIAM, 2005).
9. Morgun V.V. Stimulant a height rizobacteria and their practical application, *Physiology and biochemistry of the culture plants*, **41**, 3, 187-207 (2009).
10. Shaposhnikov A.I. Cooperating of rhizosphere bacteria with plants: mechanisms of formation and factors of efficiency of associative symbiosis (rev.), *Agricultural biology*, **3**, 16- 22 (2011).
11. Chudinova Yu.V. Influence of microorganisms on the germination of seed and height of sprouts of roots of the garden radish, *Announcer of the Altay State University*, **7 (57)**, 14-18 (2009).
12. Kvasnikov E.I. *Lactobacillus* and ways of their use, 390 p. (Science, 1975).
13. Patent of the Russia Federation on the invention MM4A. Bacteria konsortium (*Lactobacillus salvaricicus thermophilus*, *Streptococcus bovis*) for activation the germination of seed, **7**, 3 p. (1999).
14. Limanska N. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 12 on initial stages of growth of tomatoes, *Microbial biotechnology: activities and future*. – Radostim–2012, 19–22.11.2012, 176 -177 (2012).
15. Short Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Red.: J. Kout, 496 p. (World, 1980).
16. Semenov A.V. Description of antagonistic activity of bacteria at intermicrobial mutual relations, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of candidate of biol. sciences, 20 p. (Orenburg, 2009).
17. Karapetyan K.J. Comparative estimation of row of properties of new strains of *Lactobacillus*, *Armenia Biolog. Journ.*, **4 (61)**, 36-42 (2009).
18. Eysfeld D.A. Biological characteristics of the productive strains of *Lactobacillus*, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of candidate of biol. sciences, 20 p. (Perm, 2002).
19. Samusenko N.V. Scientific ground of application of bacteria antagonists at the protracted refrigeration storage of root crops of carrot, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of candidate of tech sciences, 20 p. (Sankt-Peterburg, 2001).
20. Botina S.G. Molecular biological going near the selection of bacterial cultures at creation of ferments for a biotechnology, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of doctor of biol. sciences, 48 p. (Moscow, 2011).
21. Fadeeva I.V. Development of complex probiotic preparation on basis of *Lactobacillus*, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of doctor of biol. sciences, 48 p. (Perm, 2004).
22. Seed of plant-breeding cultures. Methods of determination of germination: SOST 12038, [01.07.1986], 60 p. (Ministry of agriculture of USSR, 1984).
23. Chetverikov S.P. Identification of the new ekzometabolites of some strains *Pseudomonas spp.* and technology of biopreparatov on their base, Avtorep. diss. on the competition of graduate degree of doctor of biol. sciences, 48 p. (Ufa, 2012).

Поступила в редакцию 05.02.2014 г.