

На правах рукописи

Фомичева Наталья Викторовна

**РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ
ЖИДКОФАЗНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СРЕДСТВ**

Специальность 03.00.07 – Микробиология
03.00.23 – Биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тверь – 2007

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте
сельскохозяйственного использования мелиорированных земель
(ВНИИМЗ)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Рабинович Галина Юрьевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Архипченко Ирина Александровна

кандидат биологических наук
Чугунова Марина Валентиновна

Ведущая организация: ГОУВПО Тверской государственный
технический университет
(ТГТУ)

Защита состоится «8» ноября 2007 г. в __ часов на заседании диссертационного совета К.006.028.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии по адресу: 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, шоссе Подбельского, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИСХМ и на сайте contact@arriam.spb.ru

Автореферат разослан «8» октября 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Алисова С.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из важных задач современной биотехнологии является разработка технологий по созданию и применению биологически активных средств, способствующих росту и развитию растений, улучшению почвенного плодородия и используемых в других сферах человеческой жизни. Наиболее актуальным направлением, обеспечивающим одновременно с созданием биосредств разумную утилизацию возобновляемых отходов (навоза, помета, торфа, соломы, лигнина, отходов пищевых и лесоперерабатывающих предприятий), является создание высокоэффективных технологий, целесообразных для внедрения в Российской Федерации, оказавшейся в крайне сложной экономической ситуации к началу XXI века.

В настоящее время известно большое количество биологически активных средств, которые преимущественно классифицируют как биопрепараты. Наиболее перспективными из них являются те, которые имеют множество областей применения и обладают широким спектром воздействия на объекты окружающей среды.

На фоне большого количества биосредств, представленных на российском рынке, особо выделяется группа биопрепаратов, технологии получения которых позволяют максимально сохранять и извлекать биологически активные вещества из исходных субстратов, изначально обеспеченных разнообразной микрофлорой, элементами питания, физиологически активными веществами. Большинство наиболее эффективных биосредств – микробные препараты, представляющие собою сообщества специально подобранных отселектированных микроорганизмов или содержащие строго определенный штамм микроорганизмов какого-то одного вида. Наряду с ними, биологически активные средства, получаемые из органического сырья (биоудобрения, биостимуляторы, биопрепараты), содержат присущие исходному сырью микробоценозы, накапливающиеся в конечных продуктах при использовании эффективных технологических приемов и обеспечивающие в конечном итоге их высокую биологическую активность. Органические субстраты служат источником получения как твердофазных, так и жидкофазных биосредств. Последние отличаются доступностью элементов питания, возможностью минимизации дозировки и при необходимости корректировки состава. Поэтому в последние годы большое внимание уделяется разработкам технологий, связанных с получением именно жидкофазных биосредств.

Целью настоящей работы являлась разработка технологической линии получения жидкофазных биологически активных средств на основе ферментационно-экстракционного процесса с последующим определением состава конечных продуктов и прогнозной оценкой их применения в народном хозяйстве.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- предложить высокоэффективные стимуляторы процесса аэробно-анаэробной ферментации путем изучения их влияния на жизнедеятельность микрофлоры и оценки качества конечных продуктов;
- разработать технологическую линию получения жидкофазных биологически активных средств, основывающуюся на ферментационно-экстракционном подходе;
- изучить состав и свойства жидкофазных биологически активных средств и оценить спектр их возможного применения;
- изучить влияние жидкофазных биологически активных средств на жизнедеятельность почвенной микрофлоры и развитие растений в лабораторных экспериментах.

Научная новизна. Показано влияние и осуществлен выбор оптимальных концентраций стимуляторов процесса аэробно-анаэробной ферментации путем тестирования жизнедеятельности микрофлоры и качества конечных продуктов. Впервые разработана технологическая линия получения жидкофазных биологически активных средств и предложена ее модернизация, позволяющая корректировать состав получаемых жидкофазных биосредств по содержанию необходимых элементов в зависимости от их назначения. Впервые исследован состав получаемых жидкофазных биосредств, определяющий их масштабное внедрение. Установлено влияние жидкофазных биологически активных средств на микрофлору почвы и растения.

Практическая значимость. Разработан двухступенчатый способ получения жидкофазных биологически активных средств и предложена производственная модель технологической линии. Предлагаемый способ получения жидкофазных биологически активных средств может быть реализован сельскохозяйственными предприятиями различных форм собственности.

Рекомендованы дозы внесения жидкофазных биосредств под яровую пшеницу и редис. Жидкофазные биосредства предлагается использовать в растениеводстве (для ускорения прорастания семян, улучшения роста и развития растений, в целом, способствуя повышению урожайности), в земледелии (для активизации почвенно-микробиологических процессов, участвующих в формировании уровня плодородия почвы), при решении вопросов, связанных с оптимизацией компостирования органических субстратов и рекультивацией нарушенных земель.

Апробация работы. Диссертационная работа выполнялась в рамках Программы фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научно-обеспечению развития агропромышленного комплекса РФ Россельхозакадемии на 2001 – 2005 гг. по заданию «Разработать научные основы и технологии получения новых видов и форм органических удобрений, мелиорантов и кормовых добавок на основе биоферментации разнообразного растительного сырья, органических отходов и природных агроруд»; на 2006 – 2010 гг. по заданию «Разрабо-

тать технологии производства и применения биомелиорантов широкого спектра воздействия на свойства почв осушаемых земель с целью повышения продуктивности и экологической устойчивости агроландшафтов»; в Государственном контракте с Минсельхозом России (ГК № 774/26, 2003 г.) по теме: «Проведение исследований и разработка технологии получения физиологически активных препаратов на основе продуктов ферментации органического сырья, обеспечивающих повышение прорастания семян зерновых культур и картофеля».

Основные теоретические положения и практические результаты диссертации доложены на заседаниях методической комиссии ГНИУ ВНИИМЗ в 2002 – 2004 гг., 2006 – 2007 гг.

Результаты работы докладывались на следующих конференциях: 3-й Всероссийской научной конференции "Перспективы развития Волжского региона" (Тверь, 2001 г.), Международной научно-практической конференции "Высокие технологии добычи, глубокой переработки и использования озерно-болотных Отложений" (Томск, 2003 г.), Международной научно-практической конференции "Научно-производственное обеспечение развития сельского социума" (Москва, 2005 г.), 2-й, 3-й и 4-й Всероссийских конференциях молодых ученых "Новые технологии и экологическая безопасность в мелиорации" (Коломна, 2005 г., 2006 г., 2007 г.), Международной научно-практической конференции «Научно-производственное обеспечение развития комплексных мелиораций Прикаспия» (Соленое Займище, 2005 г., 2006 г.), областной научно-технической конференции молодых ученых «Физика, химия и новые технологии» в рамках XIV Региональных Каргинских чтений, (Тверь, 2007 г.), Международной научно-практической конференции «Стабилизация производства и развитие агропромышленного комплекса региона на основе внедрения инновационных технологий» (Тверь, 2007 г.).

По результатам выполненных исследований опубликовано 18 печатных работ, в том числе 2 в центральной печати, 2 Патента РФ на полезную модель и 1 Патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, выводов, списка использованной литературы и приложений. Работа содержит 24 рисунка, 31 таблицу и 13 приложений. Список литературы включает 154 наименования, в том числе 31 на иностранных языках.

Автор приносит глубокую признательность научному руководителю за предложенную интересную тему научной работы, за помощь и поддержку в написании диссертации, а также сотрудникам лаборатории биомелиорантов и микробиологических исследований ВНИИМЗ за помощь в проведении экспериментов. Отдельная благодарность сотрудникам лаборатории массовых анализов ВНИИМЗ за участие в получении результатов по характеристике объектов исследования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, изложены цель, научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

В главе 1 «Значение биологически активных средств в растениеводстве и земледелии» обобщены имеющиеся в литературе сведения о современных биосредствах (биопрепаратах, стимуляторах) для роста и развития растений и улучшения почвенного плодородия, кратко представлены их свойства и назначение. Отмечено, что наибольшую ценность представляют комплексные биосредства с широким спектром применения. Рассмотрено значение основных составляющих комплексных биосредств: элементов питания, физиологически активных веществ, микроорганизмов.

В главе 2 «Новые технологические решения в создании биологически активных средств» описаны известные отечественные и зарубежные технологии получения биопрепаратов для почвы и растений с указанием основных стадий производства.

Показано, что продукты аэробно-анаэробной твердофазной ферментации, полученные путем переработки отходов животноводства, торфа и различных стимуляторов, можно использовать в качестве основы получения жидкофазных биологически активных средств (БАС).

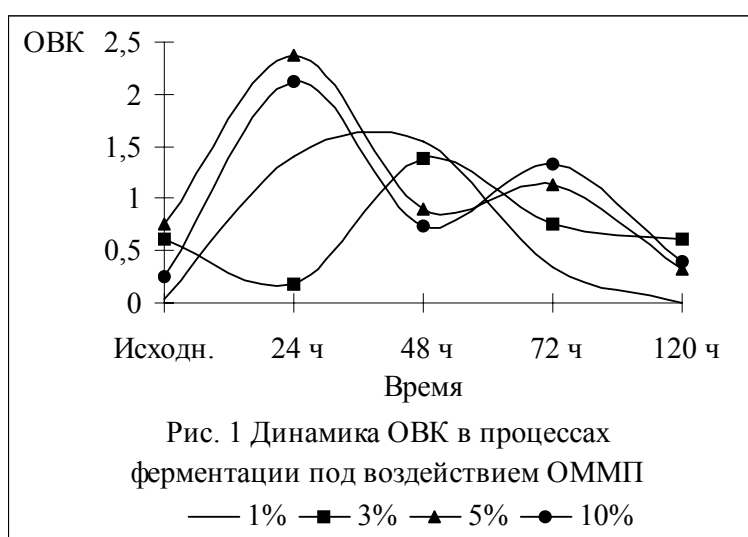
В главе 3 «Объекты и методы исследований» представлены схемы получения жидкофазных биологически активных средств и лабораторной установки для проведения аэробно-анаэробной ферментации. Дана характеристика исходного сырья и стимуляторов процесса, приводятся микробиологические и биохимические методы анализа различных органических субстратов. Статобработку полученных данных проводили с помощью программ STATGRAPHICS Plus версия 2.1 и Microsoft Excel; обработку ИК спектров – программами OPUS версия 2.06 и Origin версия 6.0.

В главе 4 «Разработка технологической линии получения жидкофазных биологически активных средств для растениеводства и земледелия» на первом этапе работа была направлена на выбор эффективных стимуляторов процесса ферментации. В качестве теста была использована ответная реакция углерод-трансформирующих микроорганизмов, развивающихся в течение процесса ферментации. В качестве стимуляторов рассматривались отходы предприятий Тверской области: мясоперерабатывающей промышленности (ОМПП), мукомольного производства (ОММП) и молочной промышленности (ОМП), используемые в количестве 5 % (масс.) от исходной смеси. Процессы трансформации углеродсодержащих соединений в процессе аэробно-анаэробной ферментации под влиянием стимулирующей деятельности пищевых отходов существенно различались между собой. Это, безусловно, связано с изначально различными

питательной ценностью отходов, содержанием микрофлоры и ее функциональной активностью. Статистическая обработка результатов показала тесную, но варьирующую при использовании различных стимуляторов, связь исследуемых микроорганизмов, потребляющих в качестве единственного источника углерода различные виды моно- и дисахаров, с динамикой общих сахаров, а также зависимость между развитием грибов и актиномицетов ($R = 0,86$). По совокупности полученных данных, к наиболее эффективному виду рассмотренных биостимуляторов были отнесены отходы мукомольного производства (ОММП).

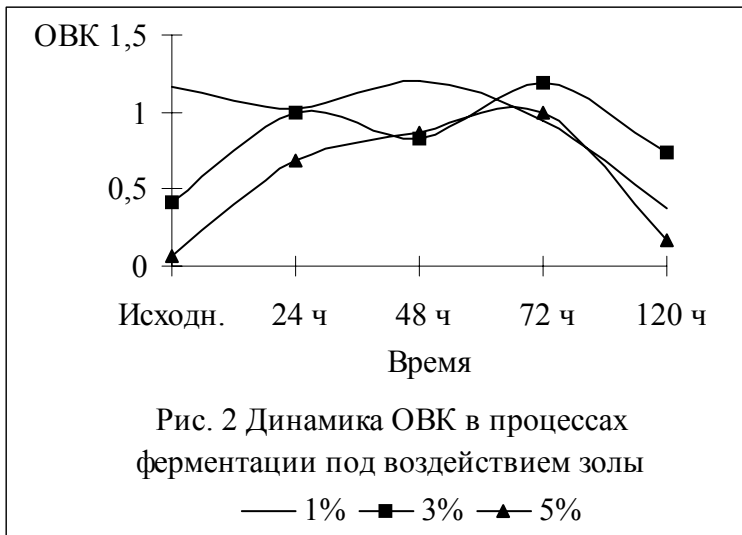
На втором этапе работы оценивалось влияние двух видов стимуляторов комплексного состава органической и неорганической природы (отходов мукомольного производства и древесной золы) на формирование продуктов ферментации с высокой физиологической активностью, обусловленной, наряду с углеводтрансформирующими микроорганизмами, деятельностью микроорганизмов, обеспечивающих трансформацию азота в ферментируемой смеси. Биостимуляторы использовались в различных концентрациях: ОММП – 1, 3, 5 и 10 %; зола – 1, 3 и 5 %.

Исследование ферментативной активности позволило установить направленность происходящих в органической массе ферментера преобразований. В качестве критерия оценки был выбран условный окислительно-восстановительный коэффициент (ОВК), который находят путем отношения каталазной активности к дегидрогеназной активности, взятых в условных единицах. ОВК наглядно демонстрирует изменения, происходящие в процессе ферментации – преобладание либо процессов распада ($ОВК > 1$), либо процессов синтеза ($ОВК < 1$).



При использовании в качестве стимуляторов и ОММП, и золы (рис. 1, 2) к концу процессов ферментации наблюдается преобладание синтезирующих реакций, то есть в течение 120 часов ферментации активные процессы минерализации близки к завершению.

В случае использования ОММП в процессе ферментации ОВК изменялся волнообразно – происходили активные процессы преобразований, чему способствовала органическая природа стимулятора. При использовании 1; 5 и 10% ОММП к концу процесса ферментации ОВК достаточно резко снижался (в случае внесения 1 % ОММП ОВК оказался равным 0,005), что свидетельствовало о близких к завершению процессах трансформации.



Помимо ферментативной активности в ходе процессов ферментации была определена численность микроорганизмов, использующих минеральные и органические формы азота, микроорганизмов, выделяющих свободные аминокислоты, а также энтеробактерий, являющихся продуцентами витаминов группы В.

Отмечено, что как при использовании золы, так и ОММП после пастеризационного периода наблюдается снижение указанных микроорганизмов практически во всех случаях. Однако синтезированные ими метаболиты могли быть либо использованы другими микроорганизмами, либо должны принимать непосредственное участие в процессах трансформации ферментируемой смеси.

В течение процесса ферментации было определено содержание ароматической аминокислоты триптофана, являющейся предшественником ИУК. В целом, использование древесной золы в качестве стимулятора процесса ферментации (особенно в количестве 1 – 3 %) способствовало большему накоплению триптофана в течение процесса по сравнению с применением отходов мукомольного производства.

В качестве критерия физиологической активности продуктов ферментации использовали определение содержания общих сахаров, поскольку последние необходимы для роста и развития растений. Максимальное содержание сахаров во всех вариантах приходилось на разные периоды течения процесса и не подчинялось каким-либо определенным закономерностям, так как на протяжении всего процесса углеводы активно включаются в метаболизм превращений, осуществляемых микрофлорой. Конечные продукты ферментации характеризовались содержанием сахаров от 30,63 мг/г а.с.в. до 89,74 мг/г а.с.в., определенным при использовании различных концентраций исследуемых стимуляторов.

Продукты ферментации и исходные смеси для их получения были впервые протестированы на содержание водорастворимых и жирорастворимых витаминов и афлатоксина В1 с помощью прибора Флюорат 02-2М с приставкой ВЭЖХ 01 в лаборатории массовых анализов ВНИИМЗ. Поскольку витамины и афлатоксин В1 могут быть использованы микроорганизмами в обменных процессах, вполне закономерным является факт снижения тех и других в продуктах ферментации. Так, в исходной смеси с использованием 5 % ОММП количе-

ство витамина Е снизилось с 10,7068 мг/кг до 8,6229, витамина В₂ с 0,693 мг/100г до 0,329, афлатоксина В1 с 0,007733 мг/кг до 0,000830. В этой связи, несмотря на снижение содержания некоторых витаминов, наиболее важным является понижение содержания афлатоксинов (практически на порядок). В целом, по содержанию афлатоксина В1 продукты ферментации можно отнести к категории экологически чистых, так как в различных проанализированных продуктах количество афлатоксинов уступает их содержанию в приготовленном из различных трав сене (0,015...1,26 мг/кг).

Благодаря анализу результатов микробиологических и биохимических исследований течения процессов ферментации к оптимальным концентрациям рассмотренных стимуляторов были отнесены 5 % ОММП и 3 % золы. Эти концентрации стимуляторов способствовали активным преобразованиям ферментируемой смеси и накоплению физиологически активных веществ в конечных продуктах, поэтому и были рекомендованы в этом качестве при получении жидкофазных биологически активных средств.

Следующий этап работы был посвящен отладке ферментационно-экстракционного способа получения жидкофазных биологически активных средств. Качество жидкофазных биосредств, полученных при отработке технологии, оценивали микробиологическим тестом – определением содержания обычно доминирующих в таких процессах N-трансформаторов – аммонифицирующих (на мясопептонном агаре) и амилалитических (на крахмало-аммиачном агаре) микроорганизмов. В различных типах реализации ферментационно-экстракционного процесса были выявлены оптимальные режимы ферментации и экстракции, способствующие появлению максимальной суммарной численности вышеуказанных микроорганизмов-доминантов (рис. 3).

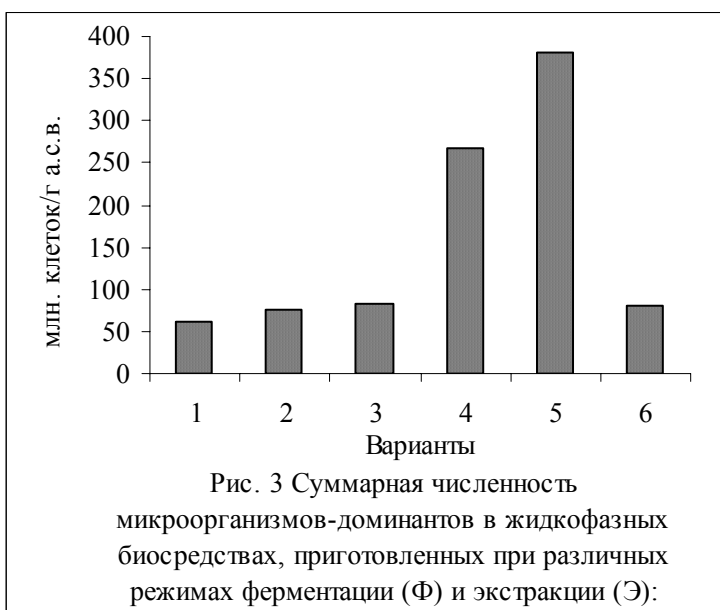


Рис. 3 Суммарная численность микроорганизмов-доминантов в жидкофазных биосредствах, приготовленных при различных режимах ферментации (Ф) и экстракции (Э):

Варианты ферментационно-экстракционных процессов:

- 1** – Ф = 120 ч при 37 °С,
Э = 72 ч при 37 °С;
- 2** – Ф = 120 ч при 55 °С,
Э = 24 ч при 37 °С;
- 3** – Ф = 72 ч при 37 °С + 48 ч при 55 °С,
Э = 72 ч при 22 °С;
- 4** – Ф = 72 ч при 37 °С + 48 ч при 75 °С,
Э = 48 ч при 22 °С;
- 5** – Ф = 48 ч при 37 °С + 24 ч при 55 °С + 48 ч при 37 °С,
Э = 48 ч при 22 °С;
- 6** – Ф = 48 ч при 37 °С + 24 ч при 75 °С + 48 ч при 37 °С,
Э = 24 ч при 22 °С.

В результате выбор был остановлен на ферментационно-экстракционном процессе, включающем два основных этапа:

– первый этап – ферментация, которая длится 48 ч при 37 °С, далее 24 ч при 55 °С и в завершении 48 ч при 37 °С;

– второй этап – стационарное экстрагирование 1 %-ным раствором K_2HPO_4 продолжительностью 48 ч при температуре 22 °С.

В целом, схему получения жидкофазных биологически активных средств можно представить следующим образом:

| | | |
|---|-------------|---|
| Исходное сырье для ферментации | | |
| Навоз КРС – 50 % | Торф – 50 % | ОММП – 5 % (масс.) или зола – 3 % (масс.) |
| ФЕРМЕНТАЦИЯ | | |
| 2 сут при 37 °С + 1 сут при 55 °С + 2 сут при 37 °С | | |
| Твердофазный продукт ферментации = исходное сырье для экстракции | | |
| ЭКСТРАКЦИЯ | | |
| Настаивание 2 сут при 22 °С в растворе K_2HPO_4 (1 %) | | |
| Настой продукта ферментации в экстрагенте | | |
| ФИЛЬТРАЦИЯ, РОЗЛИВ | | |
| Жидкофазное биологически активное средство | | |

На основании проведенных лабораторных экспериментов была создана полезная модель получения жидкофазных биологически активных средств для промышленного производства (рис. 4) с учетом корректировки состава конечного продукта по мере необходимости. Приведен оценочный расчет материальных потоков ферментационно-экстракционного процесса для случая использования 100 кг навоза, 100 кг торфа и 10 кг отходов мукомольного производства. На выходе, из 210 кг исходной смеси и 580 литров экстрагента с учетом потерь должно получиться не менее 665 литров 10 %-ного жидкофазного биосредства.

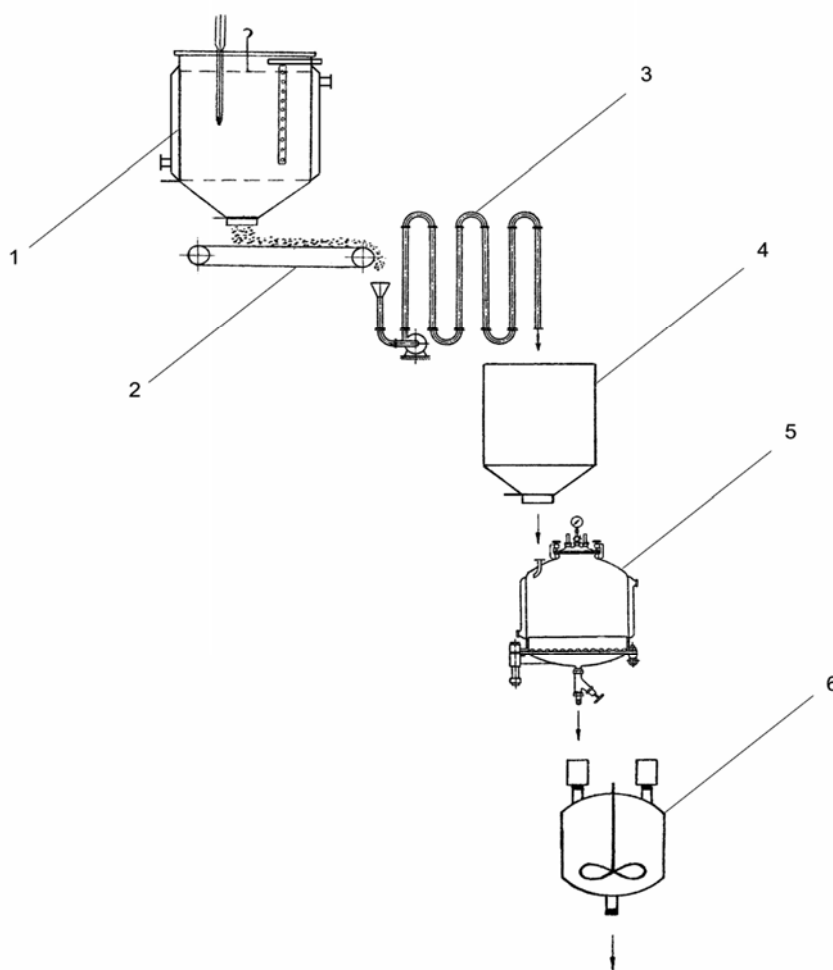


Рис. 4 Производственная модель технологической линии получения жидкофазных биологически активных средств

1 – ферментер, 2 – транспортер, 3 – экстрактор,
4 – накопительная емкость, 5 – фильтр, 6 – смеситель

В главе 5 «Обоснование целесообразности использования новых жидкофазных биологически активных средств в земледелии и растениеводстве» представлена характеристика состава и свойств получаемых жидкофазных биологически активных средств и на лабораторном уровне проверена эффективность их действия на биологические и агрохимические свойства почвы и растения. Показано, что жидкофазные биологически активные средства, приготовленные ферментационно-экстракционным способом, внешне представляют собою растворы (табл. 1).

Количество сухого вещества в биосредствах не превышает 3 %; при отстаивании они почти не дают осадка. Кислотность очень благоприятная – слабощелочная, не превышающая величину 8,0. Такой уровень кислотности при использовании биосредств в земледелии и растениеводстве должен положительно влиять на развитие бактериальной микрофлоры, предпочитающей нейт-

ральный или слабощелочной рН и тормозить развитие грибов, в том числе патогенной микрофлоры.

Таблица 1

Характеристика жидкофазных биологически активных средств

| Наименование показателя | Результаты |
|---|---|
| 1. Вид, цвет, консистенция | Жидкость темно-коричневого цвета |
| 2. Массовая доля сухого остатка, %, не более | 3,0 |
| 3. Кислотность (рН) | 7,5 – 8,0 |
| 4. Массовая доля общего азота (N), г/л | 0,2 – 0,25 |
| 5. Массовая доля углерода гумусовых кислот, г/л, не более | 1,0 |
| 6. Массовая доля общего фосфора (P ₂ O ₅), г/л | 10,0 – 15,0 |
| 7. Массовая доля общего калия (K ₂ O), г/л | 9,0 – 12,5 |
| 8. Массовая доля кальция (CaO), г/л, не более | 0,1 |
| 9. Массовая доля магния (MgO), г/л, не более | 0,5 |
| 10. Количество аммонифицирующих микроорганизмов, КОЕ/мл | 2,5x10 ⁹ ...2x10 ¹⁰ |
| 11. Количество амилалитических микроорганизмов, КОЕ/мл | 3x10 ⁸ ...7x10 ⁹ |
| 12. Количество микроорганизмов, выделяющих свободные аминокислоты, КОЕ/мл | 9x10 ⁸ ...1,5x10 ⁹ |
| 13. Количество фосфатмобилизующих микроорганизмов, КОЕ/мл | 1x10 ⁹ ...2x10 ⁹ |
| 14. Количество микроорганизмов, потребляющих глюкозу в качестве единственного источника углерода, КОЕ/мл | 7x10 ⁸ ...2x10 ⁹ |
| 15. Количество микроорганизмов, потребляющих сорбит в качестве единственного источника углерода, КОЕ/мл | 6x10 ⁸ ...1,5x10 ⁹ |
| 16. Количество микроорганизмов, потребляющих сахарозу в качестве единственного источника углерода, КОЕ/мл | 1,5x10 ⁹ ...2x10 ⁹ |
| 17. Количество энтеробактерий, КОЕ/мл, не более | 1x10 ⁵ ...3x10 ⁵ |
| 18. Массовая доля общих сахаров, мг/л, не менее | 300,0 |
| 19. Массовая доля триптофана, мг/л, не более | 3,0 |
| 20. Активность каталазы, см ³ O ₂ /мл/мин | 0,15 – 0,25 |
| 21. Активность НАДН ₂ -дегидрогеназы, мгТФФ/мл/сут | 1,5 – 2,0 |
| 22. Активность уреазы, мг NH ₃ /мл/сут | 1,5 – 8,5 |
| 23. Активность инвертазы, мг глюкозы/мл/сут | 0,15 – 0,3 |

Формированию БАС с высоким содержанием подвижного фосфора способствует 1 %-ная соль K_2HPO_4 , что подтверждено данными ИК спектроскопического исследования готовых биологически активных средств и калия фосфорнокислого (чда). При сравнении их ИК спектров, записанных на Фурье-ИК спектрометре «Equinox 55» фирмы «Bruker», наблюдалось совпадение основных полос поглощения в области деформационных колебаний – $1160 - 500 \text{ см}^{-1}$, соответствующих K_2HPO_4 (рис. 5).

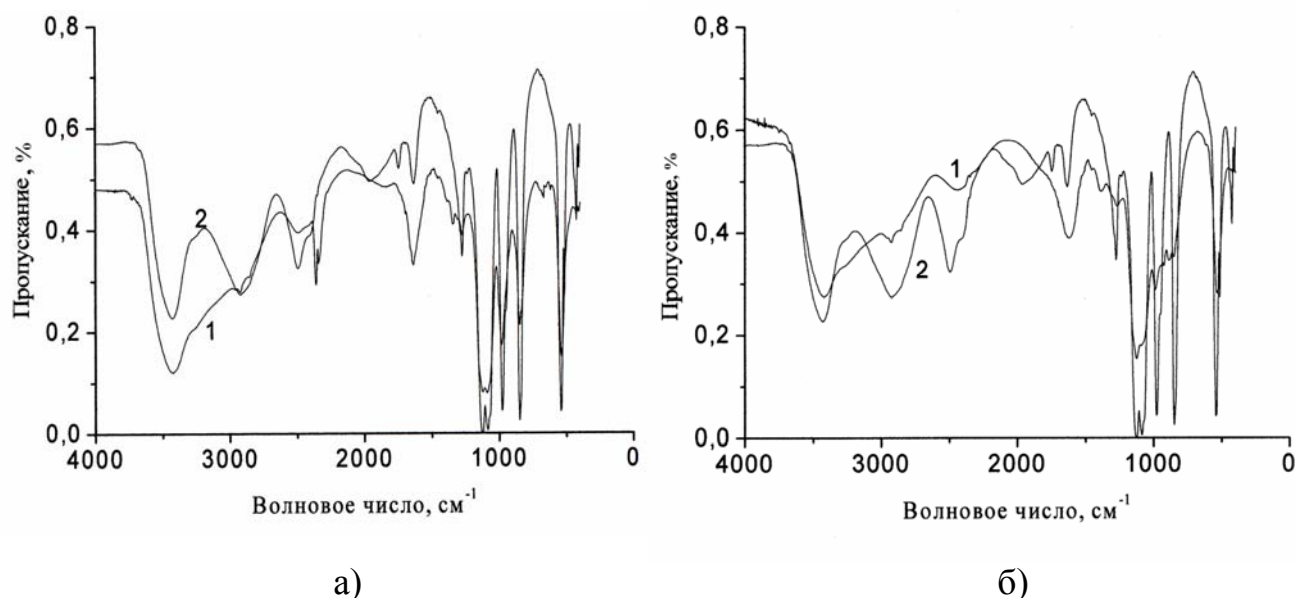


Рис. 5 а) ИК спектры жидкофазного биосредства с использованием ОММП (1) и K_2HPO_4 (2); б) ИК спектры жидкофазного биосредства с использованием золы (1) и K_2HPO_4 (2)

Сравнение состава получаемого жидкофазного биосредства (табл. 1) с жидким гуминовым удобрением "Эдагум[®] СМ" (производство группы компаний "СМ"), а также с экстрактом сапропеля (производство ООО «Гера», Московская обл., г. Лыткарино) свидетельствует, что жидкофазное биосредство, полученное во ВНИИМЗ, не относится к гуминовым удобрениям, но сравнимо с ними по отдельным показателям. К наиболее благоприятным факторам, свидетельствующим о хорошем качестве жидкофазного биосредства ВНИИМЗ, относятся: высокая численность агрономически полезной микрофлоры ($3 \times 10^8 \dots 2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл), высокое содержание подвижных форм фосфора (10 – 15 г/л) и калия (9 – 12,5 г/л), благоприятный уровень кислотности (рН 7,5 – 8,0). Для сравнения в экстракте сапропеля (массовая доля сухого остатка 5 %) основных физиологических групп микроорганизмов содержится $3 \times 10^5 \dots 9 \times 10^6$ КОЕ/мл; P_2O_5 – 2 г/л; K_2O – 3,5 г/л; рН = 10.

Следует подчеркнуть, что в случае необходимости предусмотрено обогащение жидкофазного биологически активного средства элементами питания в

зависимости от потребности растений (Патент 2006 г. на полезную модель № 57276). При этом желательна некоторая консервация деятельности микроорганизмов в случае длительного хранения биосредств, что может быть достигнуто добавлением веществ-консерваторов и стабилизаторов, а также регулированием температуры хранения.

Высокая численность микроорганизмов, обнаруженных в жидкофазных биосредствах, предопределяет их высокую биологическую активность, о которой частично можно судить по активности окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов.

При получении жидкофазных биосредств, процессы ферментации и последующая экстракция способствуют поэтапному существенному снижению активности практически всех ферментов, свидетельствуя о стабилизации их свойств. Так, активность каталазы в одном из экспериментов изменялась следующим образом:

- в исходной торфонавозной смеси с использованием биостимулятора ОММП в количестве 5 % (перед ферментацией) – $14,3 \text{ см}^3 \text{O}_2/\text{г}/\text{мин}$;
- в продукте ферментации – $3,9 \text{ см}^3 \text{O}_2/\text{г}/\text{мин}$;
- в жидкофазном биологически активном средстве – $0,3 \text{ см}^3 \text{O}_2/\text{мл}/\text{мин}$.

Об уровне физиологичности жидкофазных биологически активных средств можно судить по наличию триптофана и доступных сахаров. В биосредствах содержится довольно большое количество сахаров (не менее 300 мг/л), что предопределяет их использование в качестве биостимулятора для проращивания семенного материала, а также будет полезным для подкормки растений и формирования высокопитательного почвенного раствора.

В жидкофазном биологически активном средстве в количестве до 3,0 мг/л обнаруживается ароматическая аминокислота триптофан. В процессе своей жизнедеятельности растения используют ростовые вещества, как ими же синтезированные, так и находящиеся в почвенном растворе. В силу разных причин растения могут испытывать недостаток в физиологически активных веществах, поэтому использование биосредств, имеющих в своем составе триптофан, может принести ощутимую пользу.

По данным производителей экстракта сапропеля, используемого в производстве биоудобрений «ФлорГумат», общее количество аминокислот в нем составляет 235 мг/л. Жидкофазные биосредства, получаемые во ВНИИМЗ, ~ в 2 раза менее концентрированные. По аналогии с экстрактом сапропеля содержание аминокислот в нем должно быть меньше. В этой связи, обнаружение предшественника ИУК – триптофана в количестве 3,0 мг/л – достаточно неплохой результат, так как триптофан в ряду других аминокислот обычно не занимает лидирующих позиций, но обладает высокой активностью.

Содержание триптофана в жидкофазных биосредствах можно сравнить с его содержанием в твердофазных удобрениях, в частности Бамила, разработанного во ВНИИСХМ. В составе Бамила, полученного из продуктов аэробной переработки отходов свинокомплексов (активного ила и осадка сточных вод), обнаруживается 130 – 240 мкг/г L-триптофана. В жидкофазных биосредствах ВНИИМЗ при перерасчете на сухое вещество содержится ~ 375 мкг/г триптофана.

Консистенция жидкофазных биосредств и наличие необходимых растениям физиологически активных веществ позволяет рекомендовать их прежде всего для внекорневой подкормки, для опрыскивания зеленой массы на разных стадиях развития растений, для проращивания семян.

Кроме того, отмечено, что осадки, образующиеся после экстрагирования, отличаются высокой физиологической активностью и могут быть использованы в качестве подкормки под различные сельскохозяйственные культуры. В составе осадков обнаружена большая численность агрономически полезной микрофлоры (аммонифицирующие микроорганизмы – $9,2 \times 10^8 \dots 1 \times 10^9$ КОЕ/г; амилаолитические – $4,7 \times 10^8 \dots 5,0 \times 10^8$ КОЕ/г; фосфатмобилизующие – $4,7 \times 10^8 \dots 9,2 \times 10^8$ КОЕ/г; выделяющие свободные аминокислоты – $8,4 \times 10^7 \dots 1,9 \times 10^8$ КОЕ/г), а исследование содержания основных элементов (N – 0,98...1,0 %; P₂O₅ – 1,17...2,01 %; K₂O – 1,83...2,33 %) свидетельствует об их определенной питательной ценности. Таким образом, процесс получения жидкофазных биологически активных средств является безотходным производством, так как сопровождается одновременным получением другого биологически активного средства.

В модельных лабораторных экспериментах была выявлена реакция семян, растений и почв на жидкофазные биологически активные средства. Показано, что для предпосевной обработки семян яровой пшеницы в случае использования биосредства, приготовленного с добавлением 3 % золы, наиболее эффективной является 0,5 %-ная концентрация, а в случае использования биосредства, приготовленного с добавлением 5 % ОММП, – 0,3 %-ная концентрация. Установленные концентрации жидкофазных биосредств могут служить руководством при их использовании на семенах других культур.

Показана ответная реакция почвенных микроорганизмов (использующих минеральный и органический азот, фосфатмобилизующих, выделяющих свободные аминокислоты и др.) на способы, концентрации и объемы применяемых жидкофазных биосредств, приготовленных с использованием ОММП (5 %) и золы (3 %). Наибольшая суммарная численность микроорганизмов, выраженная в процентах к максимуму, при поливе в рядки была выявлена при применении обоих видов биосредств при концентрации 0,3 %. При опрыскивании почвы лучшие условия для развития микрофлоры формировались при применении

биосредства на основе ОММП в концентрации 0,45 %, а при применении биосредства на основе золы – при 0,3 % и 0,45 %.

Дополнительно был проведен модельный эксперимент с яровой пшеницей, связанный с изучением влияния на микрофлору почвы жидкофазного биосредства на основе золы, используемого в различных концентрациях. Было обнаружено развитие практически всех физиологических групп исследуемых микроорганизмов. Наибольшего количества достигали фосфатмобилизующие микроорганизмы ($5,8 \times 10^6 \dots 1,3 \times 10^7$ КОЕ/г) и микроорганизмы, способные использовать минеральные формы азота ($1,0 \times 10^7 \dots 2,2 \times 10^7$ КОЕ/г), численность которых была максимальной при концентрации биосредства 0,3 % и составляла величину вдвое большую, чем в контрольном варианте. Кроме того, при 0,3 %-ной концентрации биосредства наблюдалось увеличение \sim в 3 раза (до $4,1 \times 10^6$ КОЕ/г) по сравнению с контролем численности микроорганизмов, потребляющих глюкозу в качестве единственного источника углерода. Во всех вариантах почвы с применением жидкофазного биосредства по сравнению с контрольным вариантом снижалось содержание грибной флоры. Вероятнее всего это произошло в результате изменения уровня кислотности у большинства вариантов с применением биосредства по сравнению с контролем (рН контроля = 5,3, рН вариантов с биосредством варьировал от 5,50 до 5,66).

Максимальная активность окислительно-восстановительной пары ферментов каталазы и дегидрогеназы в данном модельном эксперименте наблюдалась также при концентрации жидкофазного биосредства 0,3 % – соответственно $1,18 \text{ см}^3 \text{ O}_2/\text{г}/\text{мин}$ и $3,32 \text{ ТФФ}/\text{г}/\text{сут}$.

Были проведены модельные эксперименты по изучению действия различных объемов тестируемых жидкофазных биосредств на развитие микрофлоры и биометрические показатели растений. В одном из экспериментов было установлено эффективное влияние жидкофазного биосредства, приготовленного с использованием ОММП, на развитие различных физиологических групп микрофлоры почвы под редисом: аммонифицирующих, фосфатмобилизующих, потребляющих различные моносахара (в качестве единственного источника углерода) и выделяющих свободные аминокислоты. Оптимум их развития преимущественно наблюдался при использовании жидкофазного биосредства в объеме $0,4 \text{ л}/\text{м}^2$. Кроме того, установлено, что этот же объем оказался оптимальным и для развития самого редиса.

Влияние различных объемов и концентраций жидкофазного биосредства на основе золы было изучено в модельном эксперименте с яровой пшеницей. Анализ полученных биометрических показателей яровой пшеницы, показал, что 0,3 %-ная концентрация жидкофазного биологически активного средства наиболее эффективна в объеме $0,4 \text{ л}/\text{м}^2$, а 0,5 %-ная концентрация – в объеме $0,2 \text{ л}/\text{м}^2$.

Резюмируя результаты, полученные в серии модельных экспериментов по изучению доз и концентраций жидкофазных биосредств, следует отметить различную потребность растений в биологически активных веществах. В частности, под редис рекомендуется вносить $0,4 \text{ л/м}^2$ $0,3 \%$ -ного биосредства, а под яровую пшеницу – $0,4 \text{ л/м}^2$ $0,3 \%$ -ного или $0,2 \text{ л/м}^2$ $0,5 \%$ -ного биосредства, то есть при увеличении концентрации жидкофазного биосредства его дозу следует уменьшать.

Влияние жидкофазных биосредств на состояние почвенного раствора было оценено в модельном эксперименте, длившемся 3 месяца. Использовались 2 дерново-подзолистые почвы с содержанием гумуса 1,41 и 2,57 %. Обработка почв разной степени гумусированности жидкофазными биосредствами показала, что за период проведения эксперимента гумусное состояние почв практически не изменилось (отсутствовала деструкция). Вместе с тем под действием жидкофазных биосредств обнаружен переход основных питательных элементов (N, P, K) в подвижное состояние (P_2O_5 , K_2O , NO_3^- , NH_4^+). По сути, благодаря выраженному биомелиорирующему эффекту жидкофазных биосредств, произошла оптимальная подготовка почв к их сельскохозяйственному использованию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный ферментационно-экстракционный способ позволяет получать многофункциональные жидкофазные биологически активные средства для нужд сельского хозяйства. Основываясь на данных модельных экспериментов по изучению влияния жидкофазных биосредств на почву и растения, следует вывод об их высоком биомелиорирующем эффекте и благоприятном прогнозе использования в земледелии и растениеводстве.

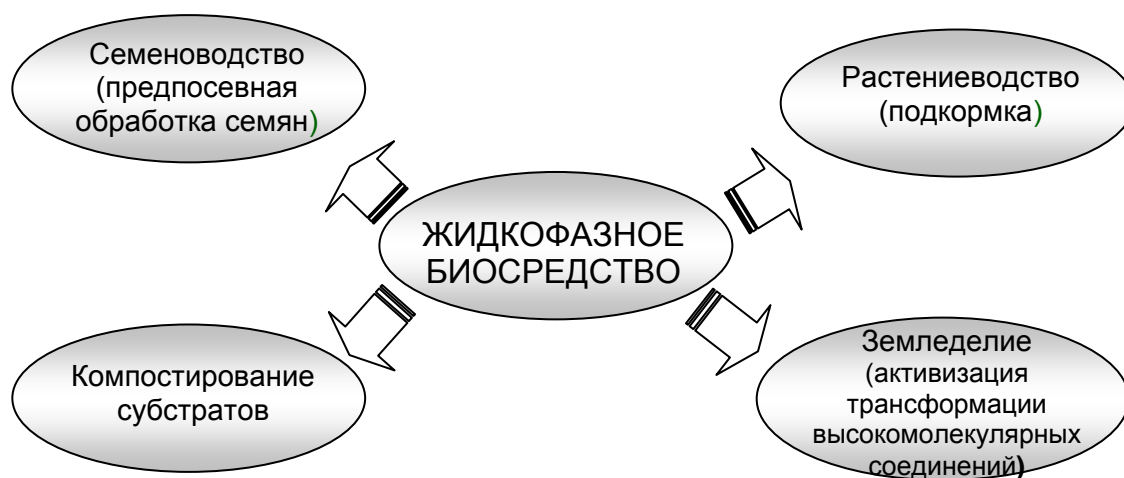


Рис. 6 Прогноз применения жидкофазных биосредств

Общая совокупность свойств и особенно высокий уровень микробной обсемененности жидкофазных биосредств, получаемых на основе возобновляемых сырьевых ресурсов, позволяет предположить их эффективное воздействие на трансформацию веществ в любом субстрате. В связи с этим, область применения жидкофазных биологически активных средств может быть значительно расширена.

ВЫВОДЫ

1. Процесс аэробно-анаэробной ферментации торфонавозной смеси обеспечивается развитием первичных деструкторов – грибов и актиномицетов, связанных высокой корреляционной связью ($R = 0,86$), аммонифицирующих микроорганизмов и микроорганизмов, способных к потреблению минеральных форм азота, микроорганизмов, выделяющих свободные аминокислоты.

2. Благодаря жизнедеятельности микрофлоры в конечных продуктах процесса ферментации происходит накопление физиологически активных веществ. Наилучшим накоплением характеризовались продукты, получаемые при использовании оптимальных концентраций двух видов стимуляторов процесса ферментации: 5 % ОММП и 3 % золы. Продукты ферментации, полученные с использованием 5 % ОММП, характеризовались высоким содержанием общих сахаров – 89,74 мг/г а.с.в.; витаминов группы В, в частности В₂ – 0,3290 мг/100 г; триптофана – 0,403 мг/г а.с.в; жиров – 1,53 %. По аналогичным показателям тестировались продукты ферментации, полученные с использованием 3 % золы: общие сахара – 69,67 мг/г а.с.в.; витамин В₂ – 0,2320 мг/100 г; триптофан – 0,790 мг/г а.с.в; жир – 1,84 %.

3. При использовании микробиологического теста (оценка содержания микроорганизмов-доминантов – аммонифицирующих и амилолитических) выявлены оптимальные параметры проведения ферментационно-экстракционного процесса получения жидкофазных биологически активных средств:

- этап ферментации – 48 ч (37 °С) + 24 ч (55 °С) + 48 ч (37 °С);
- этап экстрагирования – стационарная экстракция 1 %-ным раствором К₂НРО₄ продолжительностью 48 ч при температуре 22 °С.

4. Выявлены благоприятные факторы, отличающие жидкофазные биосредства от известных аналогов: высокая численность агрономически полезной микрофлоры ($3 \times 10^8 \dots 2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл), высокое содержание подвижных форм фосфора (10 – 15 г/л) и калия (9 – 12,5 г/л), благоприятный уровень кислотности (рН 7,5 – 8,0).

5. Установлено, что 0,3 %-ная концентрация жидкофазных биосредств достаточна и оптимальна для активизации почвенной микрофлоры: фосфатмобилизирующих микроорганизмов ($1,3 \times 10^7$ КОЕ/г), микроорганизмов, использую-

щих минеральные ($2,2 \times 10^7$ КОЕ/г) и органические (4×10^6 КОЕ/г) формы азота, выделяющих свободные аминокислоты ($4,6 \times 10^6$ КОЕ/г), потребляющих глюкозу в качестве единственного источника углерода ($4,1 \times 10^6$ КОЕ/г).

6. В модельных экспериментах по компостированию почв с жидкофазными биологически активными средствами на фоне отсутствия видимой деструкции гумуса обнаружен переход основных питательных элементов (N, P, K) в подвижное состояние, что обеспечивает их доступность растениям.

7. Показана перспективность применения получаемых жидкофазных биологически активных средств: в семеноводстве – для проращивания семян; в растениеводстве – для подкормки растений; в земледелии – в качестве земледобрильных препаратов; а также при решении вопросов, связанных с оптимизацией компостирования органических субстратов.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Для предпосевной обработки семян яровой пшеницы рекомендуется использовать 0,5 %-ную концентрацию жидкофазного биосредства на основе золы и 0,3 %-ную концентрацию жидкофазного биосредства на основе отходов мукомольного производства.

Для активизации почвенных процессов под редисом, а также улучшения биометрических показателей самого редиса на 1 м^2 почвенной поверхности рекомендуется вносить 0,4 л 0,3 %-ного жидкофазного биосредства (в результате перерасчета с данных модельных экспериментов). Аналогичную дозу 0,3 %-ного биосредства рекомендуется вносить и под яровую пшеницу, однако, при увеличении концентрации биосредства до 0,5 % оптимальную дозу необходимо снизить до $0,2 \text{ л/м}^2$.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Процессы биоконверсии: микробиологический анализ и поиск путей интенсификации / Молчанов В.П., Тактаров Э.А., Сульман Э.М., Фомичева Н.В., Ковалев Н.Г., Рабинович Г.Ю. // Всероссийская заочная конференция «Перспективы развития Волжского региона», выпуск 3, Тверь: ТГТУ, 2001. – С. 89-91.

2. Перспективы использования биологически активных продуктов, получаемых в процессе углубленной переработки торфонавозных смесей / Рабинович Г.Ю., Ковалев Н.Г., Рабинович Р.М., Фомичева Н.В. // Международная научно-практическая конференция «Высокие технологии добычи, глубокой переработки и использования озерно-болотных отложений». Томск, 2003. – С. 160-161.

3. Процессы и качество продуктов твердофазной ферментации: Методическое пособие / Рабинович Г.Ю., Ковалев Н.Г., Фомичева Н.В., Рабинович Р.М. – Москва-Тверь, 2003. – 54 с.

4. Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В., Ковалев Н.Г. Технология получения биологически активного средства на основе продуктов ферментации органического сырья: Технологические решения и рекомендации. – Тверь: ЧуДо, 2005. – 14 с.

5. Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В. Биопрепараты на основе продуктов ферментации и их апробация в семеноводстве // Международная научно-практическая конференция «Научно-производственное обеспечение развития сельского социума». – М.: Изд-во "Современные тетради", 2005. – С. 367-371.

6. Фомичева Н.В. Разработка технологической линии производства биомелиорантов (биоактивного средства) для растениеводства в гумидной зоне РФ // 2-ая Всероссийская конференция молодых ученых "Новые технологии и экологическая безопасность в мелиорации". Коломна, 2005. -С. 130-135.

7. Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В. Тестирование продуктов ферментации органического сырья на содержание физиологически активных веществ // Всероссийская научная конференция "Почвоведение и агрохимия XXI века". С.-Петербург, 2006. – С. 178-179.

8. Фомичева Н.В. Влияние биологически активного средства на улучшение жизнедеятельности почвенной микрофлоры мелиорированных земель // 3-я Всероссийская конференция молодых ученых «Новые технологии и экологическая безопасность в мелиорации». Коломна, 2006. – С. 225-229.

9. Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В. Ферментационно-экстракционный способ получения биологически активных средств // Международная научно-практическая конференция «Научно-производственное обеспечение развития комплексных мелиораций Прикаспия». – М.: Изд-во "Современные тетради", 2006. – С. 392-395.

10. Рабинович Г.Ю., Ковалев Н.Г., Фомичева Н.В. Экспериментальные данные для разработки способов использования биологически активных средств. – Тверь, 2006. – 20 с.

11. Фомичева Н.В., Смирнова Ю.Д. Создание новых жидкофазных биосредств и тестирование их состава методом ИК спектроскопии // XIV Региональные Каргинские чтения, областная научно-техническая конференция молодых ученых “Физика, химия и новые технологии”. Тверь, 2007 – С. 66.

12. Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В., Барановский И.Н. Разработка новых видов жидкофазных биологически активных средств // Международная научно-практическая конференция «Стабилизация производства и развитие агропромышленного комплекса региона на основе внедрения инновационных технологий». – Тверь, 2007. – С. 108-111.

13. Рабинович Г.Ю., Ковалев Н.Г., Фомичева Н.В. Новый вид биологически активных средств: получение, состав, перспективы использования // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2007. – № 3. – С. 71-72.

14. Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В. Развитие углеродтрансформирующих микроорганизмов в процессах экспрессной ферментации при использовании пищевых отходов // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2007. – № 3. – С. 25-27.

15. Фомичева Н.В., Рабинович Г.Ю. Перспектива использования жидкофазных биологически активных средств в системе комплексных мелиораций // 4-я Всероссийская конференция молодых ученых «Новые технологии и экологическая безопасность в мелиорации». Коломна, 2007. – С. 320-324.

16. Патент № 2264460 РФ. Способ получения биологически активного средства для роста и развития растений / Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В., Ковалев Н.Г., Рабинович Р.М., Сульман Э.М. (31.12.2003).

17. Патент на полезную модель № 50530 РФ. Поточная линия для получения биологически активного средства в концентрированном виде / Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В., Ковалев Н.Г. (01.08.2005).

18. Патент на полезную модель № 57276 РФ. Поточная линия для получения концентрированного биологически активного средства, обогащенного микроэлементами / Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В., Ковалев Н.Г. (25.04.2006).

Подписано в печать 3.10.2007 г.
Гарнитура *Times New Roman*
Тираж 100 экземпляров
Заказ № 29; 1,3 усл.печ.л.
Изготовлено «Чудо», г.Тверь