

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

ПОГОДЖЕНО

**Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології**

_____Юлія КОЛОМІЄЦЬ
(підпис)
« » 20 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

**Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття**

_____Олена КВАСКО
(підпис)
« » 20 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «Біоінженерія симбіотичних бактерій для підвищення азотфіксації у
зернових культур»**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біол. наук, доцент

(підпис)

Олена КВАСКО

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

Доктор с.-г. наук, професор

(підпис)

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

Виконав

(підпис)

Денис МАКСИМЕНКО

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Кандидат біологічних наук Олена КВАСКО

“22” травня 2026 р.

З А В Д А Н Н Я

ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ ЗДОБУВАЧУ

Максименко Денис Дмитрович

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи

«Біоінженерія симбіотичних бактерій для підвищення азотфіксації у зернових культур»

затверджена наказом від «30» жовтня 2025 року № 2596 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру «22» травня 2026 р.

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи:

Дані про біологічну азотфіксацію у зернових культур. Характеристика симбіотичних, асоціативних та ендоефітних азотфіксуючих бактерій. Відомості про діазотрофи родів *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* та *Gluconacetobacter*. Підходи до біоінженерії бактеріальних інокулянтів для підвищення ефективності азотфіксації.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Проаналізувати значення біологічної азотфіксації для зернових культур.
2. Охарактеризувати основні групи азотфіксуючих бактерій.
3. Розглянути біоінженерні підходи до підвищення ефективності бактеріальних інокулянтів.
4. Обґрунтувати модель перспективного інокулянта для зернових культур.
5. Оцінити можливості його практичного використання в Україні

Перелік графічних документів.

Таблиці з характеристикою азотфіксуючих бактерій. Схеми взаємодії бактерій із кореневою системою зернових культур. Графіки та діаграми ефективності біоінженерного інокулянта

Дата видачі завдання «1» вересня 2025 р.

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

(підпис)

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

Завдання взяв до виконання

(підпис)

Денис МАКСИМЕНКО

РЕФЕРАТ

Бакалаврська кваліфікаційна робота виконана на 53 сторінках, містить 9 рисунків, 8 таблиць, 6 додатків та 23 джерела використаної літератури. Метою роботи було науково обґрунтувати можливості біоінженерії симбіотичних і асоціативних бактерій для підвищення азотфіксації у зернових культур та розробити аналітичну модель бактеріального інокулянта нового покоління. Об'єктом дослідження є взаємодія зернових культур із симбіотичними, асоціативними та ендofітними азотфіксувальними бактеріями. Предметом дослідження є біотехнологічні та генетико-інженерні підходи до посилення діазотрофних властивостей бактеріальних інокулянтів і підвищення їх практичної ефективності у системах вирощування зернових культур. У роботі застосовано аналіз і синтез наукових джерел, порівняльний метод, систематизацію даних, структурно-функціональний аналіз мікробно-рослинних взаємодій та елементи біотехнологічного моделювання. У результаті дослідження узагальнено сучасні дані щодо діазотрофів родів *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus* та споріднених ризобактерій, визначено основні обмеження природних інокулянтів і обґрунтовано доцільність створення інженерного штаму або функціонального консорціуму. Новизна роботи полягає у формуванні аналітичної моделі інокулянта, що поєднує азотфіксувальну активність, стабільну колонізацію ризосфери, синтез фітогормонів, адаптивність до агроценозу та біобезпечність. Результати можуть бути використані для планування лабораторних, вегетаційних і польових досліджень, а також як основа для подальшої розробки бактеріальних препаратів для пшениці, ячменю, кукурудзи та тритикале.

Ключові слова: ЗЕРНОВІ КУЛЬТУРИ, АЗОТФІКСАЦІЯ, ДІАЗОТРОФИ, *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*, БІОІНЖЕНЕРІЯ, РИЗОСФЕРА, ІНОКУЛЯНТ, БІОБЕЗПЕКА.

ABSTRACT

The bachelor's qualification work consists of 53 pages and includes 9 figures, 8 tables, 6 appendices and 23 references. The aim of the work was to scientifically substantiate the possibilities of bioengineering symbiotic and associative bacteria to enhance nitrogen fixation in cereal crops and to develop an analytical design model of a new-generation bacterial inoculant. The object of the study is the interaction of cereal crops with symbiotic, associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria. The subject of the study is the biotechnological and genetic engineering approaches aimed at improving the diazotrophic properties of bacterial inoculants and increasing their practical efficiency in cereal cropping systems. The work uses analysis and synthesis of scientific literature, comparative assessment, data systematization, structural and functional analysis of plant-microbial interactions, and elements of biotechnological system design. The study summarizes current data on diazotrophs of the genera *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus* and related rhizobacteria, identifies the main limitations of natural inoculants, and substantiates the feasibility of developing an engineered strain or a functional microbial consortium. The novelty of the work consists in the proposed analytical design model of an inoculant combining nitrogen-fixing activity, stable rhizosphere colonization, phytohormone production, adaptability to the agrocenosis and biosafety. The results can be used for planning laboratory, vegetation and field studies and as a basis for further development of bacterial preparations for wheat, barley, maize and triticale.

Keywords: CEREAL CROPS, NITROGEN FIXATION, DIAZOTROPHS, *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*, BIOENGINEERING, RHIZOSPHERE, INOCULANT, BIOSAFETY.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	8
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Біологічна азотфіксація та її значення для зернових культур	12
1.2. Асоціативні й ендосфитні діазотрофи зернових культур	14
1.3. Обмеження природних бактеріальних інокулянтів.	15
1.4. Сучасні біоінженерні підходи до посилення азотфіксації	16
1.5. Молекулярно-генетичні детермінанти ефективної колонізації кореня.	17
1.6. Біобезпека та нормативні обмеження використання інженерних мікроорганізмів	19
Висновки до розділу 1	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ АНАЛІТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ	22
2.1. Інформаційна база та логіка дослідження	22
2.2. Вибір базового бактеріального штаму та рослини-хазяїна	23
2.3. Схема біоінженерії інокулянта	24
2.4. Система оцінювання ефективності	25
2.5. Принципи біобезпеки та поетапної валідації	27
2.6. Бальна модель оцінювання перспективності кандидатного штаму	27
Висновки до розділу 2	29
РОЗДІЛ 3. АНАЛІТИЧНЕ УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПРАКТИЧНОГО ВПРОВАДЖЕННЯ	30
3.1. Вітчизняний досвід використання діазотрофів у зернових культурах	30
3.2. Цільові ознаки для інженерного вдосконалення штаму	32
3.3. Модель перспективного інокулянта для зернових культур	33
3.4. Очікувана ефективність і схема валідації	34

3.5. Перспективи та ризики впровадження в Україні	35
Висновки до розділу 3	36
РОЗДІЛ 4. ГРАФІЧНО-АНАЛІТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МОДЕЛІ	
БІОІНЖЕНЕРНОГО ІНОКУЛЯНТА	37
4.1. Графічна інтерпретація ключових біотехнологічних ознак	37
4.2. Моделювання ефекту біоінженерного інокулянта за різних азотних фонів . .	39
4.3. Схема конструювання та валідації інокулянта	41
4.4. Технологічний маршрут виробництва та контролю якості	43
4.5. Сценарії практичного впровадження біоінженерного інокулянта в Україні .	44
4.6. Практичний чек-лист відбору кандидатного штаму	46
Висновки до розділу 4	47
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Скорочення	Розшифрування
АТФ	аденозинтрифосфат
БЖД	безпека життєдіяльності
ГММ	генетично модифікований мікроорганізм
ІОК	індоліл-3-оцтова кислота
Nif	комплекс генів азотфіксації
PGPR	plant growth-promoting rhizobacteria, ризобактерії, що стимулюють ріст рослин

ВСТУП

Азот є одним із ключових елементів мінерального живлення рослин, а його дефіцит безпосередньо обмежує формування листкової поверхні, інтенсивність фотосинтезу, накопичення білка та врожайність зернових культур. У сучасному землеробстві нестачу азоту компенсують насамперед застосуванням мінеральних добрив, однак така модель не є бездоганною ні з економічного, ні з екологічного погляду. Висока вартість азотних добрив, значні енергетичні витрати на їх виробництво та ризик втрат азоту у формі нітратів і газоподібних сполук зумовлюють потребу у пошуку більш сталих рішень (Oldroyd & Dixon, 2014; Beatty & Good, 2011).

Біологічна азотфіксація є природним процесом, за якого певні прокаріоти відновлюють молекулярний азот атмосфери до амонійної форми за участю ферментного комплексу нітрогенази. Для бобових культур ця стратегія давно набула практичного значення завдяки класичному симбіозу з бульбочковими бактеріями. Для зернових культур завдання є складнішим, оскільки вони не формують спеціалізованих бульбочок, а тому розрахунок роблять на асоціативні та ендofітні взаємодії з діазотрофами, які колонізують ризосферу, ризоплану або внутрішні тканини коренів і пагонів (Rosenblueth et al., 2018; Mahmud et al., 2020).

Вітчизняні дослідження останніх десятиліть підтверджують, що інокуляція зернових діазотрофними бактеріями може супроводжуватися підвищенням потенційної нітрогеназної активності, покращенням морфofізіологічних показників рослин, збільшенням урожайності й ефективнішим використанням мінерального азоту. Особливо показовими є роботи українських науковців з вивчення асоціацій *Azospirillum brasilense* із пшеницею та тритикале, які продемонстрували істотну залежність ефекту від штаму бактерії, генотипу рослини та умов мінерального живлення (Shakhovnina et al., 2009; Shakhovnina, 2011; Vorobei et al., 2023).

Разом із тим природні інокулянти нерідко демонструють варіабельну ефективність у полі. Це пов'язано з чутливістю нітрогенази до кисню, пригніченням піф-регуляції за високого вмісту доступного азоту, слабкою конкурентоздатністю інтродукованого штаму у ґрунтовій мікробній спільноті, нестабільною колонізацією коренів, а також різною інтенсивністю кореневих ексудатів у різних сортів зернових культур (Pereg et al., 2016; Ryu et al., 2020). Саме ці обмеження зумовили інтерес до біоінженерії симбіотичних і асоціативних бактерій.

У сучасній синтетичній біології сформувалося кілька стратегій посилення азотфіксації у системі "бактерія - злак": інженерне регулювання піф-кластерів, конструювання чутливих до рослинних сигналів генетичних схем, оптимізація систем колонізації, створення консорціумів з розподілом функцій і добір штамів, здатних підтримувати активність у присутності мінерального азоту в удобрених полях (Rogers & Oldroyd, 2014; Wen et al., 2021; Haskett et al., 2022). Для України ця тематика має додаткове значення, оскільки поєднує агрономічну результативність, біотехнологічну новизну та потенціал зменшення хімічного навантаження на агроєкосистеми.

Метою роботи є наукове обґрунтування можливостей біоінженерії симбіотичних та асоціативних бактерій для підвищення азотфіксації у зернових культур і розроблення аналітичної моделі інокулянта нового покоління, придатного для подальшої експериментальної перевірки.

Для досягнення поставленої мети мною визначено такі завдання: 1) проаналізувати біологічні основи асоціативної азотфіксації у зернових культур; 2) узагальнити дані щодо ефективності природних діазотрофних штамів, насамперед вітчизняних; 3) встановити ключові обмеження традиційних бактеріальних інокулянтів; 4) охарактеризувати сучасні біоінженерні підходи до посилення колонізації та азотфіксувальної активності бактерій; 5) запропонувати модель

перспективного інженерного штаму або консорціуму для зернових культур; б) окреслити схему оцінювання ефективності та біобезпеки майбутнього препарату.

Об'єктом дослідження є взаємодія зернових культур із симбіотичними, асоціативними та ендоефітними азотфіксувальними бактеріями. Предметом дослідження є біотехнологічні та генетико-інженерні підходи до посилення діазотрофних властивостей бактеріальних інокулянтів і їх практичної ефективності в системах вирощування зернових культур.

У роботі використано загальнонаукові та спеціальні методи дослідження: аналіз і синтез літературних джерел, порівняльний метод, систематизацію наукових даних, структурно-функціональний аналіз мікробно-рослинних взаємодій, а також елементи моделювання біотехнологічної системи на підставі опублікованих результатів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що сформульовані підходи можуть бути використані як основа для подальшої розробки бактеріальних препаратів для пшениці, ячменю, кукурудзи та тритикале, а також для планування лабораторних, вегетаційних і польових дослідів. Структурно робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна азотфіксація та її значення для зернових культур

Біологічна азотфіксація - це один із найважливіших біогеохімічних процесів, який забезпечує надходження відновленого азоту в екосистеми без промислових енерговитрат. Її каталізує нітрогеназа - ферментний комплекс, чутливий до кисню та енергетично витратний, оскільки для відновлення однієї молекули N_2 необхідна значна кількість АТФ і відновників. Саме тому в природі азотфіксація виникає лише за наявності спеціальних метаболічних і регуляторних механізмів, які захищають нітрогеназу та роблять процес еволюційно доцільним (Oldroyd & Dixon, 2014; Guo et al., 2023).

У бобових культур азотфіксація реалізується завдяки високоспеціалізованому симбіозу з ризобіями, тоді як у злаків домінують асоціативні та ендofітні форми взаємодії. Це означає, що діазотрофні бактерії не утворюють морфологічно відокремленого органа, але тісно пов'язані з кореневою системою або внутрішніми тканинами рослини і можуть постачати частину фіксованого азоту безпосередньо в зоні активного росту. Ефективність такого процесу зазвичай нижча, ніж у бобово-ризобіальному симбіозі, проте для зернових культур навіть часткове заміщення мінерального азоту є агрономічно цінним (Rosenblueth et al., 2018; Bloch et al., 2020).

Особливий інтерес становлять представники родів *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* та деякі *Bacillus*-подібні мікроорганізми, які можуть поєднувати азотфіксацію із синтезом ауксинів, сидерофорів, екзополісахаридів і сполук, що модулюють архітектуру кореня. Таким чином, їхній ефект на зернові культури не обмежується лише постачанням біологічного азоту, а проявляється також через посилення коренеутворення, кращий доступ до вологи та елементів живлення, зміну гормонального балансу і

зниження стресового навантаження на рослини (Bashan et al., 2004; Vacheron et al., 2013).

Зернові культури є дуже різними за типом кореневої системи, інтенсивністю виділення ексудатів і мікробіомною організацією ризосфери, тому універсальної бактеріальної моделі для всіх злаків не існує. Для пшениці та тритикале особливе значення мають асоціації з *Azospirillum brasilense*, для кукурудзи описано ефективні ендofітні взаємодії з *Herbaspirillum* та *Gluconacetobacter*, а для окремих генотипів рису й сорго доведено високу роль ендofітного заселення провідних тканин. Це означає, що сучасна біоінженерія має будуватися не навколо абстрактного "універсального діазотрофа", а навколо конкретної системи "штам - культура - агроекологічна ніша". Узагальнену характеристику основних груп діазотрофних бактерій, перспективних для зернових культур, наведено в таблиці 1.1. (Mahmud et al., 2020; Guo et al., 2023).

Таблиця 1.1 - Основні групи діазотрофних бактерій, перспективних для зернових культур

Рід бактерій	Тип взаємодії із злаками	Основні корисні ефекти	Ключові обмеження
<i>Azospirillum</i>	Асоціативна, частково ендofітна	Азотфіксація, синтез ауксинів, стимуляція коренів	Нестабільність у полі, залежність від сорту
<i>Herbaspirillum</i>	Ендofітна	Колонізація внутрішніх тканин, постачання азоту	Складність керованого внесення, менше вітчизняних даних
<i>Azoarcus</i>	Ендofітна/асоціативна	Активна колонізація, азотфіксація	Висока залежність від культури та умов
<i>Gluconacetobacter</i>	Ендofітна	Азотфіксація, стимуляція росту	Обмежена кількість польових підтверджень для більшості зернових

1.2. Асоціативні й ендоефітні діазотрофи зернових культур

Асоціативні діазотрофи зернових культур функціонують на межі між вільноживучим та симбіотичним способами існування. Вони не формують бульбочок, проте розпізнають кореневі ексудати, прикріплюються до поверхні кореня, формують мікроколонії, біоплівки і в окремих випадках проникають у внутрішні тканини рослини. Завдяки такій стратегії бактерії отримують джерело вуглецю, а рослина - локальний приплив амонійного азоту та супутніх фітогормональних і захисних ефектів (Pereg et al., 2016; Rosenblueth et al., 2018).

Серед асоціативних діазотрофів найбільш вивченим для зернових є *Azospirillum brasilense*. Українські автори показали, що використання ізолятів *A. brasilense*, виділених із коренів тритикале та пшениці, супроводжується посиленням нітрогеназної активності в кореневій зоні, поліпшенням біосинтетичних процесів і зростанням продуктивності рослин. Водночас ефект залежить від того, наскільки конкретний штам сумісний з певним сортом та агрофоном (Shakhovnina et al., 2009; Shakhovnina et al., 2021; Vorobei et al., 2023).

Вітчизняні дослідження також переконливо демонструють, що один і той самий рід бактерій може проявляти різну ефективність залежно від генотипу рослини. Зокрема, на прикладі ярого тритикале показано відмінності у фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні різних сортів та різну реакцію на інокуляцію *A. brasilense*. Це є надзвичайно важливим для біоінженерії, оскільки інженерний штам має бути адаптований не тільки до виду рослини, а й до сорту або групи споріднених сортів (Shakhovnina, 2011; Patyka et al., 2015).

Позитивна дія асоціативних бактерій пояснюється не лише азотфіксацією. Для *Azospirillum* добре описано синтез індоліл-3-оцтової кислоти, вплив на формування бічних коренів і корневих волосків, стимулювання водопоглинання та зменшення стресу. Саме тому в полі приріст урожаю може бути вищим, ніж можна було б очікувати лише від кількості зафіксованого азоту. Для прикладних розробок

це означає, що інженерний штам бажано оцінювати за комплексом ознак, а не лише за активністю нітрогенази *in vitro* (Bashan et al., 2004; Vacheron et al., 2013).

1.3. Обмеження природних бактеріальних інокулянтів

Попри велику кількість позитивних результатів, використання природних діазотрофних штамів у технологіях вирощування зернових культур характеризується нестабільністю. Одна з головних причин полягає у тому, що активність нітрогенази суворо регулюється умовами середовища і часто знижується за наявності доступних форм мінерального азоту. У реальних технологіях зернові зазвичай вирощують на удобрених полях, а отже бактерія повинна не просто мати *nif*-гени, а зберігати функціонування азотфіксувального апарату в субоптимальних для неї умовах (Ryu et al., 2020; Wen et al., 2021).

Інша проблема - низька конкурентоздатність інтродукованого штаму порівняно з автохтонною мікробіотою ґрунту. Бактерія, яка показує високі результати в стерильних або напівстерильних умовах, може швидко втрачати чисельність у полі, поступаючись аборигенним мікроорганізмам у доступі до вуглецю, простору та ніш прикріплення. Для цього інженерні рішення мають передбачати посилення хемотаксису, формування біоплівки, стійкість до осмотичного та окисного стресу, а також ефективне використання специфічних компонентів корневих ексудатів злаків (Pereg et al., 2016; Haskett et al., 2022).

Не менш важливою є просторово-часова невідповідність між потребою рослини в азоті та бактеріальною активністю. Найбільший попит на азот у зернових припадає на періоди інтенсивного наростання вегетативної маси та закладання генеративних органів, тоді як бактеріальна колонізація може бути відкладеною або нестабільною. Це стимулює пошук штамів, здатних швидко стартувати після інокуляції насіння, а також розробку носіїв і препаративних форм, які підтримують

життєздатність бактерій у перші критичні фази розвитку рослини (Volkogon et al., 2020; Ulziihargal, 2020).

Нарешті, обмеженням є відсутність у природних штамів оптимального поєднання всіх бажаних ознак. Один ізолят може добре колонізувати корені, але мати слабшу азотфіксувальну активність; інший - ефективно фіксувати азот у модельних умовах, але гірше переживати стрес або програвати конкуренцію у полі. Звідси впливає логіка сучасної біоінженерії: не шукати ідеальний штам у природі, а конструювати його або формувати синтетичний консорціум із розподілом функцій (Bloch et al., 2020; Rogers & Oldroyd, 2014).

1.4. Сучасні біоінженерні підходи до посилення азотфіксації

Біоінженерія симбіотичних і асоціативних бактерій для зернових культур розвивається у кількох напрямках. Перший напрям передбачає модифікацію систем регуляції *nif*-кластерів, щоб зменшити пригнічення азотфіксації мінеральним азотом і підпорядкувати активацію процесу рослинним сигналам або особливостям ризосферного мікрооточення. Такі підходи особливо важливі для практики, оскільки більшість сучасних полів не є повністю безазотними (Ryu et al., 2020; Wen et al., 2021).

Другий напрям пов'язаний із конструюванням рослиннокерованих генетичних схем, коли бактерія активує потрібні функції у відповідь на специфічні метаболіти корневих ексудатів або на сигнали, індуковані рослиною. Це наближає асоціативну взаємодію до контрольованого симбіозу та підвищує ймовірність того, що нітрогеназа працюватиме саме в зоні, де фіксований азот може бути швидко використаний рослиною (Rogers & Oldroyd, 2014; Haskett et al., 2022).

Третій напрям охоплює інженерію колонізації: оптимізацію хемотаксису до органічних кислот, цукрів та амінокислот корневих ексудатів, синтез екзополісахаридів, адгезинів, систем кворумного sensing та ферментів, що

полегшують ендofітне проникнення без пошкодження рослинних тканин. У реальному полі саме колонізація часто є вузьким місцем, тому підсилення цієї ознаки може мати не менше значення, ніж власне *nif*-активність (Pereg et al., 2016; Guo et al., 2023).

Четвертий напрям - створення багатокомпонентних консорціумів. У межах такої стратегії один штам спеціалізується на колонізації й формуванні біоплівки, другий - на азотфіксації, третій - на мобілізації фосфору або продукції фітогормонів. Перевага консорціуму полягає у гнучкості, але його недолік - складність стандартизації та контролю стабільного співвідношення компонентів. Тому для бакалаврської кваліфікаційної роботи доцільно розглядати обидві моделі: інженерний моноштам і функціонально збалансований консорціум (Bloch et al., 2020; Mahmud et al., 2020).

Підсумовуючи огляд джерел, варто зазначити, що біоінженерія у цій сфері має доповнювати, а не ігнорувати результати класичної аграрної мікробіології. Саме комбінація фундаментального знання про природні асоціації та сучасних інструментів синтетичної біології створює найбільш перспективну траєкторію розвитку.

1.5. Молекулярно-генетичні детермінанти ефективної колонізації кореня

Однією з причин нестійкості польового ефекту асоціативних діазотрофів є розрив між високою активністю в контрольованих умовах та фактичною здатністю штаму довго зберігатися в ризосфері конкретного сорту пшениці, ячменю або кукурудзи. Тому в сучасних роботах все більша увага приділяється не лише *nif*-генам, а й генам, що визначають хемотаксис, рухливість, синтез екзополісахаридів, адгезію та взаємодію з рослинними сигналами. Саме ця група ознак забезпечує швидке входження бактерії в екологічну нішу кореня й утримання популяції на критично важливих етапах органогенезу зернових.

Для *Azospirillum brasilense* особливого значення набувають регуляторні мережі, пов'язані з біоплівкоутворенням, реакцією на органічні кислоти корневих ексудатів та переключенням між вільноживучим і асоційованим станом. На мою думку, для практичної біоінженерії перспективним є не максимальне посилення будь-якої однієї функції, а баланс між колонізацією, енергетичною економікою клітини та збереженням азотфіксувальної активності. Штам, що надмірно витрачає ресурси на синтез структур біоплівки, може програвати за загальною життєздатністю, тоді як помірно модифікований варіант матиме кращі шанси на технологічне використання.

У контексті зернових культур важливо враховувати й архітектуру кореневої системи. Для пшениці та тритикале ключовими є ознаки, що забезпечують взаємодію з густою мережею корневих волосків, тоді як для кукурудзи особливу роль відіграє швидка колонізація молодих коренів і внутрішніх тканин. Це означає, що універсальний «суперштам» для всіх злаків є менш реалістичною метою, ніж створення платформи з набором модулів, які можна адаптувати під окремий вид або навіть під групу сортів. Таке бачення узгоджується з сучасними підходами синтетичної біології, що ґрунтуються на модульності генетичних конструкцій (Guo et al., 2023; Haskett et al., 2022).

Ще одним важливим компонентом є система відповіді бактерії на окиснювальний стрес і коливання вологості. У ґрунті інтродукований штам швидко переходить із «комфортних» умов лабораторії до середовища, де концентрація кисню, доступність вуглецю, рН та солоність можуть змінюватися на мікромасштабі. Саме тому в модель перспективного інокулянта доцільно включати не лише ознаки високої піф-активності, а й маркери адаптивності, пов'язані зі стійкістю до абіотичних факторів та збереженням життєздатності під час зберігання препарату. Узагальнену послідовність взаємодії азотфіксувальних бактерій із кореневою системою зернових культур подано на рис. 1.1.

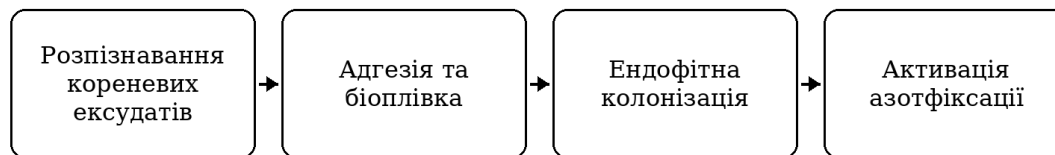


Рис. 1.1. Узагальнена схема взаємодії азотфіксувальних бактерій із кореневою системою зернових культур (побудовано мною на основі узагальнення літературних джерел).

1.6. Біобезпека та нормативні обмеження використання інженерних мікроорганізмів

Розглядаючи біоінженерію симбіотичних і асоціативних бактерій для зернових культур, не можна обмежуватися лише біологічною ефективністю. Будь-який штам, який має потенціал для використання у відкритих агроєкосистемах, повинен оцінюватися з позицій біобезпеки, генетичної стабільності та регуляторної прийнятності. Для України ця проблема є особливо актуальною, оскільки практичне впровадження інженерних мікроорганізмів вимагатиме не лише наукового доведення користі, а й створення чіткої нормативної рамки для їх тестування, реєстрації та постреєстраційного моніторингу.

Найбільш очевидними ризиками є горизонтальний перенос модифікованих генетичних елементів, небажана зміна структури ґрунтових мікробних угруповань, неконтрольоване поширення штаму за межі цільового агроценозу та нестабільність ознак у наступних пасажах. Відповідно, у розробленні інокулянта слід надавати

перевагу таким конструкціям, які мінімізують селективні переваги поза рослинною асоціацією та знижують імовірність тривалого закріплення інженерного варіанта в довкіллі. Основні ознаки, які доцільно враховувати під час біоінженерії діазотрофного інокулянта, подано в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2 - Пріоритетні ознаки, які слід враховувати під час біоінженерії діазотрофного інокулянта

Ознака	Практичне значення для зернових культур
Адгезія та біоплівкоутворення	Підвищує імовірність закріплення штаму на корені та стабілізує ранню колонізацію
Регуляція піф-кластерів	Дає змогу зберігати азотфіксацію за помірного азотного фону
Синтез фітогормонів	Покращує формування кореневої системи та поглинання елементів живлення
Стресостійкість	Підтримує ефект препарату за коливань вологості, температури й pH
Генетична стабільність	Забезпечує відтворюваність дії препарату у виробничих партіях

З методичної точки зору доцільним є поєднання двох підходів: по-перше, селекції та адаптації природних вітчизняних штамів із високою сумісністю із зерновими культурами; по-друге, точкового вдосконалення їх регуляторних мереж без створення надлишково складних конструкцій. Такий шлях, на мою думку, є реалістичнішим для вітчизняної агробіотехнології, ніж повна перебудова бактеріального геному. Він краще узгоджується з принципом поетапної валідації та спрощує подальше обґрунтування безпечності.

Отже, оцінка біобезпеки має розглядатися не як формальна завершальна перевірка, а як невід'ємна частина всієї логіки дослідження. Саме такий підхід

дозволяє поєднати високий науковий рівень дослідження з реальною можливістю його подальшого впровадження у виробництво.

Висновки до розділу 1

Отже, біологічна азотфіксація у зернових культур є реальним, але поки що неповністю реалізованим резервом підвищення агрономічної ефективності та екологічної сталості землеробства. Вітчизняні й зарубіжні дослідження доводять перспективність асоціативних діазотрофів, насамперед *A. brasilense*, однак також показують обмеження природних штамів.

Проведений огляд дає підстави стверджувати, що наступний крок розвитку цієї сфери пов'язаний із біоінженерією штамів та консорціумів, здатних поєднувати стабільну колонізацію кореня, підтримання nif-активності в умовах реального агрофону і комплексну стимуляцію росту рослин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ АНАЛІТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Інформаційна база та логіка дослідження

Оскільки робота має оглядово-аналітичний характер, базою дослідження стали наукові статті, огляди, дисертаційні праці та матеріали українських фахових видань, присвячені асоціативній азотфіксації у зернових культур. Під час добору джерел першочергову увагу було приділено публікаціям, у яких розглядалися системи "пшениця - *Azospirillum*", "тритикале - *Azospirillum*", "ячмінь - бактеріальні препарати" та сучасні біоінженерні підходи до керованої азотфіксації (Volkogon, 2018; Shakhovnina, 2020; Wen et al., 2021).

Аналітичний етап включав: 1) пошук джерел; 2) відбір робіт за релевантністю темі; 3) структурування даних за блоками - біологічні основи, вітчизняні результати, інженерні стратегії, практичні обмеження; 4) порівняння функціональних ознак бактерій; 5) синтез пропонованої моделі бактеріального інокулянта для зернових культур. Така логіка дала можливість перейти від простого огляду до створення цілісної аналітичної схеми.

Під час аналізу джерел я виходив із того, що перспективний бактеріальний агент для зернових має відповідати щонайменше п'яти критеріям: ефективна колонізація кореневої системи; наявність і стабільна реалізація азотфіксувального апарату; сумісність із фізіологією конкретної культури; здатність працювати за виробничих рівнів удобрення; технологічна придатність до препаративного оформлення та внесення. Саме ці критерії були покладені в основу наступних підрозділів.

2.2. Вибір базового бактеріального штаму та рослини-хазяїна

Як базовий бактеріальний штам для аналітичного дослідження доцільно обрати *Azospirillum brasilense*. Це рішення має кілька підстав. По-перше, саме цей вид є одним із найкраще вивчених асоціативних діазотрофів зернових культур. По-друге, для нього накопичено значний масив українських експериментальних даних щодо пшениці та тритикале. По-третє, *A. brasilense* поєднує здатність до азотфіксації з фітогормональною активністю, що дає змогу розраховувати на комплексний агробіологічний ефект (Shakhovnina et al., 2009; Shakhovnina et al., 2021; Vorobei et al., 2023).

Як модельну рослину-хазяїна у межах дослідження доцільно розглядати яру пшеницю або яре тритикале. Пшениця має найвище практичне значення для зернового господарства України, а тритикале є зручним об'єктом через наявність вагомого вітчизняного доробку щодо взаємодії з азоспірилами. Для подальших етапів дослідження можна закласти обидві культури: пшеницю - як основний виробничий об'єкт, тритикале - як модель для детального фізіолого-мікробіологічного аналізу.

Альтернативними штамми-основами для майбутнього розширення моделі можуть бути *Herbaspirillum seropedicae*, *Azoarcus sp.* або *Gluconacetobacter diazotrophicus*, оскільки для них описано виражене ендofітне заселення злаків. Проте для бакалаврської кваліфікаційної роботи вибір *A. brasilense* є найбільш логічним через кращу забезпеченість вітчизняними джерелами, вищу прикладну зрозумілість та відносну технологічну доступність. З урахуванням біологічних і технологічних вимог до майбутнього препарату було визначено пріоритетні ознаки перспективного інокулянта, які подані в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 - Пріоритетні ознаки перспективного інокулянта для зернових культур

Ознака	Її значення для інокулянта	Чому це важливо для зернових
Рання колонізація кореня	Забезпечує контакт бактерії з ексудатами та тканиною кореня	Попит на азот і стимуляцію росту виникає з перших фаз онтогенезу
Підтримання nif-активності на удобреному фоні	Дозволяє працювати в реальних технологіях вирощування	Більшість виробничих посівів зернових вирощують із внесенням азоту
Баланс фітогормонів	Стимулює кореневу систему без фізіологічного дисбалансу	Коренева архітектура визначає інтенсивність водо- і мінерального живлення
Технологічна стабільність	Дає змогу виготовити стандартний препарат	Польовий ефект неможливий без життєздатного інокулянта
Біобезпечність	Знижує регуляторні та екологічні ризики	Є обов'язковою умовою впровадження у відкритих агросистемах

2.3. Схема біоінженерії інокулянта

Схема біоінженерії перспективного інокулянта включає кілька послідовних модулів. Перший модуль - модуль колонізації. Він має забезпечити сильну позитивну хемотаксисну реакцію до компонентів корневих ексудатів пшениці або тритикале, інтенсивне прикріплення до ризоплани та формування стабільних мікроколоній. Функціонально це може досягатися за рахунок відбору або модифікації систем рухливості, адгезії, біоплівкоутворення та використання екзополісахаридів (Pereg et al., 2016; Haskett et al., 2022).

Другий модуль - модуль регульованої азотфіксації. Його головне завдання полягає в тому, щоб підтримувати активність nif-системи за умов, коли в ґрунті присутні субоптимальні концентрації мінерального азоту. Для цього у світовій практиці розглядають ослаблення азотної репресії, переключення регуляції на сигнали ризосфери, локальну індукцію в безпосередній близькості до кореня або розділення фаз росту й фіксації азоту (Ryu et al., 2020; Wen et al., 2021).

Третій модуль - модуль рослинкорисних супутніх функцій. Оскільки польовий ефект асоціативних діазотрофів часто є сумою кількох механізмів, доцільно передбачити стабільний синтез ауксинів у фізіологічно безпечних межах, продукцію сидерофорів, антиоксидантний захист клітини та, за можливості, помірну здатність до мобілізації фосфору. Це не повинно замінювати основну азотфіксувальну функцію, але має підвищувати адаптивність рослин у стресових умовах (Bashan et al., 2004; Vacheron et al., 2013).

Четвертий модуль - технологічний. Навіть найперспективніший штам не матиме практичної цінності без придатності до препаративного оформлення. Тому в дослідження необхідно включити вимоги до життєздатності при висушуванні або іммобілізації на носіях, стабільності титру під час зберігання, сумісності з протруйниками насіння та відтворюваності ефекту після внесення. Такі аспекти добре висвітлені в роботах про мікробні препарати та бактеріальні композиції для агросфери (Volkogon et al., 2020; Ulziizhargal, 2020).

2.4. Система оцінювання ефективності

Для подальшої експериментальної перевірки запропонованої моделі доцільно сформувати послідовну систему оцінювання. На першому етапі здійснюють мікробіологічну характеристику штаму: швидкість росту, життєздатність у препаративній формі, стійкість до температурних і осмотичних коливань, активність нітрогенази в стандартних умовах, продукцію ауксинів і здатність до біоплівкоутворення.

На другому етапі необхідні лабораторні тести взаємодії з рослиною: оцінка схожості та енергії проростання насіння після інокуляції, довжини кореня, кількості бічних коренів, маси проростків, а також колонізаційної здатності за допомогою культуральних, молекулярних або мікроскопічних підходів. Саме тут можна порівняти природний штам і його інженерний варіант.

Третій етап - вегетаційні дослід у контрольованих умовах із різними рівнями мінерального азоту. Такий підхід дозволяє встановити, чи зберігається перевага інженерного варіанта за умов, наближених до реального удобрення. Показниками ефективності мають бути вміст загального азоту в рослині, активність нітрогенази в кореневій зоні, вегетативна маса, площа листкової поверхні, вміст хлорофілу та елементи продуктивності.

Четвертий етап - дрібноділянкові польові випробування з обов'язковим порівнянням на природному й зниженому азотному фоні. Лише за таких умов можна об'єктивно оцінити, чи дає інженерна система реальну економію азотних добрив або приріст урожайності. Паралельно необхідно контролювати чисельність інтродукованого штаму у ризосфері протягом вегетації, оскільки саме вона часто пояснює відмінності між лабораторним і польовим результатом. Послідовність оцінювання ефективності інженерного штаму узагальнено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 - Послідовність оцінювання ефективності інженерного штаму

Етап	Що оцінюють	Основні показники
Лабораторний	Біологічні властивості штаму	Ріст, нітрогеназна активність, ауксини, біоплівка, стійкість
Тест на проростках	Початкову реакцію рослини	Схожість, довжина кореня, маса проростків, колонізація
Веgetаційний	Ефект за різних доз азоту	Біомаса, вміст азоту, хлорофіл, активність у кореневій зоні
Польовий	Агрономічну результативність	Урожайність, структура врожаю, окупність, стабільність ефекту

2.5. Принципи біобезпеки та поетапної валідації

Розроблення біоінженерних інокулянтів для аграрного використання неможливе без урахування принципів біобезпеки. Незалежно від конкретної генетичної конструкції, майбутній штам повинен бути не патогенним для рослин, тварин і людини, не містити небажаних маркерів антибіотикорезистентності для польового застосування, не демонструвати підвищеного ризику горизонтального перенесення критично важливих генів та мати контрольований життєвий цикл поза рослинним організмом.

Для цього вже на етапі дизайну слід обмежувати спектр використовуваних регуляторних елементів, уникати конструкцій із невизначеною стабільністю та передбачати молекулярні механізми контролю. Доцільно також оцінювати потенційний вплив інженерного штаму на структуру ґрунтового мікробіому, нітрифікаційні й денітрифікаційні процеси, а також на нецільові рослини в агроценозі. У практиці це означає, що мікробіологічна ефективність і біобезпека мають розглядатися як рівнозначні критерії відбору.

З організаційного погляду важливо закладати поетапність перевірки: спочатку замкнені лабораторні системи, далі вегетаційні досліді, а вже потім польові випробування за наявності відповідного регуляторного супроводу. Саме такий підхід дає змогу знизити ризики та зробити розробку прийнятною для впровадження у виробництво.

2.6. Бальна модель оцінювання перспективності кандидатного штаму

Для аналітичного зіставлення природних і потенційно інженерних варіантів мною запропоновано спрощену бальну модель, у якій кожна ознака оцінюється за шкалою від 1 до 10 з урахуванням її практичної ваги. До основних критеріїв віднесено інтенсивність колонізації, стабільність піф-активності, продукцію рослинкорисних метаболітів, технологічність культивування, сумісність із

передпосівною обробкою насіння та біобезпеку. Такий підхід не замінює повноцінного експерименту, але дозволяє прозоро показати, чому одні напрями вдосконалення є більш пріоритетними, ніж інші.

Перевага бальної моделі полягає в тому, що вона дає можливість звести в одну систему дуже різноманітні показники: від мікробіологічних до агротехнологічних. У дипломній роботі це особливо важливо, оскільки тема перебуває на стику аграрної мікробіології, молекулярної біології та технології виробництва біопрепаратів. Застосування такої моделі підсилює аналітичний характер роботи й створює підґрунтя для подальших графічних інтерпретацій у розділі 4.

Під час інтерпретації одержаних балів я виходив із принципу, що перспективний штам для зернових культур повинен не лише демонструвати високу активність у лабораторії, а й зберігати технологічну придатність у виробництві. Саме тому ознаки, пов'язані зі стабільністю препарату, витривалістю до стресу та відтворюваністю ефекту, були прирівняні за значущістю до суто азотфіксувальних характеристик. Запропоновану систему критеріїв для бальної оцінки перспективності кандидатного штаму наведено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 - Авторська система критеріїв для бальної оцінки перспективності штаму

Критерій	Вага, %	Пояснення
Колонізація кореня	20	Швидкість і стабільність заселення ризосфери/ендосфери
Азотфіксувальна активність	25	Здатність підтримувати піф-активність у функціональному діапазоні
Фітотропна дія	15	Синтез ІОК, сидерофорів, стимуляція коренеутворення
Стресостійкість	15	Стійкість до посухи, осмотичного та окиснювального стресу
Технологічність	15	Придатність до ферментації, стабілізації та зберігання
Біобезпека	10	Низький ризик небажаного поширення та генетичної нестабільності

Висновки до розділу 2

У другому розділі обґрунтовано логіку аналітичного дослідження і запропоновано модель створення перспективного бактеріального інокулянта для зернових культур на основі *A. brasilense*. Показано, що найважливішими елементами такої моделі є модулі колонізації, регульованої азотфіксації, супутніх рослинкорисних функцій і технологічної придатності.

Також сформовано систему критеріїв оцінювання майбутнього інженерного штаму: від мікробіологічних і фізіолого-біохімічних показників до польової ефективності й біобезпеки. Це створює основу для наступного аналітичного етапу - синтезу очікуваних результатів і формулювання практичних рекомендацій.

РОЗДІЛ 3

АНАЛІТИЧНЕ УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПРАКТИЧНОГО ВПРОВАДЖЕННЯ

3.1. Вітчизняний досвід використання діазотрофів у зернових культурах

Аналіз вітчизняних джерел показав, що найбільш системно в Україні вивчено асоціації зернових культур із бактеріями роду *Azospirillum*. Роботи О. В. Шаховніної та співавторів переконливо демонструють, що інокуляція пшениці й тритикале азоспірилами супроводжується не лише підвищенням потенційної нітрогеназної активності, а й активізацією біосинтетичних процесів у рослинах, поліпшенням морфологічних показників і зростанням продуктивності (Shakhovnina et al., 2009; Shakhovnina, 2020).

Особливо важливо, що дослідження вітчизняних учених акцентують увагу на сортоспецифічності ефекту. Для перспективних вітчизняних сортів ярого тритикале встановлено істотні відмінності у здатності підтримувати молекулярну фіксацію азоту в кореневій зоні, а це означає, що одна й та сама бактеріальна інокуляція не може автоматично переноситися на будь-який генотип рослини (Shakhovnina, 2011). Такий висновок напряду підтримує ідею таргетованої біоінженерії під конкретні сорти або селекційні групи.

У роботах, присвячених асоціації 'яра пшениця - *A. brasilense* B-7318', було показано, що навіть у межах одного виду бактерій окремі ізоляти мають специфічні біологічні властивості і по-різному взаємодіють із рослиною-хазяїном (Shakhovnina et al., 2021; Vorobei et al., 2023). Отже, для розроблення інженерного інокулянта доцільно використовувати не випадковий природний штам, а попередньо охарактеризований штам-основу з перевіреними колонізаційними та фізіолого-біохімічними ознаками.

Статті українських вчених щодо мікробних препаратів за різних систем удобрення також підтверджують, що ефективність бактеріальних агентів визначається не лише їхньою генетичною природою, а й технологією внесення, фоном мінерального живлення та здатністю зберігати життєздатність у препараті. Саме тому будь-який біоінженерний штам повинен розглядатися не ізольовано, а як майбутній компонент препарату з конкретною формою застосування. Ключові джерела, використані для аналітичного узагальнення теми, сформовано в таблиці 3.1. (Volkogon et al., 2020; Ulziizhargal, 2020).

Таблиця 3.1 - Узагальнення ключових вітчизняних джерел за темою роботи

Вітчизняне джерело	Культура	Основний висновок для теми роботи
Shakhovnina et al., 2009	Яра пшениця, яре тритикале	<i>Azospirillum</i> підвищує нітрогеназну активність і активізує біосинтетичні процеси
Shakhovnina, 2011	Яре тритикале	Фіксація азоту залежить від сорту, що підтверджує потребу в таргетованому підході
Shakhovnina, 2020	Яре тритикале	Асоціативні діазотрофи можуть підвищувати урожайність у виробничо цінних системах
Vorobei et al., 2023	Яра пшениця	Ефективність асоціації залежить від конкретного штаму <i>A. brasilense</i>
Volkogon et al., 2020	Різні культури	Результат мікробних препаратів визначається і системою удобрення, і препаративною формою

3.2. Цільові ознаки для інженерного вдосконалення штаму

На підставі узагальнення літератури можна сформулювати набір ознак, які слід вважати пріоритетними для інженерного удосконалення бактеріального агента. Перша ознака - висока здатність до ранньої колонізації насіннево-кореневого комплексу. Без цього неможливо забезпечити просторову близькість азотфіксації до рослини і тривалу присутність інокулянта в ризосфері.

Друга ознака - регульована та енергетично ефективна *nif*-активність. Для практичного землеробства недостатньо просто мати активну нітрогеназу в безазотному середовищі; потрібна система, яка зберігає роботу при помірних концентраціях нітратів, швидко перемикається на ризосферний режим метаболізму і не спричиняє надмірного енергетичного виснаження бактеріальної клітини (Ryu et al., 2020; Wen et al., 2021).

Третя ознака - баланс фітогормональної активності. У багатьох випадках саме ауксини, що продукуються азоспірилами, відповідальні за формування розгалуженої кореневої системи і, відповідно, за збільшення площі контакту рослини з мікроорганізмом. Проте надлишкова продукція фітогормонів може бути небажаною, тому інженерний штаму має підтримувати фізіологічно оптимальний рівень такої активності (Bashan et al., 2004; Vacheron et al., 2013).

Четверта ознака - висока стабільність у препаративній формі та сумісність з агротехнічними операціями. Для виробництва це означає, що штаму повинен витримувати короткочасне зберігання, протруювання або спільне нанесення з допоміжними компонентами, не втрачаючи життєздатності. П'ята ознака - біобезпечність, тобто відсутність небажаних властивостей, які можуть ускладнити регуляторне схвалення та польове використання.

Отже, аналіз цільових ознак показує, що ефективність майбутнього біоінженерного інокулянта визначається не однією властивістю, а поєднанням стабільної колонізації кореневої зони, контрольованої азотфіксувальної активності,

синтезу рістстимулювальних речовин, конкурентоздатності у ґрунтовому мікробіомі та біобезпечності. Саме комплекс цих характеристик доцільно використовувати як основу для добору або конструювання кандидатного штаму для зернових культур.

3.3. Модель перспективного інокулянта для зернових культур

З урахуванням проаналізованих даних мною запропоновано модель перспективного бактеріального інокулянта для зернових культур у двох можливих форматах. Перший формат - інженерний штам *A. brasilense* із посиленими ознаками колонізації та з удосконаленою регуляцією азотфіксації. Другий формат - двокомпонентний консорціум, де *A. brasilense* виконує основну діазотрофну та фітогормональну функцію, а партнерний штам забезпечує стабілізацію колонізації або мобілізацію інших елементів живлення.

У моноштамовій моделі ключовими характеристиками є: а) інтенсивний хемотаксис до корневих ексудатів пшениці чи тритикале; б) підвищене біоплівкоутворення на ризоплані; в) збереження піІ-активності на фоні помірного внесення азоту; г) збалансований синтез ауксинів; д) технологічна витривалість. Перевага такої моделі полягає у простішій стандартизації та контролі якості препарату.

Консорціумна модель передбачає розподіл функцій: перший компонент - *A. brasilense* як головний діазотроф, другий компонент - бактерія з вираженою адгезивною або фосфатмобілізувальною активністю. Такий підхід теоретично може дати вищу стабільність у полі, оскільки ризосфера злаків є надзвичайно конкурентним середовищем. Проте для консорціуму доведеться додатково відпрацьовувати сумісність штамів, їх співвідношення в препараті та відсутність антагонізму.

Перший етап біотехнологій раціональніше розпочинати з моноштамової моделі на основі *A. brasilense*, а консорціум розглядати як перспективу другого етапу. Це пов'язано з тим, що саме для азоспірилів в Україні накопичено найбільше матеріалу, який можна використати як основу для валідації аналітичних рішень.

3.4. Очікувана ефективність і схема валідації

Очікуваний агробіологічний ефект інженерного штаму слід розглядати не як повне заміщення мінерального азоту, а як інструмент часткової компенсації азотного живлення та стабілізації продуктивності рослин. За даними вітчизняних джерел, природні асоціативні діазотрофи вже здатні підвищувати врожайність зернових культур і поліпшувати фізіолого-біохімічні показники рослин (Shakhovnina, 2020; Vorobei et al., 2023). Біоінженерне підсилення має на меті зробити цей ефект більш відтворюваним у різних ґрунтово-кліматичних умовах.

Найбільш реалістичними критеріями успіху для майбутніх дослідів слід вважати: підвищення колонізації коренів порівняно з природним штамом; зростання активності нітрогенази на удобреному фоні; збільшення вмісту загального азоту в рослині; приріст маси кореневої системи; покращення окремих елементів структури врожаю. Лише сукупне покращення цих параметрів може свідчити про справді новий рівень ефективності інокулянта.

Для лабораторної та вегетаційної валідації доцільно застосовувати порівняння чотирьох варіантів: контроль без інокуляції; природний штам; інженерний штам; інженерний штам на зниженому азотному фоні. Така схема дає змогу відповісти на головне практичне питання: чи здатна інженерна система не лише стимулювати ріст, а й зменшувати залежність рослини від мінерального азоту без втрати врожайності.

Окремо слід наголосити, що позитивні результати мають бути статистично підтвердженими та відтворюваними. Для цього важливо закладати достатню

кількість повторень, оцінювати міжсезонну мінливість ефекту та проводити випробування мінімум на двох сортах однієї культури. Саме повторюваність є тим критерієм, який відрізняє перспективний біопрепарат від одноразового вдалого лабораторного результату.

3.5. Перспективи та ризики впровадження в Україні

Перспективи впровадження біоінженерних діазотрофів в Україні пов'язані з кількома факторами. Перший - висока частка зернових культур у структурі посівних площ, що створює великий ринок для інноваційних бактеріальних препаратів. Другий - наявність власної наукової школи аграрної мікробіології та напрацьованих колекцій корисних штамів. Третій - зростання інтересу до біологізації землеробства та зниження надмірного використання мінеральних добрив (Volkogon, 2018; Volkogon et al., 2020).

Разом із тим необхідно враховувати й ризики. До науково-технічних ризиків належать нестабільність інженерної конструкції, втрата селективної переваги в полі, метаболічне навантаження на клітину та непередбачувана взаємодія з ґрунтовим мікробіомом. До технологічних ризиків - складність масштабування ферментації, зниження життєздатності під час зберігання, несумісність із поширеними технологіями передпосівної обробки насіння.

Окрему групу становлять регуляторні та комунікаційні ризики. Біоінженерні мікроорганізми потребують чіткої системи оцінки безпеки та суспільної довіри, особливо коли йдеться про внесення в агроценози відкритого типу. Тому розробка має супроводжуватися прозорою доказовою базою, поетапним тестуванням і зрозумілим поясненням практичних переваг і обмежень.

З огляду на це, найбільш реалістичною стратегією для України є поєднання селекції та скринінгу природних вітчизняних ізолятів із обережним впровадженням інженерних елементів, спрямованих насамперед на регуляцію азотфіксації та

колонізації. Основні ризики, які можуть виникати під час розроблення та впровадження біоінженерного інокулянта, наведено в таблиці 3.2. Такий підхід дозволяє знизити ризик технологічної невдачі та опиратися на вже наявний науковий фундамент.

Таблиця 3.2 - Основні ризики розробки та впровадження біоінженерного інокулянта

Ризик	Ймовірний прояв	Спосіб мінімізації
Втрата ефективності в полі	Штам не конкурує з автохтонною мікробіотою	Підсилення ознак колонізації, тестування на місцевих ґрунтах
Надмірне метаболічне навантаження	Зниження життєздатності та титру	Балансувати регуляцію піф-системи і допоміжних функцій
Нестабільність препарату	Швидке падіння чисельності під час зберігання	Оптимізація носія та режиму сушіння/зберігання
Біобезпекові зауваження	Обмеження польового застосування	Поетапна оцінка безпеки та відмова від небажаних маркерів

Висновки до розділу 3

У третьому розділі узагальнено вітчизняний досвід використання діазотрофів у зернових культурах і визначено основні ознаки, які мають значення для створення ефективного інокулянта. Показано, що перспективний бактеріальний препарат повинен поєднувати азотфіксувальну активність, стабільну колонізацію кореневої системи, фітотропну дію та біобезпечність.

Також встановлено, що практичне впровадження біоінженерного інокулянта в Україні є перспективним, але потребує поетапної перевірки в лабораторних, вегетаційних і польових умовах. Найбільш доцільним є підхід, за якого природні властивості вітчизняних штамів поєднуються з сучасними біоінженерними методами.

РОЗДІЛ 4

ГРАФІЧНО-АНАЛІТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МОДЕЛІ БІОІНЖЕНЕРНОГО ІНОКУЛЯНТА

4.1. Графічна інтерпретація ключових біотехнологічних ознак

На попередніх етапах роботи було показано, що для зернових культур вирішальне значення має не одна окрема властивість бактерії, а поєднання кількох функціональних блоків. Щоб наочно представити цю ідею, у розділі 4 використано графічно-аналітичний підхід, за якого результати літературного узагальнення переводяться у візуальні схеми, діаграми та матриці. Це дає можливість чіткіше показати взаємозв'язки між колонізацією кореня, азотфіксацією, стресостійкістю та технологічною придатністю майбутнього препарату.

Побудовані нижче графіки не є прямими експериментальними даними однієї серії дослідів. Вони є аналітичними моделями, сформованими мною на основі зіставлення опублікованих результатів, передусім українських джерел, і тому виконують у дипломній роботі подвійну функцію: по-перше, узагальнюють великий масив літератури; по-друге, демонструють логіку відбору ознак для подальшої біоінженерії.

На рис. 4.1 наведено порівняльний профіль найперспективніших бактеріальних агентів для зернових культур. Із нього видно, що за інтегральним поєднанням ознак найбільш збалансованою платформою залишається *Azospirillum*, тоді як консорціальний підхід теоретично дозволяє досягти ще вищої сукупної ефективності, але ціною більшої технологічної складності та потреби у точнішому контролі складу препарату.

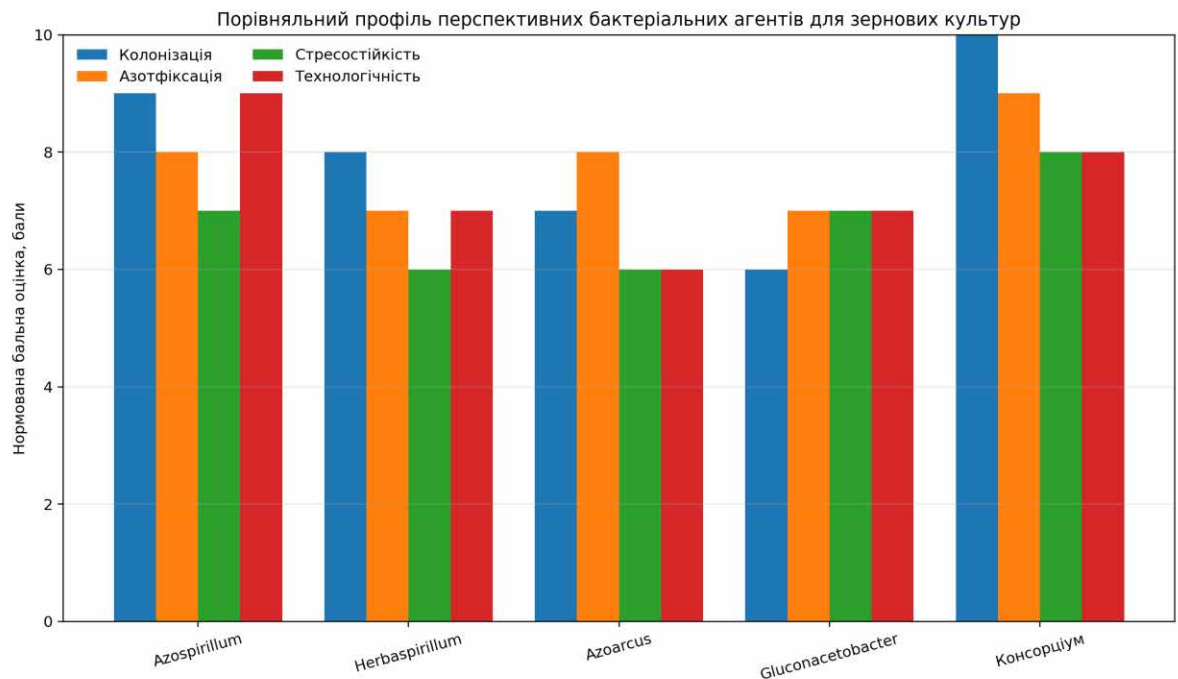


Рис. 4.1. Порівняльний профіль перспективних бактеріальних агентів для зернових культур за авторською бальною оцінкою.

Отже, для реальних вітчизняних умов оптимальною виглядає стратегія, за якої як базовий бактеріальний штам використовується *A. brasilense* або близький до нього діазотроф, а інші функції посилюються адресно - через селекцію, адаптацію або точкову генетичну модифікацію. Така стратегія є більш технологічною, ніж повне перенесення функцій у новий вид мікроорганізму, і краще відповідає практичним потребам агровиробництва.

Водночас візуальна модель підтверджує, що проста орієнтація лише на нітрогеназну активність є недостатньою. Якщо штам поступається за колонізацією або стабільністю, кінцевий польовий результат буде нижчим, навіть за високих лабораторних показників. Саме тому графічний підхід допомагає уникнути спрощення й підкреслює комплексний характер проблеми.

4.2. Моделювання ефекту біоінженерного інокулянта за різних азотних фонів

Оскільки зернові культури в реальному виробництві вирощують на різних фонах азотного живлення, оцінка інокулянта без урахування цього чинника була б неповною. У роботі змодельовано очікувану відносну прибавку врожайності в залежності від дози мінерального азоту для трьох стратегій: використання природного штаму, біоінженерного штаму та функціонального консорціуму. Такий підхід дозволяє показати не лише потенціал препарату, а й межі його доцільного застосування.

Рисунок 4.2 демонструє закономірність, яка добре узгоджується з літературними даними: максимальний внесок азотфіксувальних бактерій спостерігається за низького або помірного азотного фону, тоді як надмірне мінеральне живлення пригнічує переваги інокуляції. Проте для біоінженерного варіанта крива спадає повільніше, що відображає очікуване послаблення негативного зворотного зв'язку між доступним азотом і піф-активністю.

З практичної точки зору це означає, що інокулянт нового покоління не обов'язково повинен повністю замінювати азотне добриво. Значно реалістичнішою є модель часткової компенсації, за якої біологічний агент підвищує коефіцієнт використання внесеного азоту, підтримує ранній ріст і дає змогу без втрати продуктивності знизити мінеральне навантаження. Саме такий компроміс між біологічною та мінеральною складовими є найбільш переконливим для сучасного агровиробника.

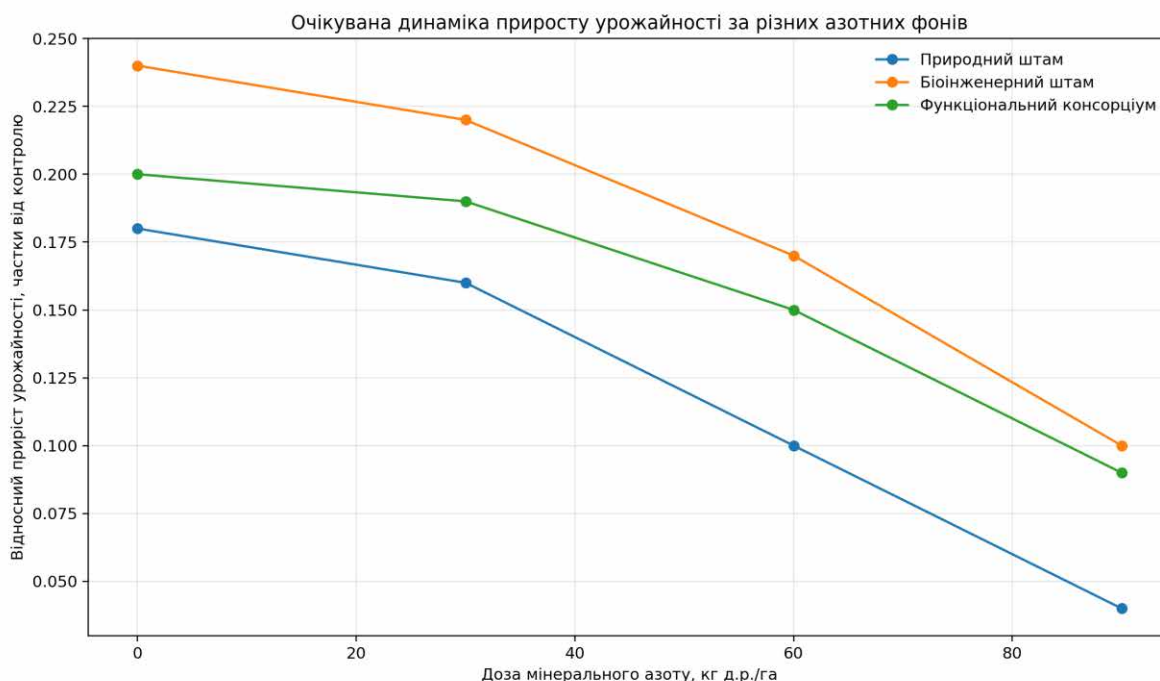


Рис. 4.2. Очікувана динаміка приросту урожайності зернових культур при використанні інокулянтів за різних азотних фонів.

Додаткова графічна інтерпретація сценаріїв часткової заміни мінерального азоту наведена на рис. 4.3. Вона показує, що навіть за консервативних припущень поєднання інокуляції з 70-80 % стандартної дози азотних добрив є потенційно вигіднішим, ніж збереження контролю з повною нормою N. Для біоінженерного препарату цей ефект є виразнішим завдяки вищій стабільності та повторюваності дії.

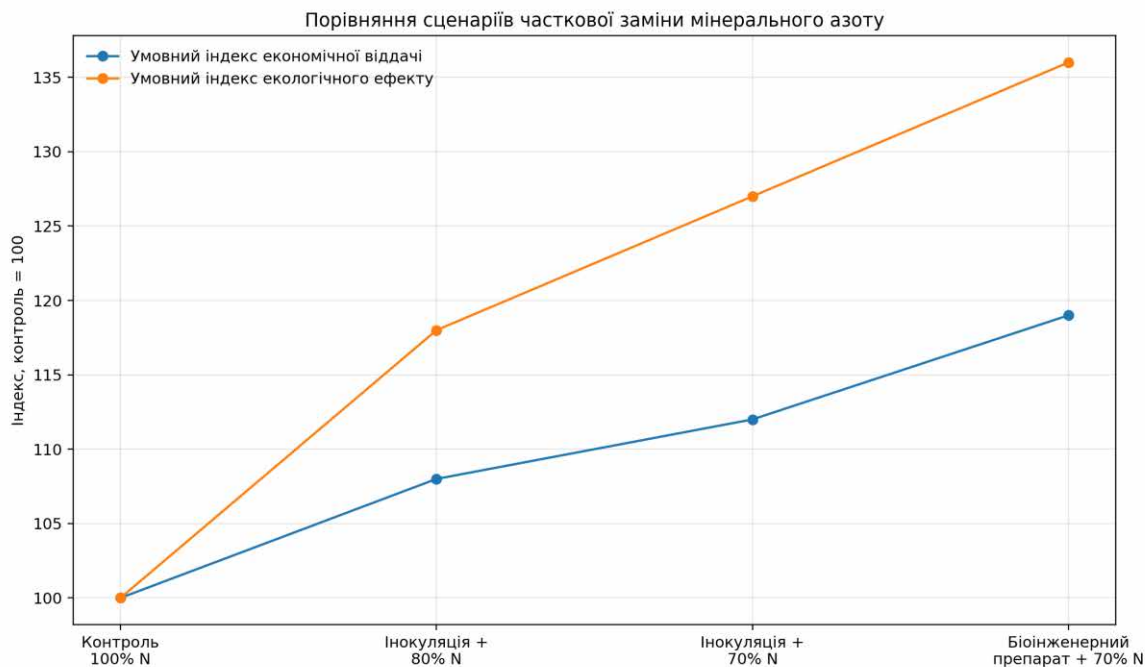


Рис. 4.3. Порівняння умовної економічної та екологічної віддачі за різних сценаріїв використання інокулянта.

4.3. Схема конструювання та валідації інокулянта

Завдання біоінженерії у цій роботі розглянуто не як абстрактне редагування геному, а як послідовний маршрут створення продукту з прогнозованими властивостями. На рис. 4.4 подано логіку конструювання інокулянта, яка включає вибір базового штаму, підсилення колонізаційних ознак, оптимізацію регуляції азотфіксації та багаторівневу валідацію. Кожен етап повинен завершуватися контрольними точками, після яких приймають рішення про перехід до наступної стадії або повернення на попередній рівень оптимізації.

Особливо важливим є те, що валідація не повинна переноситися лише на фінальний етап. Якщо перспективний штам не проходить тести на ранню колонізацію або демонструє високу варіабельність між повторами вже на рівні проростків, доцільніше зупинити його просування ще до початку дорогих польових дослідів. Саме тому в аналітичній моделі значну увагу приділено матриці

пріоритетності показників, де для кожної стадії визначено, які критерії є ключовими. Матрицю пріоритетності показників на різних етапах валідації інокулянта наведено на рис. 4.5

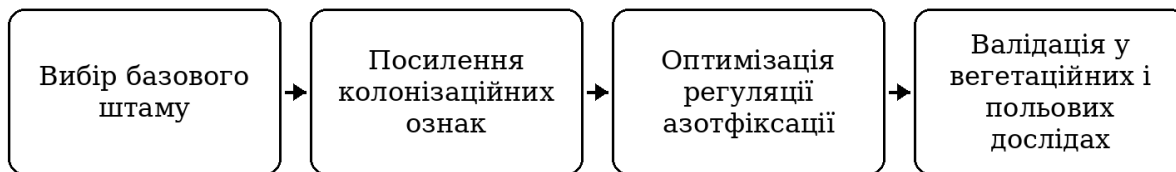


Рис. 4.4. Логіка конструювання біоінженерного інокулянта нового покоління.

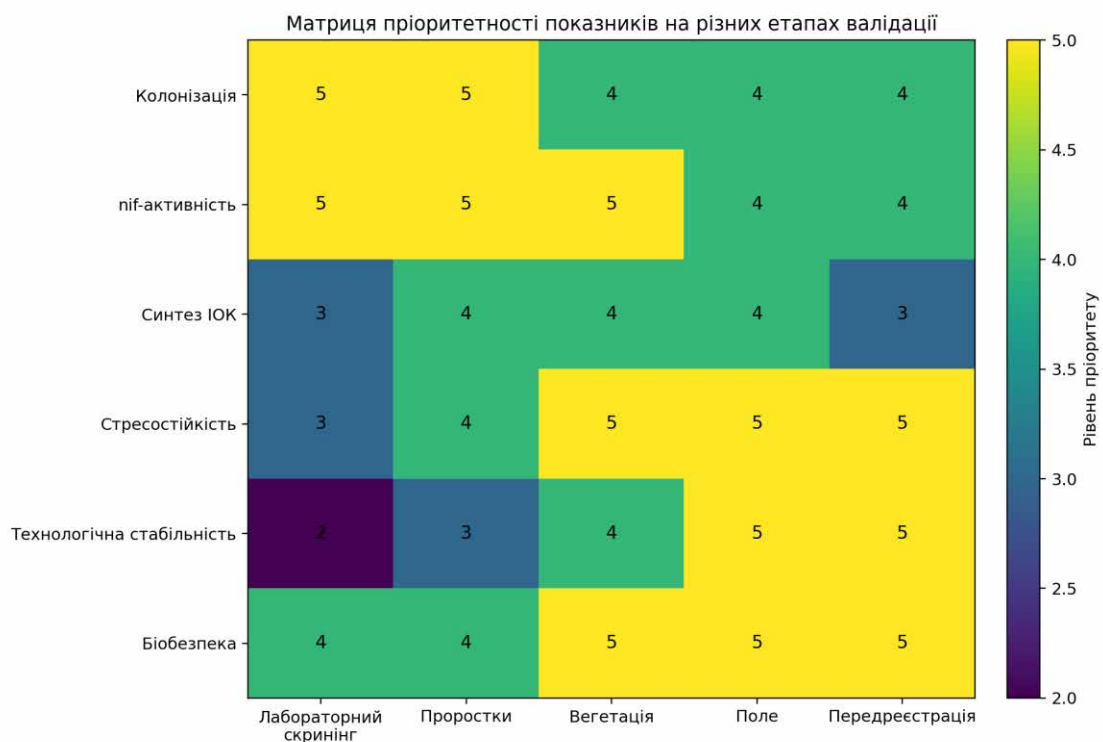


Рис. 4.5. Матриця пріоритетності показників на різних етапах валідації інокулянта.

Виходячи з наведеної моделі, до лабораторно-оранжерейного етапу слід включати не лише стандартні мікробіологічні показники, а й кількісну оцінку архітектури кореня, швидкості заселення внутрішніх тканин, а також реакції

рослини на комбіновану дію бактерії й азотного фону. Такий підхід дає можливість відсіяти варіанти, ефект яких ґрунтується лише на одному механізмі, тоді як для зернових культур більш цінними є мультимодальні штами.

Можна стверджувати, що саме поєднання графічної схеми конструювання з матрицею валідації робить аналітичну частину роботи більш переконливою. У ній показано, що сучасна біоінженерія бактеріальних інокулянтів для злаків є не одноразовою маніпуляцією, а системою керованих рішень, у якій однаково важливими є молекулярний, фізіологічний і виробничий рівні.

4.4. Технологічний маршрут виробництва та контролю якості

Для того щоб запропонована концепція не залишалася суто теоретичною, у роботі окремо узагальнено технологічний маршрут виробництва бактеріального препарату. Його доцільно починати зі скринінгу й паспортизації вихідного штаму, після чого проводити поетапне вдосконалення, контроль біобезпеки, ферментацію, стабілізацію та перевірку життєздатності у готовій формі. Особливу увагу слід приділити сумісності препарату з протруйниками, прилипаками та режимами передпосівної обробки насіння.

У вітчизняних умовах технологічність часто є таким самим вузьким місцем, як і власне біологічна ефективність. Бактерія може бути перспективною за результатами вегетаційного дослідження, але втрачати життєздатність під час масштабування ферментації або зберігання. Тому в аналітичній моделі препарату ця ознака навмисно винесена в окремий блок. На практиці це означає необхідність паралельної роботи біологів і технологів вже на ранніх стадіях створення продукту.

Система контролю якості повинна включати мікробіологічну чистоту, кількість життєздатних клітин, стабільність ключових фенотипових ознак, відсутність небажаних змін у профілі росту та підтвердження функціональної активності принаймні в модельному тесті на рослині-хазяїні. На мою думку, саме

наявність короткого, але відтворюваного біотесту має стати обов'язковою ланкою між виробничою ділянкою та польовим застосуванням. Технологічну схему створення та виробництва бактеріального препарату для зернових культур подано на рис. 4.6

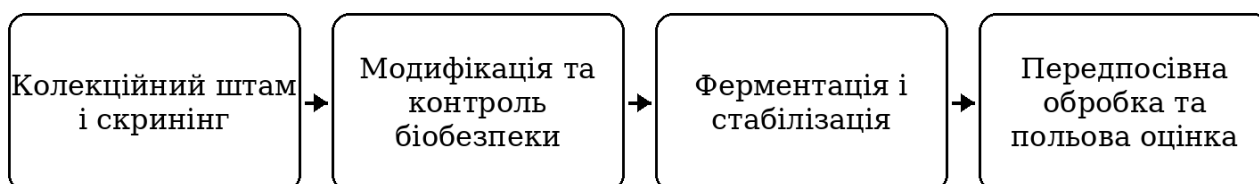


Рис. 4.6. Технологічна схема створення та виробництва бактеріального препарату для зернових культур.

4.5. Сценарії практичного впровадження біоінженерного інокулянта в Україні

Окремого розгляду потребує питання, за яких саме сценаріїв такий препарат буде найбільш доречним для українського землеробства. На підставі узагальнення джерел можна виділити щонайменше три пріоритетні ніші: 1) господарства з помірним рівнем мінерального удобрення, які прагнуть знизити собівартість; 2) системи вирощування, де важливо стабілізувати ранній ріст культури в умовах стресу; 3) технології з підвищеними вимогами до екологічної безпеки й раціонального використання азоту.

Для високотехнологічного інтенсивного землеробства інокулянт також може бути корисним, але його функція змінюється: замість прямої «заміни» добрива він працює як інструмент підвищення коефіцієнта використання азоту та стабілізації продуктивності за мінливих погодних умов. Саме цей підхід має найбільший шанс бути сприйнятим аграрним бізнесом, оскільки він не вимагає радикальної перебудови всієї системи удобрення.

На рис. 4.7 подано орієнтовний календар реалізації розроблення препарату. Він показує, що навіть за оптимістичного сценарію шлях від вибору штаму до підготовки реєстраційного досьє є багатостадійним. Це ще раз підтверджує, що біоінженерія азотфіксувальних бактерій для зернових культур є не одноразовим експериментом, а довгостроковою програмою досліджень і валідації.

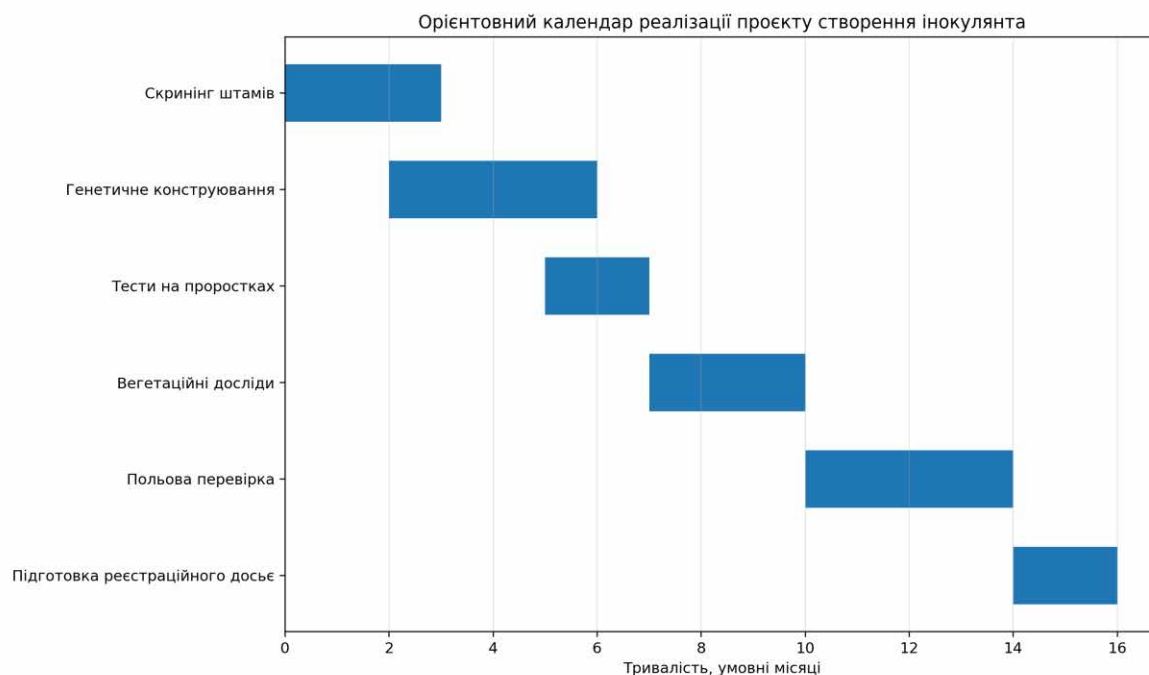


Рис. 4.7. Орієнтовний календар реалізації розроблення біоінженерного бактеріального інокулянта.

Для повноти оцінки доцільно враховувати й ризики, що супроводжують кожний етап розробки. Матриця ризиків на рис. 4.8 показує, що найкритичнішими залишаються генотип-залежний характер відповіді культури, зниження піф-активності за підвищеного азотного фону та втрата конкурентоздатності штаму в полі. Саме ці пункти слід розглядати як головні об'єкти подальшого експериментального дослідження.

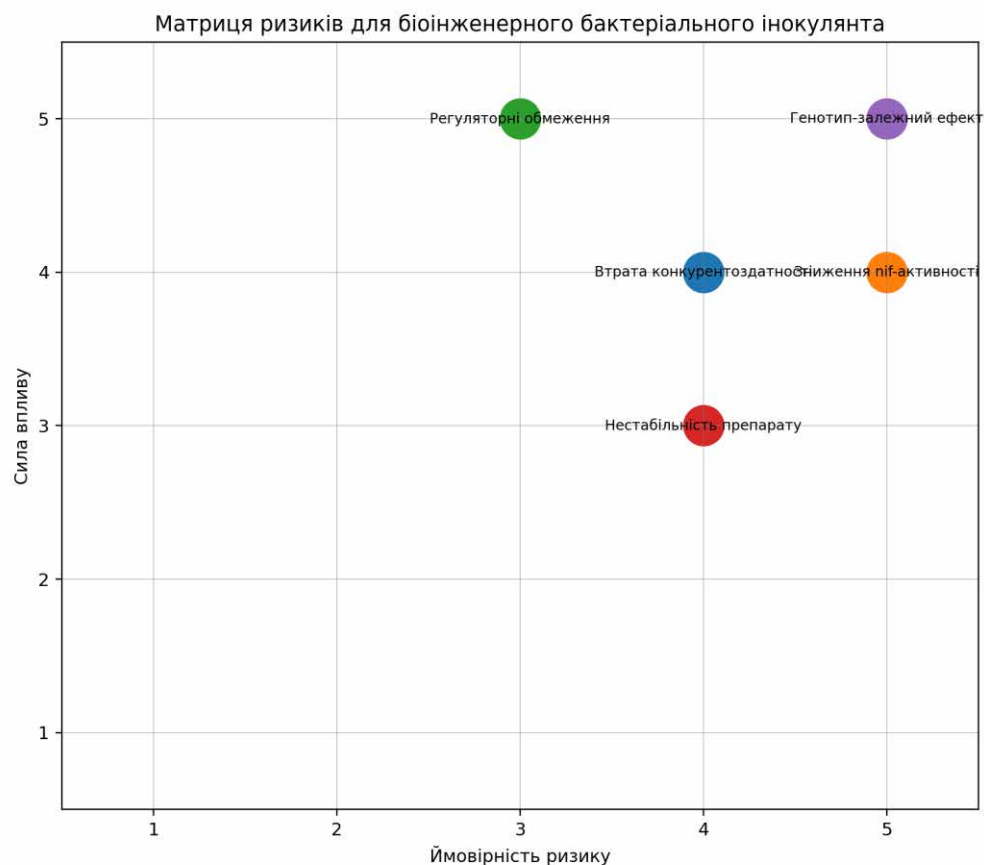


Рис. 4.8. Матриця ризиків для біоінженерного бактеріального інокулянта.

4.6. Практичний чек-лист відбору кандидатного штаму

Для зручності практичного використання отриманих висновків мною також сформовано стислий набір критеріїв, які можуть бути використані як чек-лист під час ухвалення рішення про подальше просування штаму до польових випробувань. Такий чек-лист наведено в таблиці 4.1 і включає біологічні, технологічні та регуляторні параметри.

Запропонована таблиця показує, що навіть за добрих мікробіологічних показників інокулянт не слід вважати готовим до широкого застосування без перевірки сумісності з агротехнологією, стабільності препаративної форми та відповідності базовим критеріям біобезпеки. Цим підкреслюється практична спрямованість дипломної роботи.

Таблиця 4.1 - Практичний чек-лист відбору кандидатного штаму для польових досліджень

Критерій рішення	Ознака готовності до наступного етапу
Колонізація кореня	Стабільне перевищення контролю не менш як у 2 повторних тестах
nif-активність	Підтримання активності на помірному азотному фоні
Фітотропна дія	Позитивний вплив на кореневу систему без ознак пригнічення росту
Технологічність	Висока життєздатність після ферментації та зберігання
Біобезпека	Відсутність ознак небажаної нестабільності та непрогнозованої поведінки

Висновки до розділу 4

У четвертому розділі графічно й аналітично обґрунтовано, що найбільш перспективною платформою для створення інокулянта нового покоління є штам на основі *Azospirillum* або функціонально збалансований консорціум, у якому поєднуються властивості стабільної колонізації, помірно незалежної від азотного фону nif-активності та технологічної придатності.

Побудовані графіки, схеми та матриці показали, що практична цінність інокулянта зростає за умов часткової, а не повної заміни мінерального азоту, а також за орієнтації на повторюваність ефекту й виробничу стабільність. Саме тому графічна частина роботи підтверджує головний висновок дипломного дослідження: успішний бактеріальний препарат для зернових культур має бути продуктом комплексної біоінженерії, а не носієм однієї ізольованої ознаки.

ВИСНОВКИ

1. У роботі встановлено, що біологічна азотфіксація у зернових культур є перспективним напрямом зниження залежності агроценозів від мінеральних азотних добрив, однак природні асоціативні діазотрофи поки що не забезпечують стабільно високого і відтворюваного ефекту в усіх виробничих умовах.

2. Показано, що для зернових культур найбільший практичний інтерес становлять асоціативні та ендоефітні бактерії, насамперед представники роду *Azospirillum*. Вітчизняні дослідження на пшениці та тритикале підтверджують здатність цих мікроорганізмів посилювати нітрогеназну активність, стимулювати ріст кореневої системи й підвищувати продуктивність рослин.

3. Встановлено, що головними обмеженнями традиційних інокулянтів є залежність ефекту від генотипу рослини, зниження активності за наявності мінерального азоту, нестабільна колонізація коренів і недостатня конкурентоздатність інтродукованих штамів у ґрунтовому середовищі.

4. Узагальнення сучасних джерел дало змогу визначити основні напрями біоінженерії симбіотичних та асоціативних бактерій для зернових культур: оптимізація регуляції піф-кластерів, підсилення систем колонізації, конструювання рослиннокерованих генетичних схем та створення функціональних бактеріальних консорціумів.

5. Науково обґрунтовано модель перспективного інокулянта для зернових культур на основі *A. brasilense*, який повинен поєднувати посилену ранню колонізацію кореня, підтримання азотфіксувальної активності на помірному азотному фоні, збалансований синтез рослинкорисних метаболітів і технологічну придатність до препаративного оформлення.

6. Запропоновано систему оцінювання ефективності майбутнього інженерного штаму, що охоплює мікробіологічні, фізіолого-біохімічні, вегетаційні та польові показники, а також критерії біобезпеки. Саме така багаторівнева схема

дозволить відокремити справді перспективні рішення від локальних або випадкових ефектів.

7. Практичним підсумком роботи є висновок про доцільність поєднання вітчизняного досвіду селекції та скринінгу діазотрофів із сучасними підходами синтетичної біології. На мою думку, саме така стратегія є найреалістичнішою для створення в Україні бактеріальних інокулянтів нового покоління для пшениці, тритикале, ячменю та інших зернових культур.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology, 50(8), 521-577. <https://doi.org/10.1139/w04-035>
2. Beatty, P. H., & Good, A. G. (2011). Future prospects for cereals that fix nitrogen. Science, 333(6041), 416-417. <https://doi.org/10.1126/science.1209467>
3. Bloch, S. E., Ryu, M.-H., Ozaydin, B., & Broglie, R. (2020). Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. Current Opinion in Biotechnology, 62, 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.024>
4. Guo, J., Wang, Y., Song, C., Zhou, J., Qiu, D., & Oldroyd, G. E. D. (2023). Biological nitrogen fixation in cereal crops: Progress, strategies, and perspectives. Plant Communications, 4(2), 100499. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100499>
5. Haskett, T. L., Poole, P. S., O'Callaghan, M., & Ronson, C. W. (2022). Engineered plant control of associative nitrogen fixation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 119(16), e2117465119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117465119>
6. Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. Plants, 9(1), 97. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
7. Oldroyd, G. E. D., & Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. Current Opinion in Biotechnology, 26, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.006>
8. Pereg, L., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2016). Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. Plant and Soil, 399(1-2), 389-414. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-z>

9. Rogers, C., & Oldroyd, G. E. D. (2014). Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *Journal of Experimental Botany*, 65(8), 1939-1946. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru098>
10. Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C., & Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen fixation in cereals. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>
11. Ryu, M.-H., Zhang, J., Toth, T., Khokhani, D., Geddes, B. A., Mus, F., Garcia Costas, A., Peters, J. W., Poole, P., & Ané, J.-M. (2020). Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. *Nature Microbiology*, 5(2), 314-330. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0631-2>
12. Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
13. Wen, J., Beatty, P. H., & Good, A. G. (2021). Enabling biological nitrogen fixation for cereal crops in fertilized fields. *ACS Synthetic Biology*, 10(12), 3264-3277. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00049>
14. Volkogon, V. V. (2018). Agricultural microbiology in Ukraine: Achievements, problems, and prospects. *Bulletin of Agricultural Science*, 11, 20-27. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201811-03>
15. Volkogon, V. V., Nadkernychna, O. V., Tokmakova, L. M., Melnychuk, T. M., Chaikovska, L. O., Tytova, L. V., Leonova, N. O., & Kopylov, Ye. P. (2020). Efficiency of microbial preparations under different fertilization systems of agricultural crops. *Bulletin of Agricultural Science*, 98(6), 5-13. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202006-01>

16. Vorobei, N. A., Pylypenko, L. A., Shakhovna, O. V., & Nadkernychna, O. V. (2023). Efficiency of the spring wheat - *Azospirillum brasilense* B-7318 association. *Agricultural Microbiology*, 37, 48-60. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.37.48-60>
17. Patyka, V. F., Nadkernychna, O. V., & Shakhovna, O. V. (2015). Influence of *Azospirillum brasilense* 10/1 on associative nitrogen fixation and intraspecific polymorphism of spring triticale. *Microbiological Journal*, 77(5), 29-36. <https://microbiolj.org.ua/ua/archiv/2015-tom-77/5-sep-oct-tom-77>
18. Selinnyi, V., Rudyk, I., & Yashchuk, V. (2025). Effect of wheat seed inoculation with agronomically beneficial bacteria on biometric and physiological parameters of plants. *Ukrainian Journal of Natural Sciences*, 13, Article 28. <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.13.2025.28>
19. Shakhovna, O. V., Nadkernychna, O. V., & Patyka, V. F. (2009). Influence of bacteria of the genus *Azospirillum* on potential nitrogenase activity and biosynthetic processes in spring triticale plants. *Agricultural Microbiology*, 10, 95-103.
20. Shakhovna, O. V. (2011). Molecular nitrogen fixation in the root zone of promising domestic spring triticale varieties. *Scientific Reports of NULES of Ukraine*, 7. https://nd.nubip.edu.ua/2011_7/11sov.pdf
21. Shakhovna, O. V. (2020). Efficiency of using associative diazotrophs to increase spring triticale yield. *Bulletin of Agricultural Science*, 98(7), 23-31. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202007-03>
22. Shakhovna, O. V., Pylypenko, L. A., Vorobei, N. A., & Nadkernychna, O. V. (2021). Biological properties of the diazotroph *Azospirillum brasilense* isolated from spring triticale roots. *Agricultural Microbiology*, 34, 31-40. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.34.31-40>

23. Ulziizhargal, E. (2020). Biotechnology of the use of the nanocomposite bacterial preparation Azogran and its protective role in the barley agroecosystem. *Agricultural Microbiology*, 31, 70-79. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.31.70-79>