

СУЧАСНІ НАПРЯМИ ОПТИМІЗАЦІЇ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ІНОКУЛЯНТІВ НА ОСНОВІ *BRADYRHIZOBIUM SP.*

Литовчак К.Р.

КШ ім. І. Сікорського, ksenialitovcak@gmail.com

Abstract

Bradyrhizobium-based inoculants enhance soybean (*Glycine hispida* Maxim.) growth by boosting nitrogen fixation. Optimization of cultivation media via carbon sources, amino acids, and isoflavones improves bacterial activity and symbiosis. These findings aid in developing efficient inoculants for sustainable agriculture.

Keywords: *Bradyrhizobium*, inoculant, soybean, cultivation media, isoflavones.

Вступ. Соя (*Glycine hispida* Maxim.) – одна з найважливіших сільськогосподарських культур, що забезпечує потреби у їжі, кормах та промислових матеріалах завдяки високому вмісту білків, олії та інших поживних речовин [1]. Вона використовується для виробництва соєвого молока, тофу, соусу, а також як джерело рослинного білка для вегетаріанських та веганських страв. Крім того, соя застосовується у виробництві біопалива, пластику та фарб [2]. Зростання кількості населення та попиту на білкові продукти робить сою стратегічно важливою для продовольчої безпеки. Для підвищення врожайності та зменшення залежності від хімічних добрив ключове значення мають інокулянти, які забезпечують ефективну симбіотичну азотфіксацію [3].

Азотфіксація є ключовим біологічним процесом, завдяки якому рослини отримують доступний азот для синтезу білків, амінокислот, нуклеїнових кислот та інших життєво важливих сполук [4]. Окремі роди азотфіксуючих бактерій, зокрема *Bradyrhizobium*, здатні вступати у симбіотичну взаємодію з бобовими рослинами, зокрема соєю (*Glycine hispida* Maxim.), утворюючи на їхніх коренях спеціалізовані структури — бульбочки. Цей процес відомий як нодуляція (від англ. nodulation). У середині бульбочок бактерії перетворюють атмосферний азот (N_2) на аміак (NH_3), який у подальшому асимілюється рослиною. Саме завдяки симбіотичній азотфіксації соя може рости на ґрунтах із низьким вмістом доступного азоту, що дозволяє зменшити потребу у внесенні мінеральних добрив, знижує витрати на агровиробництво та запобігає забрудненню ґрунтів нітратами [5].

Ефективна нодуляція дозволяє зменшити використання штучних азотних добрив, що не лише знижує витрати на вирощування сої, але й покращує екологічний стан ґрунтів, запобігаючи їх забрудненню нітратами [5].

Зважаючи на ефективність застосування інокулянтів на основі *Bradyrhizobium sp.*, масштабування їх біотехнологічного виробництва є вкрай доцільним і актуальним з огляду на потребу у сталому агровиробництві та зниженні залежності від мінеральних добрив.

Отже, метою роботи є огляд сучасних підходів до оптимізації поживних середовищ для культивування бактерій роду *Bradyrhizobium*, зокрема аналіз компонентів, що найбільш сприяють росту, біомасоутворенню та симбіотичній

активності, з подальшою можливістю застосування цих даних у розробці ефективних інокулянтів.

Матеріали та методи. Для визначення та аналізу поживних речовин необхідних для успішного культивування бактерій роду *Bradyrhizobium*, було здійснено порівняльний аналіз наукових публікацій, що охоплюють підходи до оптимізації поживних середовищ для культивування *Bradyrhizobium* sp. Опрацьовано джерела з баз даних Scopus, PubMed, Google Scholar, а також профільні монографії та вітчизняні наукові праці [6–13].

Результати та обговорення. Бактерії роду *Bradyrhizobium* зазвичай потребують наступних компонентів у середовищі культивування: джерело вуглецю, джерело азоту, неорганічні солі, мікроелементи та буферні системи для підтримки рН на рівні 6,5–7,0. Ці потреби чудово забезпечують базові середовища, такі як дріжджово-манітне, що містить маніт, дріжджовий екстракт і необхідні солі, такі як дигідрофосфат калію (K_2HPO_4), сульфат магнію семиводний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) та хлорид натрію (NaCl) [6]. Також розповсюдженим у використанні є триптон-дріжджове середовище, яке включає триптон і солі кальцію для підтримки росту [7]. В таких умовах бактерії утворюють слизові колонії білого або кремового кольору, активно фіксують азот та синтезують біологічно активні сполуки [6, 7].

Дослідження щодо оптимізації середовищ для *Bradyrhizobium* зосереджені на покращенні росту, виживаності та ефективності інокулянтів. Першим напрямком модифікації середовища можна вважати зміну джерела вуглецю. Як свідчать дослідження авторів Streeter [8] та Keyser [9], маніт є оптимальним джерелом вуглеводів для культивування *Bradyrhizobium*, забезпечуючи максимальний ріст бактерій, стабільність середовища та високу азотфіксаційну активність. Його заміна в стандартних середовищах є надзвичайно обмеженою через відсутність альтернативних джерел вуглецю зі порівнянною ефективністю.

Проте, робота Rao [10], свідчить про ефективність використання гліцерину, тому перспективним напрямом модифікації середовищ може бути його поєднання з манітом. Що стосується глюкози, то за даними роботи Keyser [9], її використання є нерентабельним через швидке закислення середовища, пригнічення росту бактерій та необхідність додаткового буферування, що значно підвищує собівартість культивування.

Наступним напрямком досліджень щодо оптимізації середовищ для отримання біомаси *Bradyrhizobium* складають статті, які містять в собі аналіз впливу амінокислот на ріст, стресостійкість та симбіотичну ефективність бактерій. Важливим напрямком модифікації є додавання триптофану як ключового попередника синтезу індол-3-оцтової кислоти. Індол-3-оцтова кислота (ІОК) – це природний рослинний гормон з групи ауксинів, який відіграє ключову роль у регуляції росту та розвитку рослин. Вона контролює такі процеси, як подовження клітин рослин, коренеутворення, фототропізм та органогенез (наприклад, формування бульбочок у бобових) [11]. У бактеріях *Bradyrhizobium* ІОК синтезується з триптофану через проміжну сполуку – індол-3-ацетамід (ІАМ).

Результати, отримані у дослідженні Sekine [11] та співавторів чітко демонструють, що при наявності триптофану у концентрації 100 мг/дм³ у культуральному середовищі, штам *B. japonicum* J1063 активно використовує цю амінокислоту як субстрат для біосинтезу ІОК через проміжну ланку ІАМ.

Окрім триптофану, значну увагу приділяють глютаміновій кислоті та аспаргіновій кислоті як основним джерелам азоту. Дослідження Prell et al. [12] свідчать, що ці амінокислоти забезпечують інтенсивний ріст *Bradyrhizobium* sp. за рахунок оптимізації азотного метаболізму, а також підвищують стійкість бактерій до стресових умов.

І третім, найбільш інноваційним напрямком модифікацій є так звана «ізофлавонова технологія». Дослідження останніх років детально вивчали вплив ізофлавонів на культивування бактерій *Bradyrhizobium* та їх симбіотичну взаємодію з соєю. Ізофлавоони (наприклад, дайдзеїн, геністеїн, гліцитеїн та їх похідні) виступають як сигнальні молекули, які сприяють взаємодії між корінням сої та бактеріями *Bradyrhizobium*. Вони дифундують через мембрану бактерій, забезпечуючи початковий етап симбіозу. Ці сполуки активують синтез Nod-факторів у бактеріях, які необхідні для інокуляції корневих волосків і подальшого формування бульбочок [13]. У зв'язку з цим спостерігається зацікавленість у додаванні перелічених речовин до поживного середовища та дослідження ефективності нодуляції бактеріями вирощеними на середовищі з додаванням ізофлавонів.

Дослідження Луу [14] виявили, що азот системно пригнічує утворення бульбочок і фіксацію азоту сої через регуляцію синтезу ізофлавонів. Зокрема, подача азоту з одного боку кореневої системи призводила до зниження концентрацій дайдзеїну та геністеїну на обох сторонах, що корелювало зі зменшенням кількості бульбочок на 40% та активності нітрогенази на 35%. Екзогенне додавання ізофлавонів відновлювало симбіотичну активність, підвищуючи експресію генів, пов'язаних із утворенням бульбочок, на 25-30% .

Висновки. У результаті проведеного аналізу публікацій встановлено, що найефективнішими підходами до оптимізації середовищ для культивування *Bradyrhizobium* є використання маніту як основного джерела вуглецю, доповнення культурального середовища амінокислотами (триптофаном, глютаміною та аспарагіною кислотами), а також застосування ізофлавонових сполук як сигнальних молекул.

Такі модифікації сприяють підвищенню росту, стресостійкості та симбіотичної активності бактерій, що є ключовими факторами для ефективного функціонування інокулянтів у польових умовах. Крім того, покращення умов культивування дозволяє підвищити вихід біомаси та життєздатність клітин, що має позитивний вплив на якість кінцевого біопрепарату.

Отримані результати свідчать про перспективність застосування цих підходів при розробці сучасних інокулянтів, спрямованих на підвищення ефективності нодуляції та азотфіксації для обробки сої, що, у свою чергу, може забезпечити зростання врожайності, стабільність агроecosystem і зменшення

екологічного навантаження на ґрунти за рахунок зниження потреби у хімічних азотних добривах.

Список використаної літератури:

1. Адаптивна технологія вирощування сої у Східному Лісостепу України: монографія / Є.М. Огурцов та ін. за ред. д-ра с.-г. наук, професора, чл.-кор. НААН України М.А. Бобро. Х.: ХНАУ, 2016. – 268 с.
2. Soybean: a key player for global food security / R. Dilawari et al. 2022. P.1–46. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-031-12232-3_1.
3. Herridge D. F., Peoples M. B., Boddey R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*. 2008. Vol. 311, no. 1-2. P. 1–18. URL: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>.
4. Алексеев О.О., Мазур О.В. Формування та функціонування симбіотичної системи соя – *Bradyrhizobium japonicum* за умов бактеріальної і вірусної інфекцій в умовах Лісостепу правобережного: монографія. Вінниця: ВНАУ. Видавництво ТОВ «Друк». 2023. 256 с.
5. Ушкаренко, В. О. Роль обробітку ґрунту, добрив, спосіб сівби і зрошування в формуванні врожаю поукосної кукурудзи. *Зрошуване землеробство: республіканський міжвідомчий тематичний науковий збірник*. К.: Урожай, 1975. Т. 9. С. 37-42.
6. Kalita M., Małek W. Molecular phylogeny of *Bradyrhizobium* bacteria isolated from root nodules of tribe *Genisteeae* plants growing in southeast Poland. *Systematic and Applied Microbiology*. 2017. Vol. 40, no 8. P. 482–491. URL: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.001>.
7. Spaink H. P. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin-layer chromatography. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1992. Vol. 5, no. 1. P. 72. URL: <https://doi.org/10.1094/mpmi-5-072>.
8. Streeter J. G. Integration of Plant and Bacterial Metabolism in Nitrogen Fixing Systems. *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Dordrecht, 1995. P. 67–76. URL: https://doi.org/10.1007/978-94-011-0379-4_9.
9. Weber D. F., Keyser H. H., Uratsu S. L. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from U.S. soybean production areas. *Agronomy Journal*. 1989. Vol. 81, no. 5. P. 786–789. URL: <https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100050018x>.
10. Rao A. V., Venkateswarlu B. Growth and symbiotic characteristics of *Bradyrhizobium* strains on different carbon substrates. *Proceedings. Indian Academy of Sciences*. 1987. Vol. 97, no. 1. P. 33–37. URL: <https://doi.org/10.1007/bf03053337>.
11. Detection of the IAA Biosynthetic Pathway from Tryptophan via Indole-3-Acetamide in *Bradyrhizobium* spp. *Plant and Cell Physiology*. 1988. URL: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077574>.
12. Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids / J. Prell et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, no. 30. C. 12477–12482. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.0903653106>.
13. Subramanian S., Stacey G., Yu O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal*. 2006. Vol. 48, no. 2. p. 261–273. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2006.02874.x>
14. Systemic regulation of soybean nodulation and nitrogen fixation by nitrogen via isoflavones / X. Lyu et al. *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.968496>.