

УДК 576.64

Н.І. Теслюк, К.О. Шульга, К.Ю. Нечитайло

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: natalana@onu.edu.ua

ВИЗНАЧЕННЯ ВИРАЖЕНОСТІ ВПЛИВУ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* НА КУЛЬТУРУ НАСІННЯ РИСУ ТА КУКУРУДЗИ В УМОВАХ *IN VITRO*

Метою роботи було визначити вираженість впливу бактерій штамів *Bacillus megaterium* ONU500, *Bacillus velezensis* ONU553, *Bacillus pumilus* ONU554, *Bacillus subtilis* ONU559 на проростання і ріст насіння рису та кукурудзи в стерильних умовах. **Матеріали і методи.** Вирощували тридобові культури бактерій чотирьох штамів на рідкому живильному середовищі LB у термостаті за температури 28 °C та стерилізували насіння модельних рослин за стандартною схемою. Поміщали насіння у 1%-ові розчини бактеріальних суспензій (10^6 КУО/мл) кожного зі штамів та проводили інокуляцію протягом 1 години. **Результати.** Результати експерименту на обох модельних рослинах свідчать про значний потенціал бактерій *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554 як стимуляторів росту та розвитку рослин. *B. subtilis* ONU559 рекомендується до вивчення й уточнення впливу на рослини в подальших дослідженнях. **Висновок.** Найбільш позитивний, стимулювальний вплив на показники проростання, росту та розвитку насіння рису і кукурудзи чинить інокуляція штамом *B. megaterium* ONU500 (для рису: збільшення довжини пагона на 36,5%, кореня на 29%; для кукурудзи: 50% і 69% відповідно). Для культури рису перспективним є також подальше вивчення впливу *B. velezensis* ONU553, а для кукурудзи – *B. pumilus* ONU554.

Ключові слова: в умовах *in vitro*, *Bacillus*, насіння рису та кукурудзи, бактеріальна суспензія

Рис та кукурудза належать до найдавніших і найпоширеніших високоврожайних культур світового землеробства та займають найбільші посівні площі після пшениці. Рисове і кукурудзяне зерно є важливою сировиною для харчової промисловості, а зелена маса – для тваринництва та біоенергетичної галузі. Враховуючи стрімке збільшення населення планети та втрати врожаю внаслідок несприятливих екологічних чинників, попит на дані культури лише зростатиме. Для України нарощування виробництва злакових культур має стратегічне значення для підйому національної економіки в умовах воєнного стану. Адже українське зерно, завдяки своїй високій якості, має визнання як на вітчизняному, так і на міжнародному ринках, та користується стабільним попитом серед споживачів.

© Н.І. Теслюк, К.О. Шульга, К.Ю. Нечитайло, 2024



На теперішній час в Україні спостерігаються різкі коливання погодних умов та малосніжні зими, є проблеми виснаження й ерозії ґрунтів, зниження ефективності хімічних засобів захисту рослин і добрив при постійному підвищенні цін на останні – все це призводить до збільшення собівартості продукції. Такий комплекс проблем породжує запит суспільства до науковців щодо пошуку більш дієвих, але менш шкідливих для довкілля та людини способів вирощування кукурудзи і рису, пошуку нових методів боротьби з хворобами та шкідниками, пом'якшення впливу абіотичного стресу тощо.

Одним із перспективних напрямків розв'язання згаданих вище проблем може стати використання біопрепаратів на основі бактерій роду *Bacillus* – найбільш широко вивчених рістстимулювальних мікроорганізмів для рослин. Відомо, що ці бактерії мають потенціал біоконтролю на тепличних, польових та післязбиральних стадіях розвитку плодів [7]. Завдяки численним прямим і непрямим механізмам впливу на рослини, бацили покращують їх ріст, захищають від фітопатогенів та сприяють отриманню більших об'ємів врожаю високої якості [3]. Вченими встановлено, що «механізми прямої дії цих мікроорганізмів на рослини включають виробництво ауксинів (наприклад, індол-3-оцтової кислоти – ІОК), дезамінази 1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти, цитокінінів, гіберелінів, фіксацію атмосферного азоту (виробництво нітрогенази), солубілізацію фосфору та секвестрацію заліза (шляхом виробництва бактеріальних сидерофорів). Непрямі механізми пов'язані з властивостями бактерій, які пригнічують функціонування одного або декількох фітопатогенів. Це виробництво антибіотиків (наприклад, циклічних ліпопептидів), ферментів, які руйнують клітинну стінку грибів (включаючи хітинази і β -1,3 глюканази), а також виробництво ціаністого водню, що викликає стійкість рослин (наприклад, проти грибкових фітопатогенів)» [5].

Метою нашої роботи було визначення вираженості впливу бацил штамів *Bacillus megaterium* ONU500, *Bacillus velezensis* ONU553, *Bacillus pumilus* ONU554, *Bacillus subtilis* ONU559 на проростання та ріст насіння рису і кукурудзи *in vitro*.

Для цих штамів вже встановлені певні рістстимулювальні та захисні властивості щодо рослин. Є повідомлення про забезпечення *B. megaterium* захисту від посухи шляхом підвищення рівня ІОК та проліну у *Trifolium*. Крім того, існують комерційні біопрепарати на основі штамів цього виду, що використовуються як фунгіциди [8]. Зокрема, у штаму ONU500, що був виділений із ферментованого листа гірчиці, визначено здатність до утворення біоплівки на коренях рослин та продукції сидерофорів [2].

Для штамів ONU553, ONU554 та ONU559, отриманих із донних відкладень Чорного моря у лабораторії Одеського національного університету, аналіз геному дозволив виявити кластери, що ймовірно кодують синтез антибіотиків [10] та протигрибкових речовин [1], а також деяких метаболітів із невідомими на сьогодні функціями [6].

Матеріали і методи

Для нашого експерименту з визначення впливу бацил на ріст насіння рису та кукурудзи вирощували тридобові культури чотирьох штамів бакте-



рій *Bacillus megaterium* ONU500, *Bacillus velezensis* ONU553, *Bacillus pumilus* ONU554, *Bacillus subtilis* ONU559 на рідкому живильному середовищі LB (пептон – 10 г/л, дріжджовий екстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л) [9] у термостаті при постійній температурі 28 °С.

За даними Barros B.C. та інші [4] найвищі концентрації мікробного інокулята не обов'язково сприяють більшому позитивному ефекту стимулювання росту рослин, тому нами було випробувано 1%-ові суспензії культур, з концентраціями $1,3 \times 10^6$ КУО/мл, $1,0 \times 10^6$ КУО/мл, $5,1 \times 10^6$ КУО/мл, $2,8 \times 10^6$ КУО/мл (далі 1%) відповідно у двох повторностях.

Як модельні рослини використовували сортосуміш насіння рису луценого «Рис червоний» *Oryza sativa* L. (виробник насіння – ТМ Tpareza, Україна) та кукурудзу *Zea mays* L. сорту «Веґе» (виробник насіння – ТОВ ВНІС, Україна). Величина вибірки для однієї повторності експерименту становила 50 шт. насінин рису та 50 шт. кукурудзи.

Насіння поміщали у скляну ємність, накривали двома шарами стерильної марлі та проводили стерилізацію насіння за такою схемою: промивання у мильному розчині (10 хвилин), експозиція у 9%-ому розчині гіпохлориту натрію (білизна 1:4, 10 хвилин), витримання у розчині Хінозолу (2 г/л, 5 хвилин), промивання стерильним дистиллятом (5 хвилин), обробка 96% етанолом (1 хвилина). Після стерилізації насіння переносили у ламінар-бокс, де його по 10 штук поміщали у 1%-ові розчини бактеріальних суспензій кожного з чотирьох штамів. Ще по 10 насінин поміщали у стерильний дистиллят для контролю. Інокуляцію проводили протягом 1 години.

Далі за допомогою стерильної піпетки у кожен чашку Петрі додавали 10 мл стерильного дистилляту. Заздалегідь підготували 10 шт стерильних чашок Петрі з фільтрувальним папером для однієї повторності, з яких 5 шт., використовували для пророщування рису, решту 5 для кукурудзи. Фільтрувальний папір добре вбирає та утримує вологу, тому забезпечує оптимальний водно-повітряний режим для проростання насіння. Після чого стерильним пінцетом викладали у чашки на відносно однаковій відстані одну від іншої по 10 шт. насінин рису та кукурудзи.

Насіння у чашках поміщали в умови культурального боксу з температурою 20–23 °С, з освітленням 1800–2000 лк, відносній вологості повітря 70%, та з фотоперіодом 16 годин на добу. Процеси росту та приживлюваності рису і кукурудзи контролювали на четвертий, сьомий та одинадцятий дні експерименту. Робили виміри довжини утворених пагонів (см), довжини коренів проростків рису та кукурудзи (см).

Для підрахунку результатів використовували описову статистику в програмі Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення

Культура рису.

У результаті досліджень на культурі рису встановлено, що найбільша кількість проростків спостерігалася у насіння інокульованого штамом ONU500 – 90%, що на 10% більше ніж в контрольному варіанті, а найменша у



ONU553 – 65%, що на 15% менше відповідно ніж в контролі (рис. 1а). Решта штамів значущої різниці стосовно критеріїв проростання і приживлюваності не показали і становили відповідно штам ONU554 – 80% проростків та ONU559 – 80%, що було на рівні з контролем.

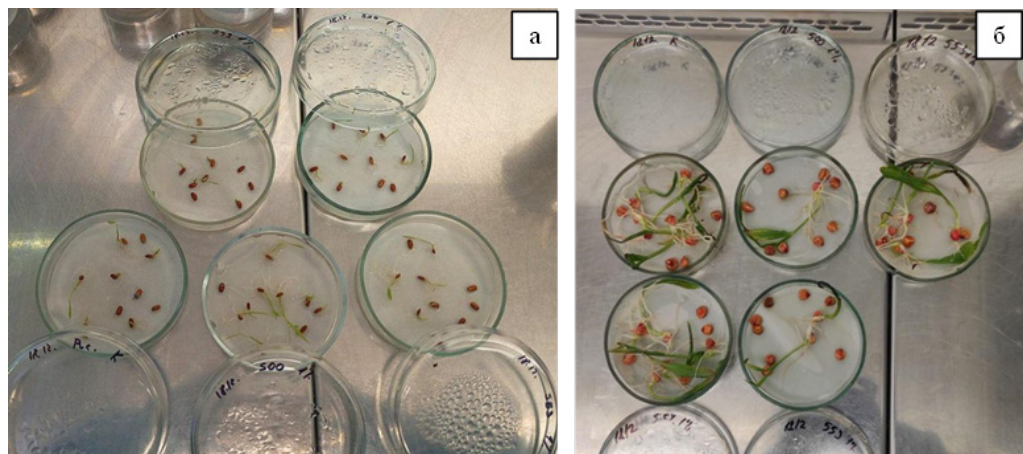


Рис. 1. Проростки рису (а) та кукурудзи (б) на одинадцятий день спостереження

Fig. 1. Rice (a) and corn (b) seedlings on the eleventh day of observation

Візуальні спостереження показали, що при інокуляції штамом ONU500 проростки рису мали більш зелений колір, були більшого розміру.

Щодо середньої довжини утворених пагонів: штами ONU500, ONU553 та ONU554 позитивно впливали на ріст пагонів вже починаючи з 4 дня культивування, штам ONU559 такими властивостями не характеризувався і показав гірші результати у порівнянні з контрольним варіантом (рис. 2а). На 11 день культивування середня довжина пагону рису становила у см: контроль – 1,1; ONU500 – 1,5; ONU553 – 1,6; ONU554 – 1,2; ONU559 – 0,8.

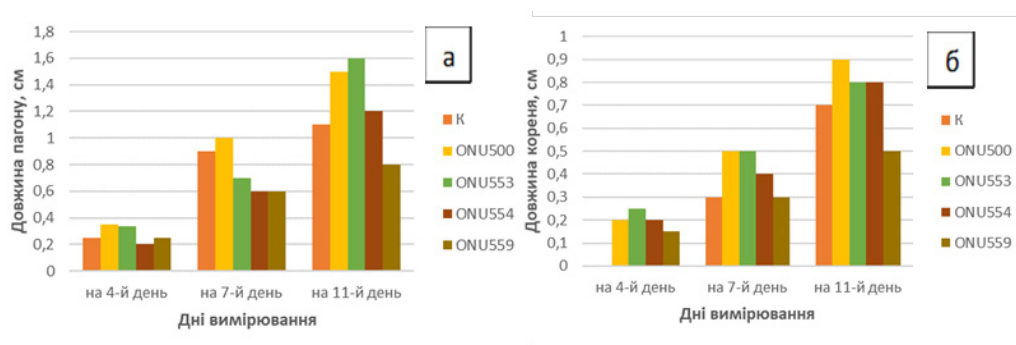


Рис. 2. Вплив суспензії бактерій (1%) різних штамів на довжину пагону (а) та кореня (б) проростків рису

Fig. 2. Effect of suspension of bacteria (1%) of different strains on the length of shoot (a) and root (b) of rice seedlings

Визначено, що середня довжина пагонів після інокуляції насіння рису штамми ONU500 та ONU553 була більшою за контроль на 36,5% і 45,5% відповідно. Натомість обробка насіння штамом ONU554 інтенсифікувала ріст лише на 9%, штам ONU559 викликав невелику затримку росту та розвитку пагонів порівняно з контрольним варіантом.

Наступним дослідним показником була довжина утвореного кореня (рис.3б). Встановлено, що на 11 день культивування насіння рису середня довжина кореня (см) складала відповідно: контроль – 0,7; ONU500 – 0,9; ONU553 – 0,8; ONU554 – 0,8; ONU559 – 0,5. Порівняльний аналіз дослідних і контрольних варіантів показав, що найкращим був варіант з використанням штаму ONU500 – довжина коріння збільшувалася на 29%, у варіантах із штамми ONU553 та ONU554 показник був однаковий і становив 14,5%, однак використання штаму ONU559 призводило до тимчасового гальмування процесів росту і зменшення довжини коріння на 28%.

Загалом, насіння після інокуляції штамом ONU500 характеризувалося найкращим результатом щодо енергії проростання та утворення пагонів, а також проростки мали більш розвинену кореневу систему із значним розвитком додаткових коренів порівняно із контролем та іншими штамми.

У проростків інокульованих штамми ONU553 були відмічені найдовші пагони, але при цьому найнижча кількість пророслих насінин. Утворення коренів було найкращим для штаму ONU554 та ONU500, а найгіршим – для контролю та штамів ONU553 і ONU559.

Отже, обробка одновідсотковим розчином тридобової культури *B. megaterium* ONU500 позитивно впливала на проростання насіння рису, а також викликало найбільшу кількість утворення коренів та пагонів при проростанні.

Культура кукурудзи.

У результаті досліджень на культурі кукурудзи встановлено, що найбільша кількість проростків спостерігалася у насіння інокульованого штамом ONU554 – 50%, що на рівні з контролем; інокуляція штамом ONU500 сприяла проростанню 45% насіння, ONU553 – 40%, а найменший показник був отриманий у варіанті із штамом ONU559 – лише 30%, що менше ніж у контролі на 5%, 10% і 20% відповідно (рис. 1б).

По показнику середньої довжини утворених пагонів кукурудзи: штамми ONU500, ONU553 та ONU554 виявили позитивний вплив на ріст пагонів вже починаючи з 4 дня культивування, штам ONU559 мав гірші результати у порівнянні з контрольним варіантом (рис. 3а). На 11 день спостережень всі чотири дослідні штамми інтенсифікували ріст пагонів у довжину. Середня довжина пагону становила: контроль – 4 см; ONU500 – 6 см; ONU553 – 4,5 см; ONU554 – 5,1 см; ONU559 – 4,7 см.

Встановлено, що найбільша довжина пагонів була після інокуляції насіння кукурудзи штамми ONU500 та ONU554 відповідно більше на 50% та 27,5% у порівнянні з контрольним варіантом, а штамми ONU553 та ONU559 стимулювали ріст пагону в довжину на 12,5% і 17,5% (рис. 3а).

Аналіз утворення та росту коренів інокульованого насіння кукурудзи показав, що в перші чотири доби їх довжина була меншою, ніж у



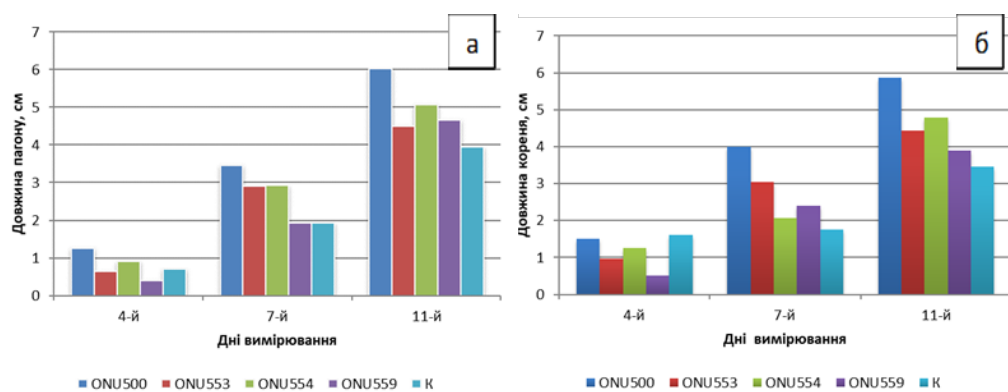


Рис. 3. Вплив суспензії бактерій (1%) різних штамів на довжину пагону (а) та кореня (б) проростків кукурудзи

Fig. 3. Effect of bacterial suspension (1%) of different strains on shoot (a) and root (b) length of corn seedlings

контрольному варіанті. А на 10–11 дні культивування середня довжина кореня у всіх дослідних зразках значно перевищувала цей показник у контролі, так, відповідно: контроль – 3,5 см; ONU500 – 5,9 см; ONU553 – 4,4 см; ONU554 – 4,8 см; ONU559 – 3,9 см (рис. 3б).

Порівняльний аналіз дослідних варіантів із контролем щодо середньої довжини кореня показав, що найкращим був варіант використання штаму ONU500 – довжина кореня збільшилася на 69%. Використання штамів ONU553, ONU554 та ONU559 інтенсифікувало ріст кореня на 25%, 37% і 11% відповідно порівняно з контролем (рис. 3б).

Загалом, насіння інокульоване штамми бацил ONU500 та ONU554 мало більш розвинену кореневу систему з великою кількістю додаткових коренів та кореневих волосків, сформовані зелені листки. На одинадцятий день спостереження у деяких проростків кукурудзи зі штамом ONU553, ONU559 та контрольному варіанті були ознаки некрозу листя та бічних коренів. При цьому інокульовані штамми ONU500 і ONU554 рослини зберігали здоровий вигляд до кінця спостережень. Тобто, була встановлена позитивна дія одновідсоткового розчину тридобової культури *B. megaterium* і *B. pumilus* на процеси росту та розвитку проростків кукурудзи. Крім того, в інокульованого бацилами насіння не спостерігалось контамінації, на відміну від контролю, що дає змогу припустити антагоністичну активність даних штамів проти фітопатогенів.

У підсумку, результати експерименту на обох модельних рослинах свідчать про значний потенціал бактерій *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554 як стимуляторів росту та розвитку рослин. Натомість, штам *B. subtilis* ONU559 виявляв переважну дію на проростання модельних культур і показав слабо виражений ефект на ріст пагонів та коренів.

Для обох культур найбільш позитивний вплив на показники проростання, росту та розвитку чинить інокуляція штамом *B. megaterium* ONU500 (для рису:

збільшення довжини пагона на 36,5%, кореня на 29%; для кукурудзи: 50% і 69% відповідно). Визначено також, що для рису перспективним є подальше використання штаму *B. velezensis* ONU553 (збільшення довжини пагона на 45,5%, кореня на 14,5%), а для кукурудзи – *B. pumilus* ONU554 (збільшення довжини пагона на 27,5%, кореня на 37%).

N.I. Tesliuk, K.O. Shulga, K.Y. Nechitailo

Odesa I. I. Mechnikov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: natalana@onu.edu.ua

STUDY OF THE EFFECT OF BACTERIA OF THE GENUS BACILLUS ON THE CULTURE OF RICE AND CORN SEEDS IN VITRO

Summary

The **aim** of the study was to investigate the effect of bacteria strains *Bacillus megaterium* ONU500, *Bacillus velezensis* ONU553, *Bacillus pumilus* ONU554, *Bacillus subtilis* ONU559 on the germination and growth of rice and corn seeds under sterile conditions. **Materials and methods.** Three-day cultures of the four strains were grown on LB liquid nutrient medium in a thermostat at 28 °C and the seeds of model plants were sterilized according to the standard scheme. The seeds were placed in 1% solutions of bacterial suspensions (10^6 CFU/ml) of each strain and inoculated for 1 hour. **Results.** The experiment results on both model plants indicate significant potential of the bacteria *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554 as growth and development stimulators for plants. *B. subtilis* ONU559 is recommended for further study and clarification of its impact on plants in subsequent research. **Conclusion.** The most positive, stimulating effect on the indicators of germination, growth, and development of rice and corn seeds is exerted by inoculation with the strain *B. megaterium* ONU500 (for rice: increase in shoot length by 36.5%, root by 29%; for corn: 50% and 69% respectively). Further study of the influence of *B. velezensis* ONU553 is promising for rice cultivation, and for corn – *B. pumilus* ONU554.

Key words: in vitro conditions, *Bacillus*, rice and corn seeds, bacterial suspension

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Страшнова І.В., Васильєва Н.Ю., Штеніков М.Д., Коротаєва Н.В., Лісютін Г.В., Горщикова О.Г., Волювач О.В., Потапенко К.С., Боброва О.Є., Іваниця Т.В., Філіпова Т.О., Чабан М.М.; ред. Іваниця В.О. / Мікробіологічні дослідження Чорного моря: монографія. – Одеса: ОНУ, 2021. – 282 с.
2. Титаренко Н.В. Удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *Rubus fruticosus* L. і *Paulownia tomentosa steud.* з використанням мікроорганізмів: дис. ... канд. біол. наук : 162. / Н.В. Титаренко – Одеса, 2018. – 211 с.



3. Титаренко Н.В., Теслюк Н.І., Іваниця В.О. Перспективи використання бактерій у культурі клітин та тканин рослин // Мікробіологія та біотехнологія. – 2020. – № 3. – С. 6–31.
4. Barros B.C., Mendes S.R., Fernando S.B., Reis A.S., Cid R.E. Effects of chemical fertilization and microbial inoculum on *Bacillus subtilis* colonization in soybean and maize plants. *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – № 13.
5. Dobrzyński J., Jakubowska Z., Dybek B. Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Front Microbiol.* – 2022. Dec 21; – № 13.
6. Ostapchuk A.M., Shtenikov M.D., Ivanytsia V.O. Exometabolites of endospore-forming bacteria of *Bacillus* genus identified by genomic metabolomic profiling. // *Ukr. Biochem.* – 2020. – J. № 92(6) – P. 154–164.
7. Rabbee M.F., Hwang B.S., Baek K.H. *Bacillus velezensis*: A beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture. *Agronomy*. – 2023. – № 13. – 840 p.
8. Shtenikov M.D., Ostapchuk A.M., Vasylieva N.Y. Characteristics of genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 strain isolated from the bottom sediments of the Black Sea // *Microbiological journal*. – 2020. – № 82(3).
9. Shvets Y.A., Krylova K.D., Limanska N.V. Effect of *bacillus megaterium* ONU500 on the germination and growth of sunflower seedlings // *Microbiology&Biotechnology*. – 2021. – № 1 – P. 45–54.
10. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М., Горшкова О.Г., Теслюк Н.І., Титаренко Н.В., Гудзенко Т.В. Пат. 126710 України МПК А01N63/22. Штам *Bacillus velezensis* ONU553 – продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю. Київ: Національний орган інтелектуальної власності – державна організація “Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій”. – 2023.

REFERENCES

1. Ivanytsia VO, Gudzenko TV, Strashnova IV, Vasilieva NY, Shtenikov MD, Korotaeva NV, Lisyutin GV, Gorshkova OG, Voluvach OV, Potapenko KS, Bobrova OY, Ivanitsya TV, Filipova TO, Chaban MM; editor Ivanytsia VO. *Microbiological Studies of the Black Sea: Monograph*. Odesa: Odesa I.I. Mechnikov National University; 2021. 282 p. (in Ukrainian).
2. Tytarenko NV. Improvement of clonal micropropagation biotechnology of *Rubus fruticosus* L. and *Paulownia tomentosa* Steud. using microorganisms. PhD thesis in specialty 162 «Biotechnology and bioengineering». – Odesa I.I. Mechnikov National University, Odesa, 2023. (in Ukrainian).
3. Tytarenko N, Tesliuk N, Ivanytsia V. Perspectives of using bacteria for cell and tissue plant culture. *Microbiology and biotechnology*. 2020; 3:6–31 (in Ukrainian).
4. Barros BC, Mendes SR, Fernando SB, Reis AS, Cid RE. Effects of chemical fertilization and microbial inoculum on *Bacillus subtilis* colonization in soybean and maize plants. *Frontiers in Microbiology*. 2022; (13).
5. Dobrzyński J, Jakubowska Z, Dybek B. Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Front Microbiol.* – 2022. Dec 21; (13).



6. Ostapchuk AM, Shtenikov MD, Ivanytsia VO. Exometabolites of endospore-forming bacteria of *Bacillus* genus identified by genomic metabolomic profiling. // Ukr. Biochem. 2020; J., 92(6): 154–164.
7. Rabbee MF, Hwang BS, Baek KH. *Bacillus velezensis*: A beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture. Agronomy. 2023; (13): 840.
8. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Vasylieva NY. Characteristics of genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 strain isolated from the bottom sediments of the Black Sea // Microbiological journal. 2020; (82) № 3.
9. Shvets YA, Krylova KD, Limanska NV. Effect of *Bacillus megaterium* ONU500 on the germination and growth of sunflower seedlings // Microbiology&Biotechnology. 2021; (1):45–54.
10. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Gorshkova OG, Tesliuk NI, Tytarenko NV, Gudzenko TV. Patent 126710 Ukraine, IPC A01N63/22. Strain *Bacillus velezensis* ONU553 – Producer of Lipopeptide Antibiotics, Antagonist of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacteria* with Growth-Stimulating Activity. Kyiv: National Intellectual Property Office - State Organization "Ukrainian National Office of Intellectual Property and Innovations"; 2023 (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 25.03.24 р.

