

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ

Кафедра лісового та садово-паркового господарства

На правах рукопису

СНИТЮК НАТАЛІЯ ОЛЕГІВНА

**ОСОБЛИВОСТІ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ҐРУНТОВИХ
БАКТЕРІЙ НА ЗЕМЛЯХ, ПЕРЕДАНИХ ДЛЯ ЛІСОРозВЕДЕННЯ ПІСЛЯ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО КОРИСТУВАННЯ.**

Спеціальність: 205 «Лісове господарство»
Освітньо-професійна програма «Лісове
господарство»

Робота на здобуття освітнього ступеня «Магістр»

Науковий керівник:

ГЕТЬМАНЧУК

АНАТОЛІЙ ІВАНОВИЧ,

кандидат сільськогосподарських наук,
доцент

РЕКОМЕНДОВАНО ДО ЗАХИСТУ

Протокол № _____

Засідання кафедри лісового

та садово-паркового

господарства від _____

_____ 2024 р.

Завідувач кафедри

доц. Андрєєва В.В.. _____

Луцьк 2024

Снитюк Н. О. «Особливості протеолітичної активності ґрунтових бактерій на землях, переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування» Луцьк, 2024

Анотація

Протеолітичні бактерії - це мікробні організми, здатні розщеплювати білки. Протеоліз, процес перетравлення білків, є важливою частиною азотного циклу і відіграє важливу роль у розкладанні органічних речовин. Протеолітичні бактерії виробляють протеази та інші протеолітичні ферменти, які можуть розщеплювати різні типи білків на менші фрагменти, такі як амінокислоти. Ці амінокислоти використовуються бактеріями як джерело азоту, для синтезу власних білків та інших органічних сполук .

Предметом роботи є ідентифікація протеолітичних бактерій на землях, переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування ґрунтів та вивчення їхньої мікробіологічної активності. Ці мікроорганізми відіграють ключову роль у процесах розкладання органічних білків у ґрунті, що має важливе значення для отримання лісовими рослинами доступу до поживних речовин.

Основною метою цієї роботи є дослідження двох різних видів ґрунту та аналіз активності мікроорганізмів, які їх населяють. Робота спрямована на отримання інформації про протеолітичні бактерії, які відіграють ключову роль у процесах розкладання органічної речовини та біогеохімічних перетвореннях у ґрунтах. Вивчення цих мікроорганізмів допоможе краще зрозуміти ґрунтові процеси та вплинути на розвиток лісорозведення і захист навколишнього середовища.

У цьому дослідженні були використані зразки ґрунту, зібрані у Волинській області:

- Перший зразок ґрунту був відібраний на ділянці, розташованій в селі Старосіллі.

- Другий зразок був відібраний на ділянці, яка розташована в селищі Колки.

Дипломна робота «Особливості протеолітичної активності ґрунтових бактерій на землях, переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування»- це аналіз ролі цих мікроорганізмів у ґрунтах після сільськогосподарського користування. Дослідження демонструє їх важливість у підтримці належної якості ґрунту та пропонує можливі стратегії управління ґрунтами для підвищення продуктивності лісового господарства.

Методи дослідження: включали мікробіологічний аналіз ґрунту під світловим мікроскопом, лабораторні аналізи та посів на поживні середовища.

Джерелами інформації для написання дисертації є наукові праці вітчизняних та зарубіжних вчених, електронні ресурси, статті, публікації.

Ключові слова: протеолітичні бактерії, мікробіологічна активність, лісорозведення, сільськогосподарські культури.

Snytiuk N. O. “Features of the proteolytic activity of soil bacteria on lands transferred for reforestation after agricultural use” Lutsk, 2024

Abstracts

Proteolytic bacteria are microbial organisms capable of breaking down proteins. Proteolysis, the process of digesting proteins, is an important part of the nitrogen cycle and plays an important role in the decomposition of organic matter. Proteolytic bacteria produce proteases and other proteolytic enzymes that can break down different types of proteins into smaller fragments such as amino acids. These amino acids are used by bacteria as a source of nitrogen to synthesize their own proteins and other organic compounds.

The subject of this work is the identification of proteolytic bacteria on lands transferred for reforestation after agricultural use of soils and the study of their microbiological activity. These microorganisms play a key role in the decomposition of organic proteins in the soil, which is vital for forest plants to gain access to nutrients.

The main goal of this work is to study two different types of soil and analyze the activity of microorganisms that inhabit them. The work is aimed at obtaining information about proteolytic bacteria, which play a key role in the decomposition of organic matter and biogeochemical transformations in soils. The study of these microorganisms will help to better understand soil processes and influence the development of forestry and environmental protection.

Soil samples collected in the Volyn region were used in this study:

- The first soil sample was collected at a site located in the village of Starosillya.

- The second sample was collected at a site in the village of Kolky.

The thesis “Peculiarities of the Protective Activity of Soil Bacteria on the Lands Transferred for Reforestation after Agricultural Use” is an analysis of the role of these microorganisms in soils after agricultural use. The study demonstrates their importance in maintaining good soil quality and suggests possible soil management

strategies to improve forestry productivity.

Research methods: included microbiological analysis of the soil under a light microscope, laboratory analysis, and sowing on nutrient media.

Sources of information for writing the dissertation are scientific works of domestic and foreign scientists, electronic resources, articles, publications.

Key words: proteolytic bacteria, microbiological activity, afforestation, agricultural crops.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1 Сільськогосподарські землі та їх трансформація під лісорозведення...	10
1.2 Протеолітична активність ґрунтових бактерій.....	14
1.3 Види протеолітичних бактерій у ґрунті.....	15
1.4 Мікробіологічна активність протеолітичних бактерій у ґрунтах після сільськогосподарського користування.....	18
1.5 Важливість протеолітичних бактерій у вирощуванні рослин.	19
1.6 Вплив лісорозведення на біологічну активність ґрунту.	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
2.1 Матеріали дослідження.....	24
2.2 Методи дослідження	24
2.3 Поверхневий посів у чашки Петрі.....	26
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ У ҐРУНТІ.	34
3.1 Визначення амілолітичних властивостей.....	34
3.2 Визначення ліполітичних властивостей мікроорганізмів.....	35
3.3 Визначення гліколітичних властивостей мікроорганізмів.....	36
3.4 Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.	37
3.5 Забарвлення ґрунтових бактерій за методом Грама.....	38
РОЗДІЛ 4. ЕКОНОМІЧНА ОЦІНКА.	41
4.1 Розрахунок витрат протеолітичних бактерій для 1 гектару землі, двох видів ґрунту.	41
4.2 Аналіз економічних аспектів лісорозведення на сільськогосподарських землях.....	42
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ В ЛАБОРАТОРІЇ.	43
ВИСНОВКИ	45
ОБГОВОРЕННЯ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49

ВСТУП

Протеолітичні бактерії відіграють важливу роль у підтримці родючості ґрунтів переданих для лісорозведення. Вони здатні розщеплювати білки, які є основним джерелом азоту для рослин. Коли протеолітичні бактерії розщеплюють білки, вони вивільняють амінокислоти та інші органічні сполуки, які можуть бути використані рослинами для росту і розвитку. Крім того, цей процес сприяє утворенню гумусу - органічної речовини, яка покращує структуру ґрунту та утримує вологу.

Протеолітична активність ґрунтових бактерій є важливим показником ефективності розкладання органічних речовин у ґрунті. Під час лісорозведення після сільськогосподарського використання, цей процес може зростати або зменшуватися в залежності від різних факторів, таких як рН ґрунту, доступність поживних речовин та інші аспекти впливу людської діяльності на ґрунтову мікробіому.

Бактерії з протеолітичною активністю можуть бути корисними для забезпечення нутрієнтів для рослин та сприяти відновленню родючості ґрунту. Однак, вони також можуть впливати на біорозкладання органічних речовин та конкурувати з лісовими культурами за поживні речовини.

Для збереження родючості ґрунту та ефективного лісового господарства важливо враховувати взаємодію ґрунтових бактерій з органічним матеріалом та рослинами, а також сприяти стійкості екосистем у землях, які були піддані сільськогосподарському користуванню.

В даний час існує багато досліджень протеолітичних бактерій ґрунтів після сільськогосподарського користування та їх мікробіологічної активності. Протеолітичні бактерії - це група мікроорганізмів, які мають здатність розщеплювати органічні білки в ґрунті. Їх діяльність важлива для кругообігу азоту та доступності поживних речовин для рослин. Дослідження протеолітичних бактерій зосереджені на ідентифікації та характеристиці цих мікроорганізмів, а також на розумінні їхньої ролі в екосистемі ґрунту. Знання про діяльність протеолітичних бактерій може допомогти краще зрозуміти

процеси деградації органічних білків у ґрунті і те, як ці процеси впливають на доступність поживних речовин для рослин.

Існування життя на нашій планеті значною мірою залежить від мікроорганізмів. Бактерії та мікроскопічні гриби відіграють провідну роль у забезпеченні родючості ґрунту. Вони розщеплюють органічні речовини на неорганічні, які споживаються рослинами. Бактерії також створюють органічну речовину ґрунту. Азотфіксуючі бактерії та ціанобактерії здатні фіксувати азот, що міститься в повітрі. Таким чином вони повертають його в ґрунт. Ґрунтові та водні бактерії слугують їжею для дрібних тварин. Перетравлюючи органічні речовини, бактерії забезпечують очищення води. У формуванні покладів нафти, газу та залізної руди також беруть участь певні бактерії.

Мета роботи: є вивчення, поширення протеолітичних та інших бактерій, присутніх у сільськогосподарських ґрунтах, та аналіз їхньої мікробіологічної активності. Робота спрямована на надання знань про характеристики цих бактерій.

Предмет роботи: ідентифікація протеолітичних бактерій на землях, переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування ґрунтів та вивчення їхньої мікробіологічної активності. Ці мікроорганізми відіграють ключову роль у процесах розкладання органічних білків у ґрунті, що має важливе значення для отримання лісовими рослинами доступу до поживних речовин.

При вивченні протеолітичних бактерій та їх мікробіологічної активності використовували різноманітні методи дослідження. За допомогою світлового мікроскопа проводили детальний аналіз форми, розмірів та структурних особливостей бактеріальних колоній, що дозволило ідентифікувати мікроорганізми на мікроскопічному рівні. Крім того, було використано комплексне фарбування за методом Грама. Це дозволило отримати важливу інформацію про структуру клітинної стінки бактерій, виділених з досліджуваного ґрунту. Цей метод дозволив розділити бактерії на дві групи: Грам-позитивні, що забарвлюються у фіолетовий колір, та Грам-негативні, що

набувають рожевого кольору. Для того, щоб зрозуміти природу виділених бактерій, були проведені посіви на чашки Петрі з різними поживними середовищами.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сільськогосподарські землі та їх трансформація під лісорозведення.

Лісорозведення - це наука і практика створення нових насаджень або відновлення існуючих лісів на землях, де вони не росли або були знищені. Лісове господарство включає широкий спектр робіт, включаючи вибір місця для лісонасадження, підготовку землі, посадку дерев, догляд за деревами, створення необхідних умов для нормального розвитку лісу. [1]

Основні етапи лісорозведення:

1. Оцінка умов місцевості: перед початком лісонасадження проводять дослідження природних умов, таких як клімат, тип ґрунту, вологість, коливання температури, джерела води та рівень забруднення навколишнього середовища тощо. Важливо вибрати оптимальні породи дерев, здатні адаптуватися до місцевих умов.

2. Підготування землі для лісонасадження: прибирання бур'янів, кущів, каміння та інше. Підготовка ґрунту включає оранку, а іноді й поліпшення фізичних властивостей ґрунту вапнуванням або внесенням інших добрив.

3. Посадка лісових дерев: Вибір посадкового матеріалу – насіння або саджанці. Важливо враховувати тип лісу, а також зростання окремих порід на певних типах земель. Способи посадки можуть бути різними: вручну, за допомогою спеціалізованої техніки або посівом насіння.

4. Догляд за лісовими деревами: перші роки після посадки дуже важливі для забезпечення нормального росту дерев. Сюди входить боротьба з бур'янами, полив (при необхідності) і підживлення ґрунту.

5. Лісове господарство: Лісове господарство – це не лише створення лісів. Також необхідно проводити санітарні рубки (видалення старих або хворих дерев), створювати постійний лісовий покрив шляхом планових рубок і відновлення, зберігати біорізноманіття. [2]

Значення лісонасаджень:

1. Екологічна стабільність: ліси допомагають не перевищувати норму вуглецю в атмосфері, сприяють збереженню водних ресурсів, зменшують ерозію ґрунтів, підтримують біорізноманіття.

2. Економічні переваги: ліси є важливим джерелом деревини, а також сприяють розвитку рекреаційної та туристичної галузі.

3. Соціальні аспекти: ліси є важливими екосистемами для місцевих громад, а також можуть бути важливими чинниками у боротьбі з глобальним потеплінням. [3]

Використання колишніх сільськогосподарських угідь для заліснення є одним із важливих напрямків сталого землеустрою. Цей процес включає перетворення непродуктивних або деградованих земель у тип лісу для покращення екологічної ситуації, відновлення ґрунту та боротьби зі зміною клімату.

Причини насадження лісів на землях сільськогосподарського призначення:

1. Деградація земель: Інтенсивне сільське господарство призводить до ерозії ґрунтів, втрати родючості та структурної деградації. Малопродуктивні або покинуті землі стають непридатними для землеробства.

2. Екологічна необхідність: ліси поглинають вуглекислий газ, тим самим знижують рівень викидів парникових газів. Вони допомагають відновити водний баланс, зменшити ерозію та стабілізувати екосистеми.

3. Економічні причини: Цінність землі зростає завдяки лісам. Мати дохід від деревини, недеревинної продукції (мед, гриби, ягоди) або екологічних послуг.

4. Зміна клімату. Заліснення відіграє важливу роль у зменшенні негативного впливу зміни клімату. [4]

Типи сільськогосподарських земель, придатних для лісорозведення:

- Деградовані землі: Ґрунти, які втратили родючість через ерозію, засолення або забруднення.

- Покинуті землі: Території, які більше не використовуються для сільського господарства через низьку продуктивність.

- Незручні для обробки землі: Схили, піщані або кам'янисті ділянки.

- Ерозійно небезпечні ділянки: Місцевості, що зазнають вітрової або водної ерозії. Переваги використання таких земель для лісорозведення

Відновлення ґрунтів:

1. Покращення структури ґрунту за рахунок накопичення органічної речовини. Відновлення родючості та здатності ґрунту утримувати воду.

2. Екологічні вигоди: Збереження біорізноманіття. Зменшення ризиків повеней та посух.

3. Економічний потенціал: Вирощування швидкоростучих порід дерев (тополя, акація) для деревини чи енергетичних потреб. Створення умов для агролісомеліорації (поєднання сільського господарства і лісорозведення).

4. Соціальні переваги: Створення робочих місць у сфері лісового господарства. Збільшення рекреаційної привабливості територій.[5]

Етапи переведення земель у лісогосподарське використання:

1. Оцінка земель: Аналіз ґрунтів на придатність для лісонасаджень. Визначення зон деградації або малопродуктивних земель.

2. Розробка проекту: Підбір деревних порід, які підходять до кліматичних і ґрунтових умов. Визначення способів посадки (суцільне заліснення, смугове чи мозаїчне).

3. Підготовка ділянки: Рекультивація, підготовка ґрунту для посадки саджанців.

4. Висадка та догляд: Посадка дерев, полив, внесення добрив (за потреби). Регулярний догляд на перших етапах росту.

Приклади успішного лісорозведення :

1. Україна: Заліснення степових регіонів (Полтавська, Херсонська області) для боротьби з вітровою ерозією.

2. Китай: Програма “Зелена стіна Китаю” – заліснення деградованих земель для боротьби з опустелюванням.

3. ЄС: Програми відновлення земель у Східній Європі через фінансування Європейського фонду регіонального розвитку.[6]

Лісорозведення на землях, які раніше використовувалися для сільськогосподарського виробництва, є важливим елементом екологічного відновлення та підвищення стійкості екосистем. Після завершення сільськогосподарського використання, особливо на малопродуктивних або деградованих землях, створення лісових насаджень допомагає зупинити ерозію ґрунтів, покращити їхній стан і збільшити біорізноманіття.

Основні етапи лісорозведення після сільськогосподарського використання:

1. Оцінка стану земель: Аналіз родючості та фізико-хімічних характеристик ґрунту. Визначення рівня ерозії, засолення чи інших форм деградації.

2. Підготовка ґрунту:

Може включати рекультивацію, внесення добрив, покращення дренажу. Вибір способів підготовки залежить від стану ґрунту та типу майбутніх насаджень.

3. Підбір видів дерев: Для деградованих земель використовують швидкоростучі та стійкі види, такі як акація, сосна, тополя. На більш родючих землях можливе створення змішаних лісів із використанням дуба, бука чи липи.

4. Етапи створення лісових насаджень: Розмітка території, висадка саджанців, захист від шкідників. Регулярний догляд протягом перших років: полив, боротьба бур'янами.

5. Функціональна роль насаджень: Захист ґрунту від водної та вітрової ерозії. Відновлення водного балансу, зменшення випаровування. Поглинання вуглецю та зменшення впливу змін клімату.

Приклади в Україні:

1. Степова зона: Багато сільськогосподарських земель у зоні ризикованого землеробства (Херсонська, Миколаївська області) переводять під лісорозведення для створення захисних смуг.

2. Полісся: Землі, непридатні для сільського господарства через підвищену вологість або кислотність, перетворюють на ліси.

3. Заліснення еродованих земель: За даними Державного агентства лісових ресурсів, за останні роки в Україні передано під лісорозведення понад 210 тис. га деградованих земель. [7]

1.2 Протеолітична активність ґрунтових бактерій.

Протеолітичні бактерії - це група бактерій, які володіють протеолітичними ферментами, так званими протеазами, що дозволяють їм розщеплювати білки. Протеоліз - це процес перетравлення білків, в якому пептиди та амінокислоти утворюються шляхом гідролізу пептидних зв'язків між амінокислотними залишками. Протеолітичні бактерії відіграють важливу роль в природі, оскільки вони допомагають переробляти білки та органічні речовини. Протеолітичні бактерії також можуть бути використані в харчовій та фармацевтичній промисловості, зокрема у виробництві сиру, м'яса та протеолітичних препаратів. Однак неправильне використання протеолітичних бактерій може призвести до серйозних ризиків для здоров'я, таких як харчове отруєння. Тому їх можна застосовувати лише в контрольованих промислових умовах з дотриманням відповідних стандартів гігієни та безпеки[8].

Протеолітичні бактерії ґрунтів сільськогосподарського користування - це мікроорганізми, які виробляють протеолітичні ферменти (протеази), здатні розщеплювати білки органічних сполук у ґрунті. Їх мікробна активність має вирішальне значення для біологічних процесів у ґрунті, таких як мінералізація органічних залишків, рециркуляція поживних речовин і підтримання якості ґрунту[9].

Прикладами протеолітичних бактерій ґрунтів є *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* та багато інших. Ці бактерії використовують білки як джерело азоту та вуглецю, що прискорює процеси розкладання органічних речовин, таких як листя, гілки та коріння. Разом з іншими мікроорганізмами, такими як гриби та найпростіші, протеолітичні бактерії пористих ґрунтів

утворюють складні трофічні мережі, які мають вирішальне значення для підтримання екологічної рівноваги в ґрунті[10].

Мікробна активність протеолітичних бактерій ґрунтів після сільськогосподарського користування залежить від багатьох факторів, таких як рН ґрунту, температура, вологість і доступність поживних речовин. У занадто кислому або лужному ґрунті активність цих бактерій може бути знижена або навіть пригнічена. Водночас високі температури і нестача вологи також можуть впливати на їхнє функціонування[11].

Вплив мікробної активності на якість ґрунту є особливо важливим аспектом сільськогосподарської екології. Ґрунт, багатий на протеолітичні бактерії, здатний сприяти процесам розкладання органічних залишків, що збільшує кількість поживних речовин у ґрунті, а отже, прості сільськогосподарські практики, такі як удобрення природними органічними матеріалами або використання мікроорганізмів, які підтримують бактеріальну активність, зазвичай використовуються для покращення якості ґрунту[12].

1.3 Види протеолітичних бактерій у ґрунті.

Протеолітичні бактерії ґрунтів сільськогосподарського користування - це мікроорганізми, які мають здатність розщеплювати білки в ґрунті. Їх мікробна активність відіграє важливу роль у кругообігу азоту та забезпеченні рослин поживними речовинами[13].

Серед протеолітичних бактерій у ґрунті можна виділити кілька типів, таких як

1. *Pseudomonas spp.* - рід грам- негативних бактерій, що зустрічаються в різних середовищах, включаючи ґрунт, воду, повітря, а також в живих організмах. Це бактерії, які пристосовані до широкого спектру умов навколишнього середовища, що дозволяє їм жити в широкому діапазоні температур і рН, а також переносити присутність різних хімічних речовин.

Pseudomonas spp. відомі своєю здатністю розкладати різні хімічні речовини, включаючи вуглеводні та пестициди, що робить їх важливими для очищення ґрунту та води, забруднених цими речовинами. Вони також важливі в

біотехнології, де їх використовують для виробництва ферментів, білків та інших промислових сполук.

Однак деякі види *Pseudomonas spp.* також є патогенними збудниками для людей і тварин, викликаючи інфекції сечовивідних шляхів, респіраторні інфекції, рани і сепсис. Тому це також важлива група бактерій з точки зору медичних досліджень для профілактики та лікування інфекцій, спричинених *Pseudomonas spp.*[14].

2. *Streptomyces spp.* - рід бактерій з групи актинобактерій. Це грам-позитивні бактерії з характерними розгалуженими нитками, основною функцією яких є розкладання органічних речовин у ґрунті. Проте *Streptomyces spp.* також відомі своєю здатністю виробляти різноманітні біологічно активні сполуки, включаючи цілеспрямований синтез циклів природних хімічних сполук.

Streptomyces spp. широко використовуються у фармацевтичній промисловості завдяки їх здатності виробляти широкий спектр антибіотиків, таких як стрептоміцин та еритроміцин, які застосовуються для лікування інфекційних захворювань. Ці бактерії також використовуються в харчовій промисловості, де вони допомагають виробляти сири з особливими смаками та текстурою.

Хоча *Streptomyces spp.* мають хороші промислові властивості, вони також можуть спричинити проблеми з відходами при неконтрольованому потраплянні в навколишнє середовище. Тому дуже важливо стежити за використанням цих бактерій та контролювати їх вивільнення[15].

3. *Actinobacteria* - група бактерій, які характеризуються наявністю ниток (волокон) у своїй структурі. Вони вважаються важливою групою мікроорганізмів у ґрунтових екосистемах, де вони відіграють ключову роль у розкладанні органічної речовини та біогеохімічному циклі.

Actinobacteria також зустрічаються в інших середовищах, таких як вода та повітря.

Вони також важливі для людини, оскільки багато з них виробляють біологічно активні речовини, такі як антибіотики, які використовуються в медицині та промисловості. Одними з найвідоміших *Actinobacteria* є *Mycobacterium tuberculosis*, яка викликає туберкульоз, *Streptomyces*, що є основним джерелом антибіотиків, і *Frankia*, яка зустрічається в симбіозі з корінням деяких рослин і допомагає засвоювати азот з повітря. Оскільки актинобактерії настільки важливі для здоров'я та екології, вчені продовжують вивчати їхню різноманітність і функції[16].

4. *Azospirillum spp.* -це група бактерій з роду *Azospirillum*, що належить до родини *Spirillaceae*. Це грамнегативні анаеробні або аеробні бактерії, які зустрічаються в різних середовищах, включаючи ґрунт, воду і рослини.

Azospirillum spp. - це ризобіальні бактерії, які живуть у симбіозі з рослинами, особливо з рослинами родини злакових. Ці бактерії використовують речовини, що виділяються рослинами, як джерело енергії, а натомість виробляють біологічний азот, який є важливим джерелом азоту для рослин.

Azospirillum spp. можна використовувати як біостимулятор для покращення росту, продуктивності та стійкості рослин до стресів навколишнього середовища, таких як посуха та коливання температури. Бактерії також допомагають розкласти органічні речовини в ґрунті та покращують його структуру.

Загалом рід *Azospirillum* включає близько 25 видів бактерій, більшість з яких здатні до симбіозу з рослинами[17].

5. *Nitrosomonas spp.* та *Nitrobacter spp.* - це дві групи бактерій родини *Nitrosomonadaceae*, які відповідають за процес нітрифікації в ґрунті. *Nitrosomonas spp.* перетворюють аміак (NH_3) на нітрити (NO_2^-), а *Nitrobacter spp.* перетворюють нітрити на нітрати (NO_3^-).

Nitrosomonas spp. та *Nitrobacter spp.* є важливими ґрунтовими бактеріями, які допомагають підтримувати екологічний баланс. Внесення хімічних добрив у ґрунт може порушити цей баланс, що може призвести до серйозних

екологічних проблем. Використання природних методів, таких як внесення органічних сполук азоту та інших поживних речовин у ґрунт, може допомогти підтримувати здорову популяцію ґрунтових бактерій, таких як *Nitrosomonas spp.* та *Nitrobacter spp.*

Нітрифікація - це біологічний процес, за допомогою якого азот у ґрунті перетворюється на форми, більш доступні для рослин. На першому етапі аміак окислюється до нітритів за допомогою *Nitrosomonas spp.*, а потім нітрити окислюються до нітратів за допомогою *Nitrobacter spp.* Нітрати - це форма азоту, яка зазвичай використовується рослинами як джерело живлення.

Nitrosomonas spp. та *Nitrobacter spp.* є аеробними бактеріями, а це означає, що процес нітрифікації відбувається лише в присутності кисню. Тому цей процес відбувається активніше у ґрунтах, які добре аеруються та беруть участь у кругообігу води.

Дослідження показують, що дисбаланс між *Nitrosomonas spp.* і *Nitrobacter spp.* може призвести до проблем з отриманням рослинами достатньої кількості азоту. У деяких випадках надлишок азоту в ґрунті може призвести до ерозії ґрунту, забруднення ґрунтових і поверхневих вод та порушення екосистеми.

Крім того, присутність *Nitrosomonas spp.* і *Nitrobacter spp.* дуже важлива у процесах очищення води. Ці бактерії використовуються на очисних спорудах для видалення аміаку, нітритів і нітратів, які є шкідливими для водного середовища[18].

Всі ці бактерії відіграють ключову роль у кругообігу азоту та забезпеченні рослин поживними речовинами. Їх протеолітична активність сприяє розщепленню органічних речовин у ґрунті та вивільненню поживних речовин, які можуть бути використані рослинами для росту і розвитку.

1.4 Мікробіологічна активність протеолітичних бактерій у ґрунтах після сільськогосподарського користування.

Мікробіологічна активність протеолітичних бактерій у ґрунтах сільськогосподарського користування є ключовим фактором, що впливає на різноманітність, склад і родючість сільськогосподарських культур. Ці бактерії є

частиною ґрунтової мікрофлори і відповідають за розщеплення та мінералізацію органічних сполук. Протеази, що виділяються протеолітичними бактеріями, каталізують гідроліз білків, пептидів та амінокислот, що призводить до розщеплення цих органічних сполук на простіші сполуки, які здатні засвоюватися рослинами[19].

Активність протеолітичних бактерій залежить насамперед від умов навколишнього середовища, таких як температура, рН, вологість, доступність поживних речовин, а також наявність і кількість хімічних сполук, які вносяться в ґрунт. Відповідні умови, такі як оптимальна температура або рН, можуть підвищити активність протеолітичних бактерій і прискорити процеси розщеплення білків та інших органічних сполук.

Надмірне і неконтрольоване використання штучних добрив може призвести до дисбалансу ґрунтової мікрофлори, в тому числі протеолітичних бактерій, що, в свою чергу, може порушити процеси розкладання і мінералізації органічних сполук і перешкоджати вивільненню поживних речовин рослинами. Тому важливо використовувати органічні добрива, що містять органічні сполуки, розкладання яких прискорюється протеолітичними бактеріями[20].

1.5 Важливість протеолітичних бактерій у вирощуванні рослин.

Протеолітичні бактерії мають велике значення у вирощуванні рослин, оскільки вони є ключовими мікроорганізмами, що беруть участь у біологічному циклі ґрунту. Ґрунтові протеолітичні бактерії здатні прискорювати процеси розкладання білків, амінокислот та інших органічних сполук, які, в свою чергу, впливають на вивільнення поживних речовин, таких як азот, фосфор, сірка та інші органічні сполуки, що сприяє процесам живлення рослин[21].

Ці бактерії також виконують ключові функції в ґрунті, такі як покращення структури ґрунту, прискорення процесів мінералізації та розкладання органічних рослинних решток, що підвищує водоутримуючу здатність ґрунту та забезпечує рослини необхідними поживними речовинами.

Контроль активності протеолітичних бактерій шляхом забезпечення достатньої кількості поживних речовин та підтримання оптимального рівня рН

і температурного режиму ґрунту є ключовим для досягнення високої якості та родючості рослин[22].

Правильне вирощування сільськогосподарських культур ґрунтується на принципі відновлення корисних ґрунтових мікроорганізмів, у тому числі протеолітичних бактерій, таким чином підтримуючи екологічну рівновагу в ґрунті та забезпечуючи здоров'я і силу рослин. Тому використання органічних добрив, дотримання сівозміни та застосування бактерицидів лише в екстрених випадках має вирішальне значення для підтримання біологічного балансу в ґрунті[23].

Висновок з вищесказаного полягає в тому, що протеолітичні бактерії мають вирішальне значення у вирощуванні сільськогосподарських культур і впливають на якість та родючість врожаю. Тому контроль за діяльністю цих бактерій шляхом забезпечення достатньої кількості поживних речовин і підтримання оптимальних ґрунтових умов є важливим для підтримання біологічного балансу в ґрунті та забезпечення здоров'я, сили і високої якості врожаю.

1.6 Вплив лісорозведення на біологічну активність ґрунту.

Загальновідомо, що заліснення може мати значний вплив на біологічну активність ґрунту. Особливо це стосується змін у структурі ґрунтових мікробних угруповань, які визначають фізико-хімічні властивості ґрунту. Зокрема, рубка може призвести до зменшення чисельності мікроорганізмів, зменшення біорізноманіття та зміни розподілу деяких біохімічних показників.[24]

Дослідження, проведені в різних регіонах світу, показали різний вплив лісонасаджень на біологічну активність ґрунту в залежності від типу лісу, зони впливу та інших факторів. Наприклад, дослідження у Швеції показують, що пересадка хвойних лісів зменшує кількість грибків і бактерій, які розщеплюють гумус, що може знизити родючість ґрунту та стійкість екосистеми. З іншого боку, у соснових лісах після заліснення біохімічні показники ґрунту

залишалися стабільними, що свідчить про високу стабільність цієї екосистеми.[25]

Лісорозведення на сільськогосподарських землях позитивно впливає на біологічну активність ґрунту завдяки таким процесам:

1. Збагачення органічними речовинами
 - Лісова підстилка (опале листя, хвоя) створює умови для накопичення гумусу.
 - Органічні рештки розкладаються під дією мікроорганізмів, збагачуючи ґрунт елементами живлення.
2. Підвищення мікробіологічної активності
 - Лісові екосистеми сприяють розвитку корисних мікроорганізмів, які розкладають органічну речовину та утворюють стійкі гумусові комплекси.
 - Зростає чисельність азотфіксуючих і фосфатмобілізуючих бактерій.
3. Формування стабільної структури ґрунту
 - Коренева система дерев сприяє формуванню макропор, покращує аерацію ґрунту та утримання вологи.
 - Поліпшується агрегатна структура ґрунту, зменшується ризик ерозії.
4. Зниження токсичних впливів
 - Ліси здатні нейтралізувати токсичні речовини в ґрунті, адсорбуючи важкі метали через органічні комплекси.
5. Збільшення біорізноманіття ґрунтової біоти
 - Під покривом лісу активізується діяльність дощових черв'яків, грибів, комах і нематод, які впливають на кругообіг речовин у ґрунті.
6. Відновлення деградованих земель
 - Лісорозведення сприяє відновленню деградованих ґрунтів, відновлюючи їхню родючість та екологічну функцію.

Негативні наслідки лісорозведення:

1. Зміна кислотності ґрунту - деякі види дерев, наприклад, хвойні, можуть підвищувати кислотність ґрунту через кислу підстилку. Це може порушити діяльність певних мікроорганізмів;

2. Зменшення біорізноманіття ґрунтових організмів - плантації однорічних деревних порід, таких як сосни та евкаліпти, можуть зменшити біорізноманіття ґрунту через недостатнє різноманіття поживних речовин;

3. Тимчасове зниження біологічної активності під час підготовки ґрунту - механічний обробіток ґрунту перед посадкою, порушує мікробіологічну активність і може зменшити кількість корисних організмів;

4. Конкуренція за ресурси - молоді ліси можуть тимчасово позбавляти ґрунт води і поживних речовин, знижуючи біологічну активність до стабілізації екосистеми;

Динаміка змін біологічної активності ґрунту:

1. Рання фаза - біологічна активність може бути дещо знижена в перші роки після посадки лісів через стрес екосистеми;

2. Середня фаза - у міру росту лісу ґрунт збагачується органічною речовиною, збільшується кількість і різноманітність ґрунтових організмів;

3. Довготривала фаза - стійка лісова екосистема підтримує високий рівень біологічної активності завдяки стабільному кругообігу поживних речовин та сприятливим умовам для біоти.

Рекомендації щодо підвищення біологічної активності ґрунту при посадці:

1. Вибір адаптованих видів дерев - висаджування місцевих видів дерев, які сприяють біорізноманіттю;

2. Уникання поодиноких посадок - використання змішаних посадок, які забезпечують різноманітну органічну підстилку;

3. Мінімізація механічного втручання - використання методів, які зберігають структуру ґрунту та біоту;

4. Внесення органічних добрив - На початкових етапах потрібно додатково збагачувати ґрунт органічними речовинами для стимулювання біологічної активності;

5. Перевірка кислотності ґрунту - якщо ґрунт закисає, слід провести вапнування;

6. Використання органічних добрив для зниження кислотності ґрунту - якщо ґрунт закисає, слід провести вапнування.

Лісорозведення може бути ефективним засобом відновлення деградованих земель, але для досягнення максимальної ефективності необхідно враховувати характеристики ґрунту та екосистеми. [26]

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали дослідження.

У Волинській області було взято види ґрунту з різних земель, переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування

- Перший зразок ґрунту було взято у селі Старосілля.

Село Старосілля розташоване у Волинській області, яке належить до Поліського природного району України. Ця територія характеризується наявністю різноманітних земельних ресурсів, які використовуються для сільського господарства, лісового господарства, а також рекреаційних і природоохоронних потреб.

Село розташоване неподалік великих лісових масивів. Ліси займають значну частину території, переважно представлені сосною, березою, дубом і вільхою.

- Другий зразок ґрунту було взято у селищі Колки.

Селище Колки, розташоване у Волинській області, знаходиться в межах поліської фізико-географічної зони України. Ця територія характеризується природними ландшафтами Полісся, зокрема рівнинним рельєфом, лісовими масивами та значною часткою земель, придатних для сільського господарства, лісорозведення та рекреаційного використання.

2.2 Методи дослідження

Мікробіологічний аналіз ґрунту проводили методом серійних розведень.

Метод серійних розведень є одним з найпоширеніших методів в мікробіології для оцінки кількості мікроорганізмів у зразку. Він передбачає поступове розведення зразка з подальшою інкубацією відповідних розведень на агаровому середовищі або в рідких середовищах.

Процес розведення починається з відбору певної кількості зразка і поміщення його в першу ємність з відповідним буферним розчином. Потім з цього зразка відбирають певну кількість і переносять в наступний контейнер з новим розчином. Цей процес повторюють кілька разів, поки не будуть досягнуті відповідні розведення[27].

Після досягнення відповідних розведень зібрані зразки пересівають на відповідні агарові середовища або в рідкі середовища. Потім, після інкубації протягом певного часу, колонії мікроорганізмів підраховують і кількість мікроорганізмів у зразку виражають у колонієутворюючих одиницях (CFU) на одиницю об'єму зразка.

Метод серійних розведень використовується для оцінки кількості мікроорганізмів в різних зразках, таких як ґрунт, вода, харчові продукти або клінічні зразки. Це надзвичайно важливий метод у мікробіології, оскільки він дозволяє визначити наявність і кількість мікроорганізмів у зразку та оцінити ефективність різних агентів, які контролюють ріст мікроорганізмів, таких як антибіотики або дезінфікуючі засоби[28].

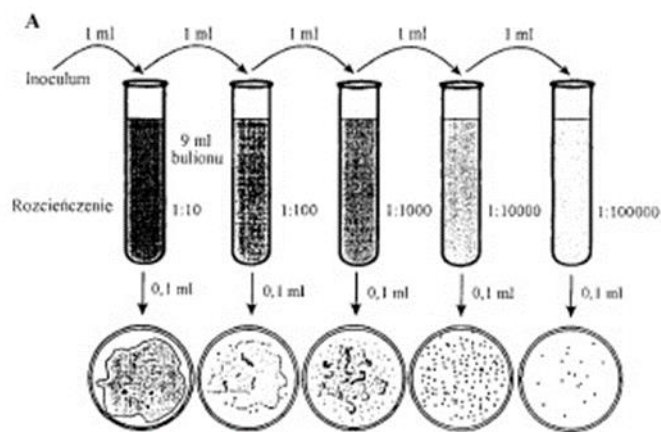


Рис.2.1 Метод серійних розведень (<http://laboratoria.net/>)

Дослідження ґрунту на наявність бактерій розпочинали з відбору 1 граму ґрунту з двох різних територій. Масу кожного ґрунту додали в пробірку зі стерильним фізіологічним розчином.

Досліджувані зразки змішували при температурі близько 19°C протягом 20 хвилин. Після закінчення змішування з пробірок відбирали 1 мл препарату і робили серію розведень (до 10⁻⁵). Були обрані розведення 10⁻³, 10⁻⁴ і 10⁻⁵. Готові розчини перенесли на заздалегідь підготовлене середовище (чашки Петрі з розчином агару). Зразки з ґрунтом інкубували при кімнатній температурі протягом 4 днів.

Після закінчення зазначеного часу з чашок відбирали штами і проводили редукційне культивування на таке ж саме середовище (чашки з розчином

агару). Дослід перенесення штами бактерій проводили протягом трьох разів. Чашки з розчином залишали при кімнатній температурі на 3 дні.

Ізольовані штами бактерій фарбували за методом Грама та виконувалися наступним чином :

- Колонії бактерій перенесли за допомогою нагрітої Еземи на краплю стерильного фізіологічного розчину предметного скельця та залишили до повного висихання.

- Готовий препарат тричі нагрівали вогнем та занурювали в кристалічний фіолетовий (приблизно на 2 хвилини) і промивали дистильованою водою.

- Препарат занурювали в розчин Люголя (приблизно на 1 хвилину) і промивали дистильованою водою.

- Етиловий спирт використовували як знебарвлювач (30 с) і промивали водою,

- Заключним етапом фарбування було занурення скельця у фуксин (на 30 с), після чого препарат промивали дистильованою водою і висушували.

Готові препарати досліджували під оптичним мікроскопом при 100-кратному збільшенні з використанням імерсійної олії.

Для оцінки розкладання жирів, крохмалю, лактози і білка були підготовлені чотири субстрати: крохмально-агарове середовище, середовище ENDO, жирове агарове середовище і середовище Фрейзера. На підготовлені середовища завдяки стерильній Еземі було зроблено посів з готового препарату, який був виконаний за фарбування методом Грама. Посіви повторювали тричі. Чашки інкубували протягом двох діб. По закінченню цього періоду записали результати, чашки з середовищем ENDO з інкубували ще три дні.

2.3 Поверхневий посів у чашки Петрі.

Для кожного зразка ґрунту було підготовлено по чотири пробірки з фізіологічним розчином. У перші пробірки з розчином додали один грам ґрунту і ретельно перемішали. З перших пробірок з ґрунтом відбирали піпеткою 0,1 мл розчину і переливали в наступні пробірки з фізіологічним

розчином, ретельно перемішували і таким же чином проводили подальші розведення (до 10^{-4}).

З кожної пробірки з розчином відбирали по 0,1 мл речовини, а потім обережно розподіляли по поверхні чашок Петрі з середовищем Фрейзера.

Чашки інкубували при кімнатній температурі протягом 4 днів.

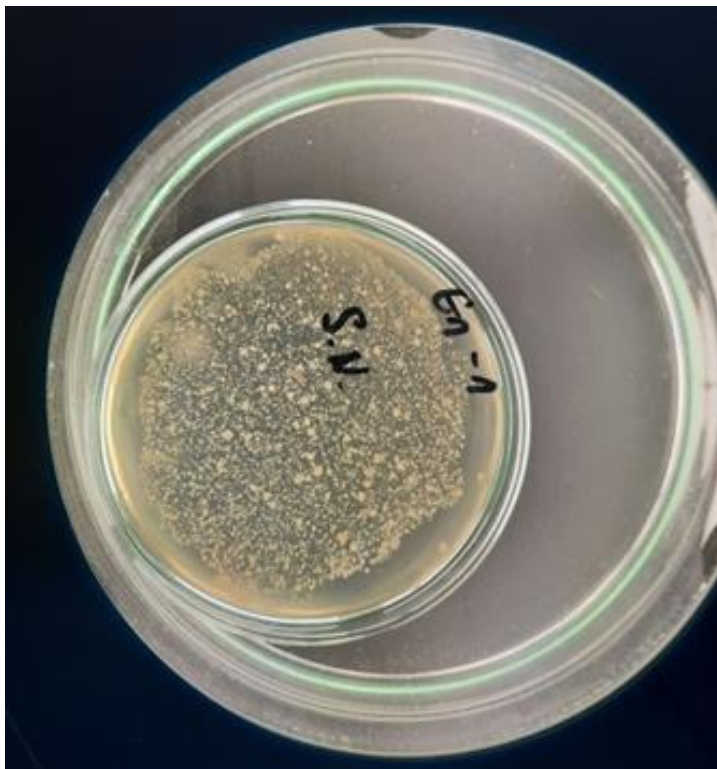


Рис.2.2 Перший зразок ґрунту (10^{-1})

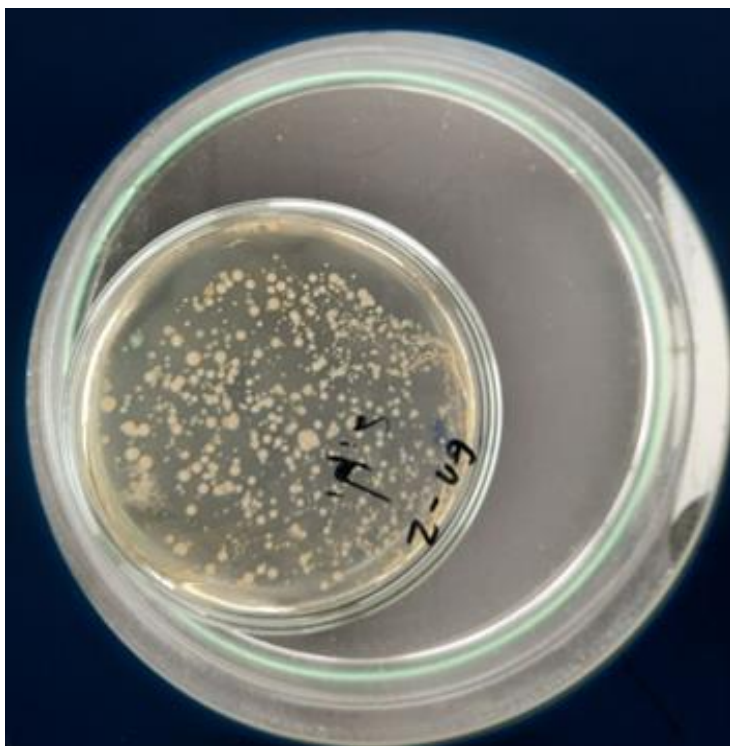


Рис.2.3 Перший зразок ґрунту(10^{-2})

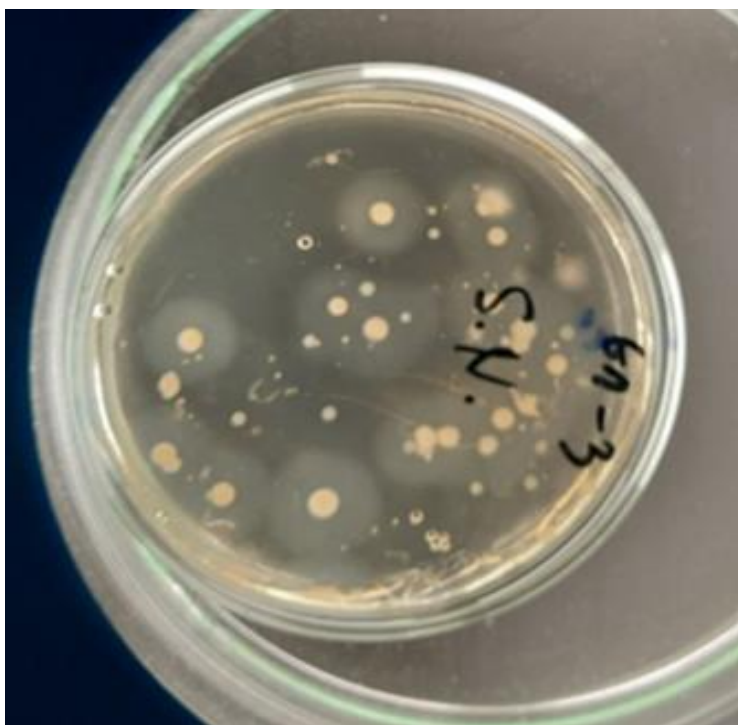


Рис.2.4 Перший зразок ґрунту(10^{-3})

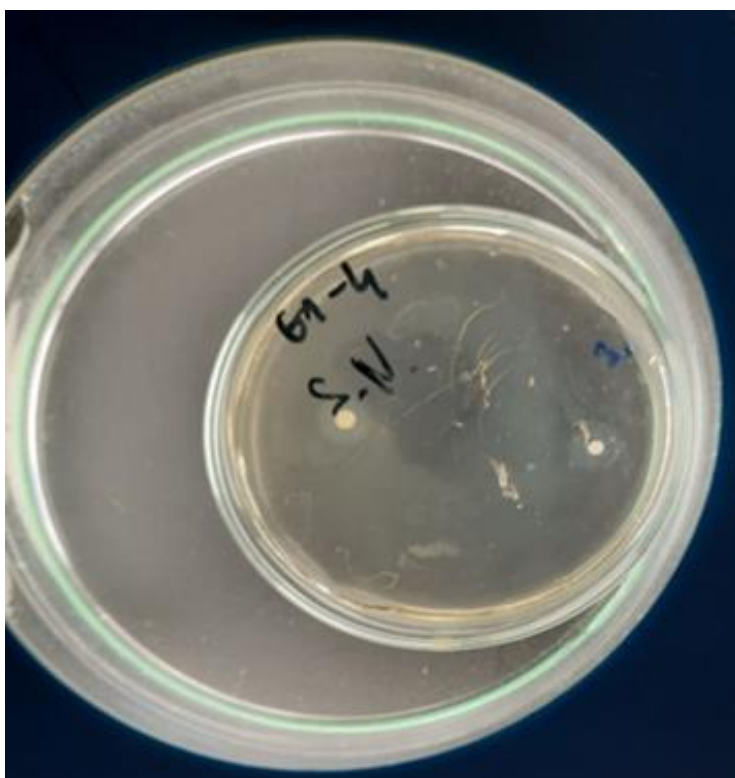


Рис.2.5 Перший зразок ґрунту(10^{-4})

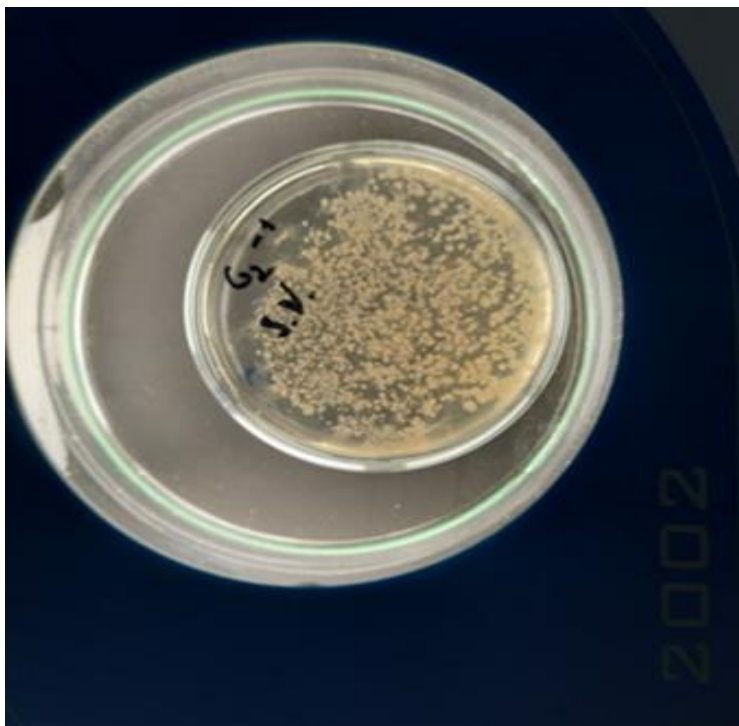


Рис.2.6 Другой зразок ґрунту(10^{-1})

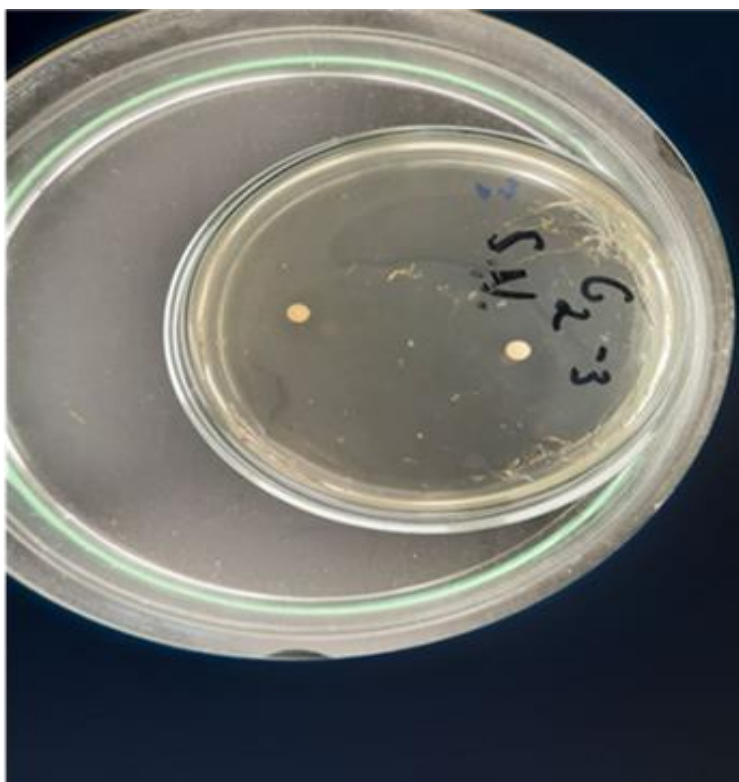


Рис.2.7 Другий зразок ґрунту(10^{-2})

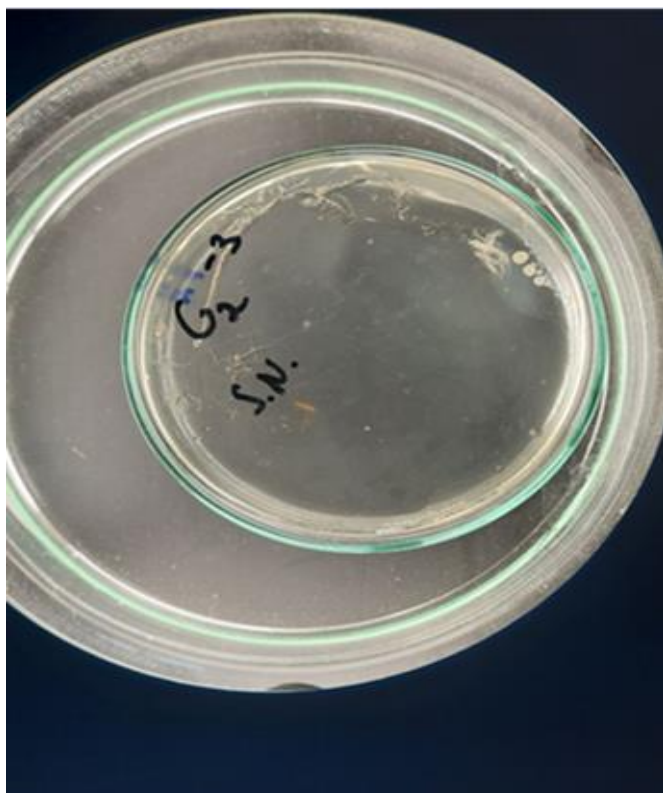


Рис.2.8 Другий зразок ґрунту(10^{-3})

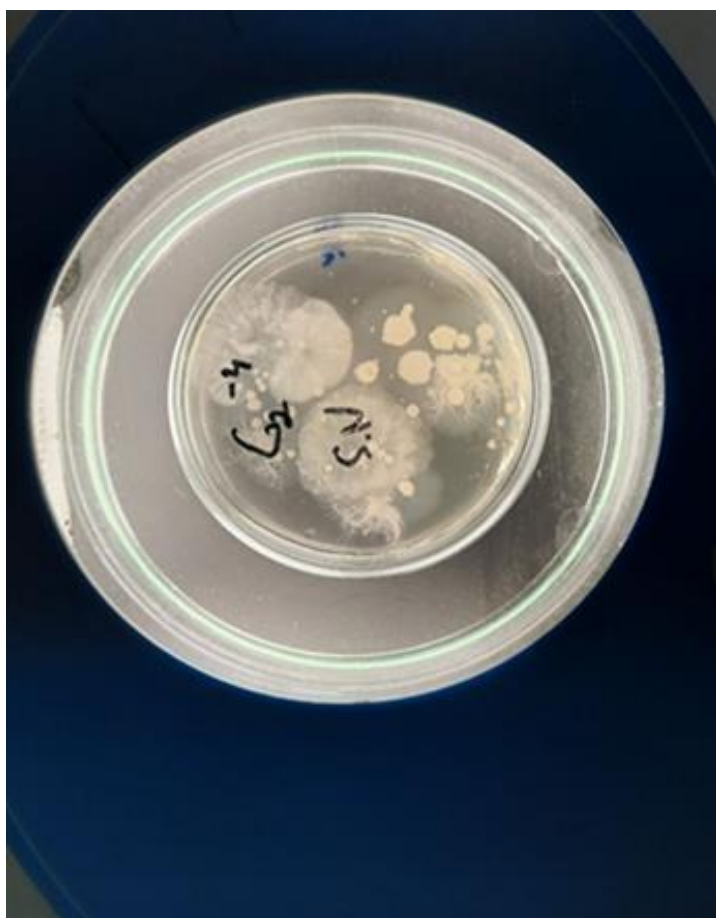


Рис.2.9 Другий зразок ґрунту(10^{-4})

Результати:

1.) Для першого зразка ґрунту :

- У чашках з поверхневим посівом 10 до -1 і 10 до -2 бактерії не можливо було порахувати;

- У чашці 10 до -3 виросло 32 бактерії жовтого кольору та малого розміру;

$$\text{CFU/ml} = 32 * 10 * 10^3 = 32 * 10^4$$

- У чашці 10 до -4 виросло 1 бактерія жовтого кольору ;

$$\text{CFU/ml} = 1 * 10 * 10^4 = 1 * 10^5$$

2.) Для другого зразка ґрунту :

- У чашці з поверхневим посівом 10 до-1 бактерії не можливо було порахувати;

- У чашці 10 до -2 виросло 2 бактерії жовтого кольору та невеликого розміру;

$$\text{CFU/ml} = 2 * 10 * 10^2 = 2 * 10^3$$

- У чашці 10 до -3 виросло 3 бактерії жовтого кольору, невеликого розміру;

$$\text{CFU/ml} = 3 * 10 * 10^3 = 3 * 10^4$$

- У чашці з поверхневим посівом 10 до -4 виросло 23 бактерії жовтого кольору та 3 гриби;

$$\text{CFU/ml} = 23 * 10 * 10^4 = 23 * 10^5$$

$$\text{CFU/ml} = 3 * 10 * 10^4 = 3 * 10^5$$

Таблиця 2.1

CFU/ml для бактерій

Ґрунтовий розчин	-1	-2	-3	-4
Перший зразок ґрунту	Не можливо було порахувати	Не можливо було порахувати	$32 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$
Другий зразок ґрунту	Не можливо було порахувати	$2 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^4$	$23 \cdot 10^5$

Таблиця 2.2

CFU/ml для грибів

Ґрунтовий розчин	-1	-2	-3	-4
Перший зразок ґрунту	-	-	-	-
Другий зразок ґрунту	-	-	-	$3 \cdot 10^5$

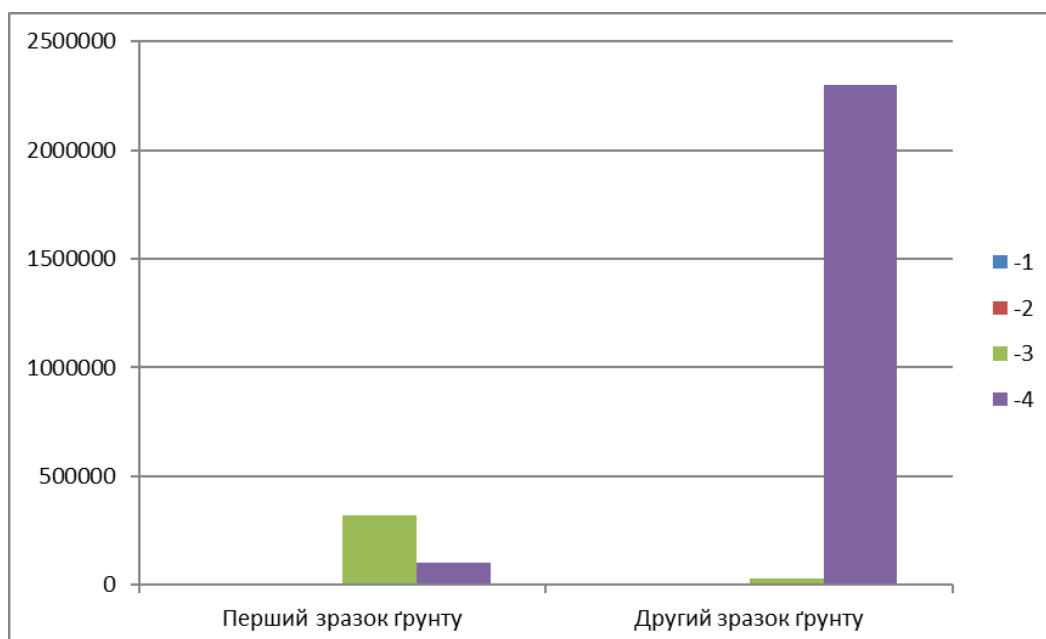


Рис. 2.10 Порівняльний графік бактерій в ґрунті (CFU/ml)

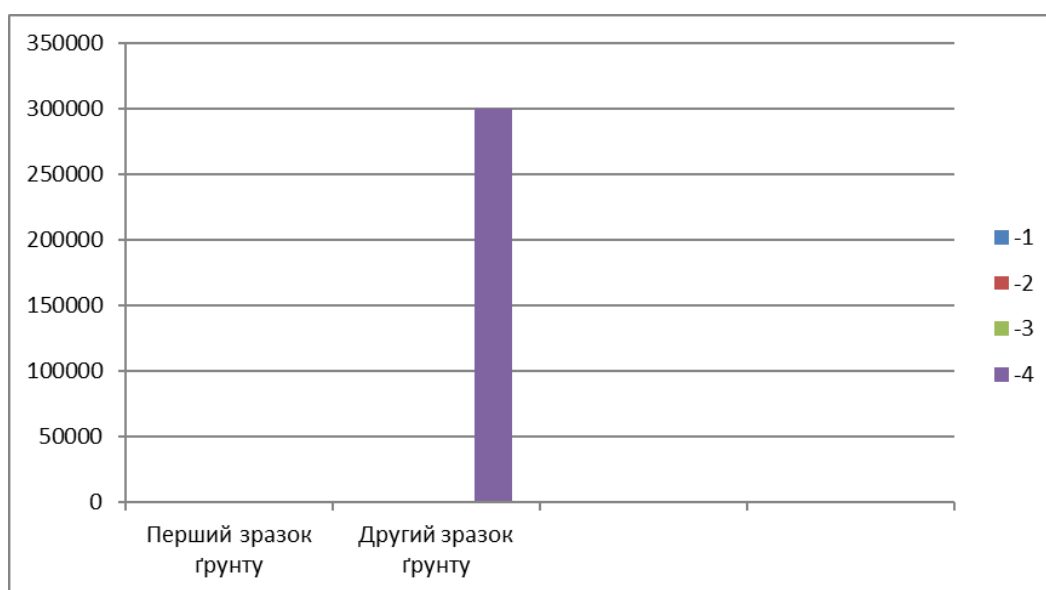


Рис. 2.11 Порівняльний графік грибів в ґрунті (CFU/ml)

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ У ҐРУНТІ.

3.1 Визначення амілолітичних властивостей.

Амілолітичні властивості бактерій, ізольованих із ґрунту, означають здатність цих мікроорганізмів розщеплювати крохмаль до простіших цукрів за допомогою ферментів амілаз. Це важлива характеристика, оскільки такі бактерії можуть бути корисними для біотехнологій, сільського, лісового господарства та харчової промисловості.

Дослідження амілолітичних властивостей бактерій включала:

1. Ізоляція бактерій:

Ґрунтову пробу було взято із ґрунту після сільськогосподарського користування.

Ґрунт розчинили у стерильній воді, провели серійні розведення та посіяли на поживні середовища (агар із крохмалем).

2. Визначення амілолітичної активності:

Після інкубації бактерій (при температурі 30°C протягом 7 днів) додали розчин Люголя.

• Зона навколо колонії (де йод не дає забарвлення) вказує на наявність амілазної активності, оскільки крохмаль у цьому місці був розщеплений.



Рис.3.1 Гідроліз крохмалю

3.2 Визначення ліполітичних властивостей мікроорганізмів.

Ліполітичні властивості бактерій, ізольованих із ґрунту, характеризують їхню здатність розщеплювати ліпіди (жири) до гліцерину і жирних кислот за допомогою ферментів — ліпаз. Ці властивості мають значення для природного колообігу речовин, очищення навколишнього середовища та промислових процесів.

Методи дослідження ліполітичних властивостей бактерій

1. Ізоляція бактерій із ґрунту: Ґрунтову пробу було взято із ґрунту після сільськогосподарського користування (на глибині 5–15 см). Ґрунт розчинили у стерильній воді, провели серійні розведення та посіяли на поживні середовища (агар із жиром).

2. Визначення ліполітичних властивостей. Після інкубації (при температурі 30 °С протягом 7 днів) додали 20% розчин CuSO_4 , навколо колоній спостерігали появу зеленого забарвлення, що свідчить про ліполітичну активність.



Рис.3.2 Гідроліз жиру

3.3 Визначення гліколітичних властивостей мікроорганізмів.

Гліколітичні властивості бактерій, ізольованих із ґрунту, відображають їхню здатність розщеплювати вуглеводи (переважно глюкозу) через гліколітичний шлях (гліколіз) для отримання енергії та метаболітів. Це процес, за допомогою якого бактерії перетворюють глюкозу на піруват із утворенням АТФ. Гліколітична активність бактерій є важливим компонентом їхнього метаболізму і відіграє значну роль у ґрунтових екосистемах.

Методи дослідження гліколітичних властивостей бактерій

1. Ізоляція бактерій із ґрунту:

Ґрунтову пробу було взято із ґрунту після сільськогосподарського користування (на глибині 5–15 см).

Ґрунт розчинили у стерильній воді, провели серійні розведення та посіяли на поживне середовище (ENDO).

2. Визначення гліколітичних властивостей

Після інкубації (при температурі 30 °С протягом 7 днів) бактерії, що ферментують лактозу, яка міститься в середовищі, вирости у вигляді характерних колоній.



Рис.3.3 Характерні колонії бактерій

3.4 Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.

Протеолітичні властивості бактерій, ізольованих із ґрунту, відображають їхню здатність розщеплювати білки до пептидів і амінокислот за допомогою ферментів — протеаз. Ці бактерії відіграють важливу роль у кругообігу азоту в природі, зокрема в розкладанні органічної речовини, а також можуть бути корисними для промислових і сільськогосподарських застосувань.

Методи дослідження протеолітичних властивостей бактерій

1. Ізоляція бактерій із ґрунту:

Ґрунтову пробу було взято із ґрунту після сільськогосподарського користування (на

глибині 5–15 см).

Ґрунт розчинили у стерильній воді, провели серійні розведення та посіяли на поживне середовище (Фрейзера).

2. Визначення протеолітичної активності:

Після інкубації (при температурі 30 °С протягом 7 днів) бактерії залили реактивом Фрейзера (HgCl_2 в HCl) і залишили ще на 5 хвилин. зони прозорості або розрідження навколо колоній свідчать про протеолітичну активність.

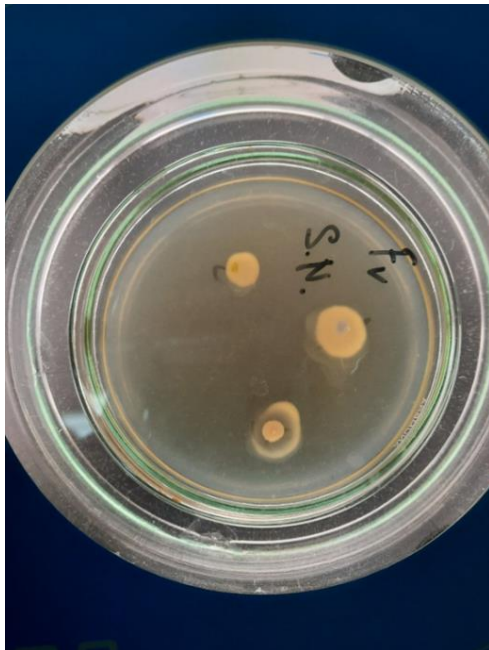


Рис.3.4 Гідроліз білків

3.5 Забарвлення ґрунтових бактерій за методом Грама.

Метод Грама-це класичний мікробіологічний метод фарбування бактерій, який можна розділити на 2 основні групи: Грампозитивні та Грамнегативні бактерії. Цей метод використовується для ідентифікації ґрунтових бактерій, а також для оцінки їх морфології та клітинної структури.

Цей метод заснований на відмінностях в структурі клітинних стінок бактерій:

1. Грампозитивні бактерії мають товстий шар пептидогліканів, які утримують первинні барвники.

2. Грамнегативні бактерії мають тонкий шар пептидогліканів, покритих зовнішньою оболонкою, які вимивають основний барвник на стадії знебарвлення.

Етапи фарбування за методом Грама

- На предметне скло нанесли краплю фізіологічного розчину та додали невелику кількість суспензії ґрунтових бактерій.
- Рівномірно розподілили матеріал по поверхні предметного скла.
- Предметне скло добре зафіксували в тримачі та провели кілька разів над полум'ям пальника.

2. Фарбування проводили в такій послідовності:

- Кристалічний фіолетовий (1-3 хв), змили водою
- Рідина Люголя (0,5-2 хв), змили водою
- Знебарвник (етиловий спирт 30с), змили водою
- Лужний фуксин (30 с), змили водою

Після фарбування препарат залишили на декілька хвилин до повного висихання, а після предметне скло помістили під мікроскоп.

Результат забарвлення бактерій з першого зразка ґрунту

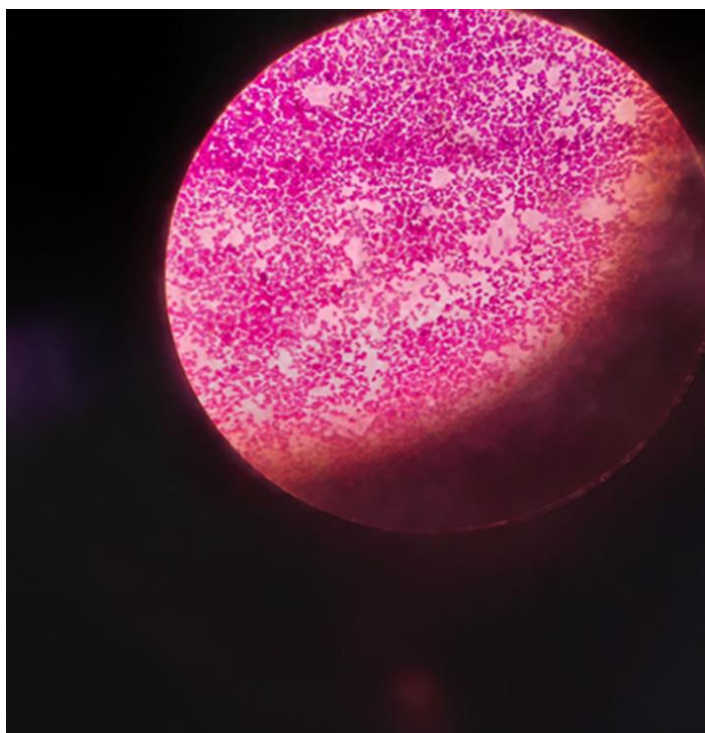


Рис. 3.5 Грампозитивні бактерії - мікрококи

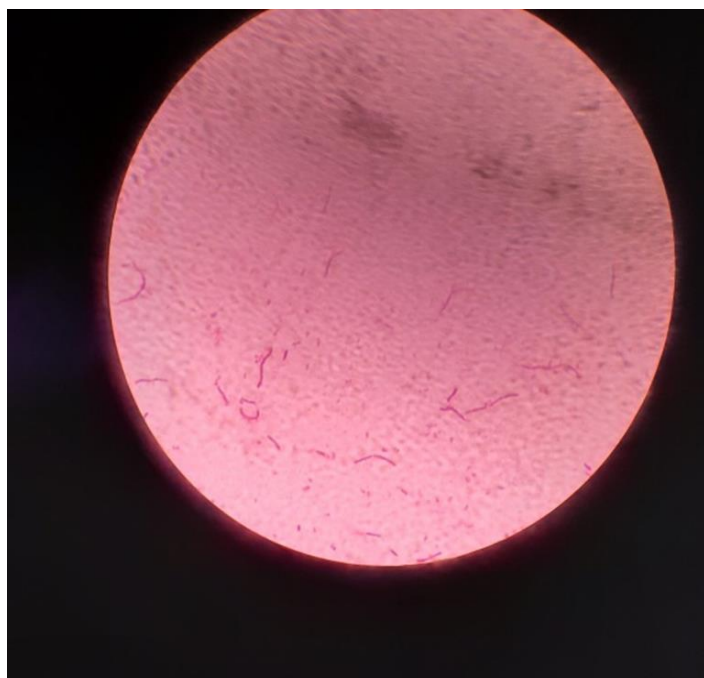


Рис.3.6 Грамнегативні паличкоподібні бактерії

Результат забарвлення бактерій з другого зразка ґрунту

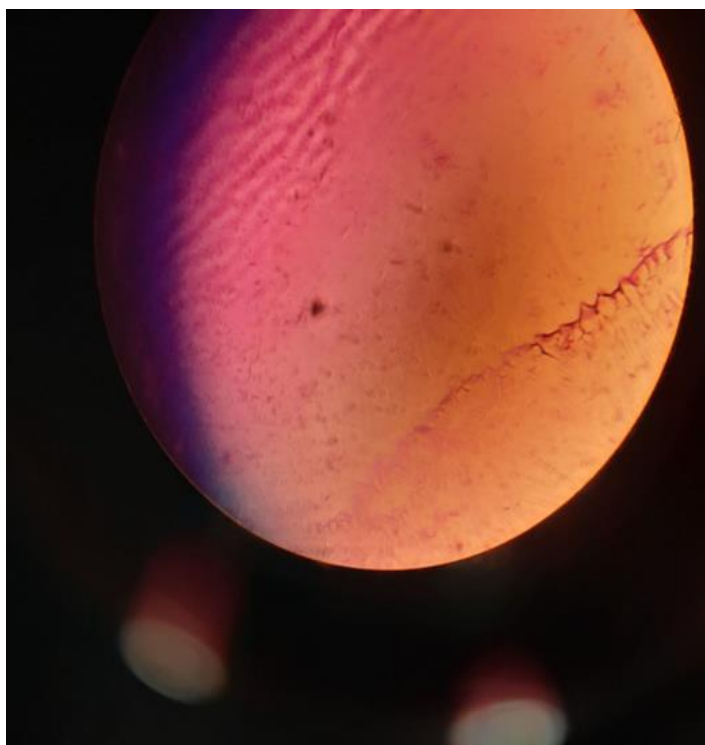


Рис.3.7 Грампозитивні паличкоподібні бактерії

РОЗДІЛ 4. ЕКОНОМІЧНА ОЦІНКА.

4.1 Розрахунок витрат протеолітичних бактерій для 1 гектару землі, двох видів ґрунту.

Для розрахунку витрат протеолітичних бактерій на 1 гектарі землі для двох видів ґрунту переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування, необхідно взяти до уваги наступні складові:

1. Площа дослідження: ми маємо 2 зразки з землі, кожен площею 1 гектар, то загальна площа дослідження складає 2 гектари.

2. Кількість місць для відбору мікробіологічних проб: Зазвичай відбирають від 10 до 20 проб на 1 гектар. Таким чином, для 2 гектарів дослідження потрібно брати в 20-40 проб.

3. Вартість протеолітичних бактерій: Вартість протеолітичних бактерій залежить від їх виду, кількості та виробника. Середня вартість на 1 млн. бактерій - від 100 до 300 грн. Ми взяли середню ціну в 200 грн. на 1 млн. бактерій.

4. Робоча сила: Для проведення дослідження потрібні кваліфіковані працівники, які мають знання та досвід у мікробіології. Вартість робочої сили залежить від вимог до кваліфікації працівників, а також від тривалості дослідження. Приблизна вартість робочої години - 100 грн.

Вартість досліджень протеолітичних бактерій складатиме:

1. Вартість бактерій: 20-40 місць для відбору проб * 1 гектар * 2 = 40-80 млн. бактерій; Вартість протеолітичних бактерій: 40 млн. бактерій * 200 грн. на 1 млн. бактерій = 8000 грн. 80 млн. бактерій * 200 грн. на 1 млн. бактерій = 16 000 грн.

2. Вартість робочої сили: Приблизно 2-3 робочих дні на проведення дослідження для 2 гектарів. Можна зарахувати вартість підготовки та аналізу результатів. Вартість робочої сили:

3 робочих дні * 8 годин * 100 грн. на 1 годину = 2400 грн.

Загальна вартість дослідження протеолітичних бактерій на 2 гектари землі складатиме від 10 400 до 18 400 грн. (в залежності від кількості місць для

відбору проб та вартісті протеолітичних бактерій) та може змінюватися в залежності від індивідуальних потреб та умов.

4.2 Аналіз економічних аспектів лісорозведення на сільськогосподарських землях.

Залісення на сільськогосподарських землях приносить багато економічних переваг, таких як зменшення ерозії ґрунту, покращення складу та розподілу водних ресурсів, збільшення біорізноманіття, покращення здоров'я людей та зменшення витрат на захист від стихійних лих.

Основним механізмом лісорозведення є вирубка лісу на певній території, очищення від зайців і диких тварин, поділ і поділ на ділянки для боротьби з лісовими пожежами, вибіркової рубки.[29]

Переважає більшість дослідників відзначає, що лісонасадження приносить значну користь не лише навколишньому середовищу, а й сільському господарству та економіці в цілому. За деякими даними, лісопосадки на землях сільськогосподарського призначення сьогодні займають понад 15% усіх лісів і зелених насаджень України, або близько 1,5 млн. га. [30]

Крім того, залісення сільськогосподарських угідь може приносити дохід за рахунок продажу деревини з полів. За деякими оцінками, дохід від цього може сягати 5% від загального доходу українських агропідприємств. Тому лісонасадження сільськогосподарських угідь має великий потенціал для охорони навколишнього середовища та економічного розвитку. Але при цьому важливо врахувати та узгодити всі необхідні вимоги та механізми для забезпечення ефективного використання ресурсів та отримання максимальної вигоди для суспільства.[31]

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ В ЛАБОРАТОРІЇ.

Охорона праці при роботі з пробами ґрунту, що містять протеолітичні бактерії, вимагає дотримання загальних правил безпеки та спеціальних заходів.

Основні аспекти включають:

1. Загальні вимоги

Організація робочого місця:

- Забезпечення належного освітлення та вентиляції.
- Використання спеціальних зон для роботи з біологічними агентами (ламінари бокси).

Персонал:

- Персонал лабораторії повинен пройти інструктаж з техніки безпеки.
- Володіння знаннями про властивості протеолітичних бактерій та потенційних ризиків.

2. Засоби індивідуального захисту (ЗІЗ)

Одяг:

- Лабораторні халати, шапочки, нітрилові або гумові рукавички.

Додаткові засоби захисту:

- Захисні окуляри та маска або респіратор при роботі з дрібними частинками.

- Водонепроникне взуття, щоб уникнути контакту з землею.

3. Робота із зразками ґрунту

Відбір проб:

- Уникнення контакту з відкритими ділянками шкіри.

Використання стерильних інструментів.

- Транспортування зразків в герметичних контейнерах.
- Бактеріальні зразки, культури та аналізи виконуються в кабінеті біологічної безпеки.

- Обов'язкове використання стерильного інструменту та автоклава для стерилізації після роботи.

4. Біологічна безпека

- Стерилізація: поверхня дезінфікується речовиною, що містить хлор або 70% етанол.

- Обробка відходів: забруднені матеріали (піпетки, рукавички) перед утилізацією стерилізують в автоклаві.

- Контроль ризиків: зведення до мінімуму утворення аерозолю під час обробки зразків.

- В лабораторії заборонено їсти, пити та зберігати особисті речі.

5. Надзвичайні ситуації

- Розлив матеріалу: місце розливу обробляється дезінфікуючим розчином, персонал залишає територію до завершення обробки.

- Попадання на шкіру або слизові оболонки: промити великою кількістю води, звернутися до лікаря.

- Документи: запис про аварійні випадки в журналі охорони праці.

6. Регламенти та стандарти

- Відповідають стандарту ДСТУ ISO 15189:2015 (лабораторна безпека).

- Користуватися положеннями Закону України «Про охорону праці».

Методичні рекомендації з біобезпеки, затверджені МОЗ України.

Дотримання цих правил забезпечує безпечні умови праці та мінімізує ризики для здоров'я працівників.[32]

ВИСНОВКИ

Дослідження протеолітичних бактерій були проведені у Волинській області з метою кращого розуміння їхньої ролі в ґрунтових екосистемах. Ці дослідження були зосереджені на ідентифікації та характеристиці різних видів протеолітичних бактерій, їх здатності розщеплювати різні типи білків та фактори, що впливають на їхню активність. У більшості цих ґрунтів домінували

Грампозитивні бактерії.

- З першого зразка ґрунту було виділено колонії протеолітичних бактерій, здатних розщеплювати крохмаль і білок.
- З другого зразка ґрунту вдалося виділити колонії протеолітичних бактерій, здатних гідролізувати жири та ферментувати лактозу.
- Переважною групою бактерій були протеолітичні бактерії, які також проявляли ліполітичні та амілолітичні властивості;
- Найменш чисельною групою були протеолітичні бактерії, які також проявляли гліколітичні та протеолітичні властивості.
- У ґрунті № 1 виділені бактерії були ідентифіковані як Грампозитивні бактерії – мікрококи та Грамнегативні паличкоподібні бактерії ;
- У ґрунті № 2 виділені бактерії були ідентифіковані як Грампозитивні паличкоподібні бактерії;

Серед виділених штамів бактерій найбільш поширеними є паличкоподібні бактерії.

Результати дослідження свідчать про значне різноманіття протеолітичних бактерій у ґрунті та їхню здатність адаптуватися до різних умов навколишнього середовища. Наприклад, деякі види бактерій більш активні в кислих ґрунтах, тоді як інші віддають перевагу лужним ґрунтам. Крім того, дослідження показали, що присутність інших мікроорганізмів, таких як гриби та найпростіші, може впливати на активність протеолітичних бактерій через конкуренцію за ресурси та синергічну взаємодію.

Передача земель для лісорозведення сприяє поступовій зміні мікробіологічного складу ґрунту. Протеолітичні бактерії, що беруть участь в розкладанні білків, можуть знижувати свою активність за рахунок зменшення кількості органічної сировини у вигляді рослинних залишків.

Тривале сільськогосподарське використання часто призводить до виснаження органічного шару ґрунту, змінюючи її фізико-хімічні властивості і впливаючи на життєдіяльність мікроорганізмів. Внесення добрив і пестицидів може порушити баланс ґрунтової мікрофлори, включаючи протеолітичні бактерії.

Лісорозведення сприяє поступовому відновленню органічної речовини в ґрунті за рахунок накопичення листя, кори, гілок. Це може створити сприятливі умови для розвитку мікрофлори, в тому числі протеолітичних бактерій, але для повної стабілізації їх активності потрібен тривалий час. Протеолітичні бактерії відіграють важливу роль у кругообігу азоту, оскільки їх активність забезпечує розщеплення білків на амінокислоти та аміак, доступні рослинам. Зміни в їх активності можуть вплинути на родючість ґрунту в умовах лісорозведення.

Активність протеолітичних бактерій у ґрунті, земель переданих для лісорозведення, залежить від попереднього сільськогосподарського використання та швидкості відновлення органічної речовини. Лісорозведення сприяє поступовій стабілізації мікрофлори, але цей процес вимагає комплексного підходу до збереження часу і родючості ґрунту.

ОБГОВОРЕННЯ

Протеолітичні бактерії є важливим компонентом мікробіологічних екосистем, які впливають на метаболізм органічних речовин та біогеохімічні цикли в природі. В рамках даної роботи було досліджено мікробіологічну активність протеолітичних бактерій та виділено штами бактерій, що розкладають інші органічні сполуки.

Основні висновки та обговорення отриманих результатів представлені нижче. Відмінності в результатах між досліджуваними зразками ґрунту можуть бути пов'язані з різними типами ґрунтів. Посилаючись на статтю Яцека Маліцького «Фізичні властивості ґрунтів та їх мікробіологічний аналіз», можна побачити, що фізичні властивості, такі як текстура ґрунту, можуть впливати на мікросередовище протеолітичних бактерій, впливаючи на доступність кисню, вміст вологи тощо. Магістерська робота також припускає, що активність протеолітичних бактерій може змінюватися в залежності від типу ґрунту.

У роботі Яцека Маліцького, яка зосереджена на фізичних властивостях ґрунтів, цілком ймовірно, що відмінності в мікробній активності можуть бути частково пов'язані з відмінностями в текстурі та структурі ґрунту. Варто також порівняти результати з роботою К. Пшибулевської, М. Купця, А. Лиска та Р. Цигліцького «Чисельність та активність мікробів у ґрунті». «Чисельність та активність мікроорганізмів у ґрунті з посівів кукурудзи в долині річки Даї, Гана».

Обидві роботи зосереджені на вивченні мікроорганізмів у ґрунті, але відрізняються в кількох аспектах. Магістерська робота «Особливості протеолітичної активності ґрунтових бактерій на землях, переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування» досліджує загальну тему протеолітичних бактерій у сільськогосподарських ґрунтах, без прив'язки до конкретних регіонів чи культур. Варто зазначити, що наукова робота Пшибулевської та ін. зосереджена на конкретному регіоні Гані в басейні річки Дейлі та аналізує ґрунтові мікроорганізми під впливом вирощування кукурудзи в цій конкретній місцевості.

Різниця в досліджуваній території обумовлена різними цілями дослідження. Наукові статті надають більш детальний аналіз мікроорганізмів у конкретних ґрунтових екосистемах. Дослідники прагнуть зрозуміти, як вирощування кукурудзи впливає на мікробну популяцію на конкретній ділянці та наслідки цього впливу на ґрунтову екосистему. У випадку магістерської роботи цілі дослідження є більш загальними і зосереджені на протеолітичних бактеріях в сільськогосподарських ґрунтах в цілому, без аналізу конкретного впливу на рослину або регіон.

Дипломна робота виявила наявність найменш амілолітичної, протеолітичної та найбільш ліполітичної мікрофлори в ґрунтах з басейну річки Дарі в Гані. Дослідження українських сільськогосподарських ґрунтів показало, що ліполітична мікробіота була найменш поширеною групою бактерій, а амілолітична мікробіота – є найбільш поширеною. Ця різниця може бути пов'язана з кліматом і навколишнім середовищем, в якому проводилося дослідження, типом рослинності та обробкою сільськогосподарських ґрунтів. Історія ґрунтів та їх використання також відіграють важливу роль.

В Україні добре відоме використання органічних добрив на сільськогосподарських ґрунтах, тоді як у Гані добрива вносяться природними методами, тобто компостом. Біогеографічні відмінності також сприяють різним результатам. Кожен регіон має свої біогеографічні та мікробіологічні характеристики, які впливають на тип розподілу мікробів у ґрунті.

На закінчення, обидві наукові роботи К. Пшибулевської та ін., як і дипломна робота «Особливості протеолітичної активності ґрунтових бактерій на землях, переданих для лісорозведення після сільськогосподарського користування», зосереджені на ґрунтових мікроорганізмах, але відрізняються за територією дослідження, розміром, темою та цілями дослідження. Порівняння цих двох досліджень дає цінну інформацію про різноманітність мікробіологічних досліджень у ґрунтах та їхню важливість у різних екосистемах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гродзінський М.Д. “Рекультивация і лісорозведення на порушених землях”. Київ: Наукова думка, 2017.
2. Руденко Л.Г., Тарасенко І.П. “Лісорозведення на деградованих сільськогосподарських угіддях України”. Львів: Логос, 2018
3. Гречко В.М. “Створення нових лісів: екологічні та економічні аспекти”. Харків: Основа, 2020.
4. Іващенко А.А., Бондаренко А.В., Чернописький Н.Ф. Економіко-екологічне обґрунтування відтворення лісового фонду на сільськогосподарських землях.// Еко-норма. 2012. № 1. С. 19-26.
5. Петренко А.О., Гордієнко В.В. Лісорозведення на сільськогосподарських землях як засіб покращення еколого-економічних показників розвитку регіону.// Вісник Харківського національного аграрного університету імені В.В. Докучаєва. -2014. № 5 (34). С. 88-96.
6. Парфенюк С.Г. Лісорозведення як засіб регулювання природних процесів на сільськогосподарських землях.// Економіка та управління підприємством. 2016. № 2. С. 58-62.
7. Вакулюк П. Г. Лісовідновлення і лісорозведення в рівних районах України. Фастів: Поліфаст, 1998. – 508 с
8. Gupta R., Beg Q. K., Lorenz P., Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, "Applied Microbiology and Biotechnology", 2002, vol. 59(1), s. 15-32.
9. Trivedi P., Delgado-Baquerizo M., Jeffries T.C., Knight R., Dong K., Zhu H., et al., Soil bacterial diversity and human health, "Nature Reviews Microbiology", 2020, vol. 18(6), s. 325-333.
10. Roszak D. B., Colwell R. R., Survival strategies of bacteria in the natural environment, "Microbiological Reviews", 1987, vol. 51(3), s. 365-379.
11. Christensen M. E., Grewal H. M. S., Kumar R., Ahmadi B., Liles M. R., Investigating the role of Pseudomonas proteases in bacterial stress resistance with

highly parallelized single-cell protease assays, "Frontiers in Microbiology", 2020, vol. 11, s. 661.

12. Tisdall J. M., Oades J. M., Organic matter and water-stable aggregates in soils, "Journal of Soil Science", 1982, vol. 33(2), s. 141-163.

13. Harris D., Horwath W. R., van Kessel C., Acid fumigation of soils to remove carbonates prior to total organic carbon or carbon-13 isotopic analysis, "Soil Science Society of America Journal", 2001, vol. 65(6), s. 1853-1856.

14. Rojo F., Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment, "FEMS Microbiology Reviews", 2010, vol. 34(5), s. 658-684.

15. Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gavalo S., Pierre F., Jacquard C., et al., Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria, "Microbiology and Molecular Biology Reviews", 2016, vol. 80(1), s. 1-43.

16. Goodfellow M., Williams S. T., Ecology of actinomycetes, "Annual Review of Microbiology", 1983, vol. 37, s. 189-216.

17. Cassán F. D., Diaz-Zorita M., Pedraza R. O., *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field, "Soil Biology and Biochemistry", 2010, vol. 42(3), s. 687-699.

18. Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G. W., Prosser J. I., Schuster S. C., Schleper C., Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils, "Nature", 2006, vol. 442(7104), s. 806-809.

19. Eilers K.G., Lauber C. L., Knight R., Fierer N., Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil, "Soil Biology and Biochemistry", 2010, vol. 42(6), s. 896-903.

20. Wallenstein M.D., McMahon S.K., Schimel J.P., Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils, "FEMS Microbiology Ecology", 2009, vol. 67(3), s. 470-478.

21. J. Szulc, A. Lewicka, "Bakterie proteolityczne w glebie", "Postępy Mikrobiologii", tom 36, nr 2, 1997.

22. A. Steinberger, "Proteolityczne bakterie glebowe", "Acta Microbiologica Polonica", tom 57, nr 3, 2008.
23. A. Bouzaiane, R.R. Bellaloui, J.E. Stigter, "Bakterie proteolityczne w agroekosystemach: funkcje, mechanizmy i perspektywy", "Applied and Environmental Microbiology", tom 81, nr 18, 2015.
24. Калінін М. І. Лісові культури і захисне лісорозведення / М. І. Калінін. – Львів : Світ, 1994. – 296 с.
25. Осмола М. Х. Лісові культури. Лісові розсадники. / М. Х. Осмола – Київ : ІСДОУ, 1995. – 92 с
26. Stadnyk, O., Slavhorodska, L. "Оптимізація землекористування через лісорозведення". Український журнал лісових наук (2019).
27. D. Blair, "Seryjne rozcieńczenie w mikrobiologii", "Journal of Microbiology & Biology Education", tom 13, nr 2, 2012.
28. M. Grzesiak, M. Kuczyńska, "Metody badania mikroorganizmów w próbkach środowiskowych", Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2010.
29. Державне агентство лісових ресурсів України. Програма «Зелена країна». [Офіційний сайт](#).
30. Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України. Стратегія управління лісами до 2035 року. [Офіційний сайт](#).
31. Лобченко, Г. "Агролісівництво в Україні". Національний університет біоресурсів і природокористування.
32. Стандарт ДСТУ 15190: 2019. Лабораторії медичні – Вимоги до безпеки.