

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНОГО МИНЕРАЛА ГЛАУКОНИТА В ПОЧВООБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ ОСВОЕНИИ ТЕХНОГЕННЫХ МАССИВОВ И ЛИКВИДАЦИИ ПРЕДПРИЯТИЙ ПО ДОБЫЧЕ ПОЛЕЗНЫХ ИСКОПАЕМЫХ

Щербакова Н. Н.¹, Ханцев З. Ю.², Захаревич А. М.¹, Вениг С. Б.¹, Сержантов В. Г.³

¹*Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского;*

²*Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова;*

³*ООО «ЭкоСорбент», Саратов*

Проблема восстановления плодородия земель является насущной как для сельскохозяйственных и промышленных предприятий и крупных городов, так и для горнодобывающих предприятий. Размеры земельных отводов крупнейших горнодобывающих предприятий измеряются тысячами гектаров отчуждаемых и нарушаемых земель. Конституция Российской Федерации закрепила право человека на благоприятную окружающую среду в Федеральных законах «Об охране окружающей среды», «О недрах», «Об Экологической экспертизе», «Об отходах производства и потребления», «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», «Об охране атмосферного воздуха» и др.

Чтобы превратить в почвы бесплодные породы, необходимо сформировать плодородие, т. е. способность растений производить урожай. Почвообразовательный процесс происходит на поверхности минеральной матрицы при непременном участии живых организмов, под влиянием органических соединений, выделяемых простейшими организмами при жизни, и остающихся после их отмирания и перегнивания. Часть органических соединений вступает в реакцию с минеральными веществами с образованием органо-минеральных комплексов, бактерии влияют и на физико-химические свойства почвы. Известны микробные препараты, способные улучшать минеральное питание растений, повышать рост, урожайность и устойчивость к неблагоприятным факторам [1, 3]. Для ускорения почвообразования необходимо инициировать этот процесс в верхней корочке плотной горной породы, улучшая при этом условия минерального питания живых организмов и обеспечение водой. Приступая к разработке биотехнологических основ использования природных минералов в почвообразовательных процессах, авторы ос-

новывались на свойствах природных минералов и концепции матричной организации почвы. Минеральная матрица определяет особенности органоминеральной матрицы, ее физические свойства, активные центры минеральной матрицы участвуют в каталитических реакциях [2].

Таким образом, чтобы создать условия для развития растительного покрова, и поселения более требовательных к условиям жизни организмов, независимо от минералогического состава почвы, необходимо разработать органоминеральный комплекс, затравку из жизнеспособных штаммов и решить следующие задачи:

1. Выбрать природный минерал для минеральной матрицы и способы его обработки для придания необходимой формы.

2. Подобрать жизнеспособные и очень продуктивные бактерии для организации процесса почвообразования.

3. Разработать технологию получения жизнеспособных бактериальных форм, наименее подверженных температурным колебаниям, воздействию света, давления, pH среды и т. д., обладающих наиболее длительными сроками хранения.

Формирование биоценозов в грунтах следует рассматривать, как процесс, в котором микроорганизмы вступают в постоянные взаимодействия и преобладают наиболее приспособленные к данным условиям, способные быстро адаптироваться и перестраиваться. По сравнению со свободными микроорганизмами, иммобилизованные обладают большей активностью, адсорбированные, они способны осуществлять гидролиз полимеров с образованием доступных мономеров – сахаров, аминокислот, органических кислот, спиртов и т. д., что ведет к лучшему обеспечению питания прочие организмы. В биоценозы почвы постоянно извне вносятся дополнительные компоненты питания и посторонние микроорганизмы,

поэтому иммобилизованные на частичках минеральной матрицы (субстрата) микроорганизмы будут более конкурентоспособными по сравнению с внесенными свободными. В иммобилизованном состоянии микроорганизмы имеют преимущества: более продолжительное активное функционирование клеток; расширение pH и температурных пределов функционирования; большую устойчивость к негативным воздействиям окружающей среды. Иммобилизованные микроорганизмы создают предгумусовые компоненты в ходе физико-химических процессов, нормируемых минеральной матрицей почвы, которая характеризуется размерами активной поверхности, химическим и минералогическим составом, адсорбционной емкостью и др. Минеральная основа органо-минерального комплекса определяет каталитические, обменные и адсорбционные процессы, поглощение и движение воды, снабжение растений питательными элементами.

Природные алюмосиликаты являются минеральным катализатором в почве, их высокая эффективность обусловлена структурой и катионообменной емкостью: в их присутствии и на поверхности, происходят процессы, приводящие к укрупнению органических молекул. Глауконит наиболее ценен как матрица, его отрицательная структурная решетка состоит из листовых форм, и способные к обмену катионы располагаются в межплоскостных положениях или примыкают к поверхностям частиц. При помещении глауконита в водный раствор, часть межслоевых и поверхностных катионов может быть быстро замещена катионами раствора [4,5]. Кроме того, глауконит, благодаря дешевизне и простоте использования, высокой термостабильности и обменной емкости, устойчивости к органическим растворителям и микробному разложению является хорошим носителем для иммобилизации различных микроорганизмов. Являясь одним из компонентов почвы, он способен оказывать положительное влияние на активность и динамику развития почвенных микробных популяций, образования гумуса и агрегацию почвы. Глауконит-мелиорант, аккумулируя влагу из атмосферы, снижает жесткость почвенной влаги, способствует сдвигу pH в щелочную сторону, что благоприятно сказывается на развитии ризосферных микроорганизмов, которые впадают в состояние анабиоза при кислых значениях.

Основу разработанной авторами биотехнологии составляет создание активного глаукони-

тового сорбента, который блокируя распространение вредных веществ, является одновременно носителем биоматериала. Технологический процесс получения глауконитового сорбента включает механохимическую активацию сырья с получением наноразмерных частиц и воздушной классификацией, что позволяет получать необходимый фракционный состав глауконитового порошка с предупреждением агрегации частиц [6–7]. Проведены исследования по определению адсорбционной емкости глауконита, обработанного различными способами: глауконит-концентрат исходный и после обработки СВЧ, глауконит порошок с размерами частиц 60 мкм так же исходный и после обработки СВЧ, и бентонита (порошок). Измерение адсорбционной емкости носителей производили при помощи ионов меди. Через 5 часов наибольшей адсорбционной способностью обладал порошок глауконита, при этом обработка СВЧ повышала адсорбционную способность примерно на 16.5 %. [7].

Проведены исследования обогащенного мелкодисперсного глауконита Белозерского месторождения как сорбента тяжелых металлов, т. к. присутствие тяжелых металлов снижает уровень общего микробного числа (ОМЧ) в почве. В качестве загрязнителей почвы использовали ацетат свинца (II) ($Pb(CH_3COO)_2$) (ЧДА) и сульфат цинка ($ZnSO_4$) (Ч). Микробиологические исследования показали, что использование глауконита способствовало постепенному восстановлению численности микроорганизмов: через 30 суток экспозиции загрязненной почвы показали увеличение количества микроорганизмов почти в 2 раза, в том числе количество микромицетов, актиномицетов и азотфиксирующих бактерий приблизилось к исходному их числу в незагрязненной почве [8]. Таким образом, обладая хорошими сорбционными свойствами, глауконит, сорбируя ионы цинка и свинца, нивелирует их действие на микроорганизмы.

К основным механизмам полезного действия микроорганизмов на растения относится фиксация атмосферного азота (улучшение азотного питания), повышение коэффициента использования питательных элементов из удобрений и почвы, оптимизация и стимуляция роста и развития растений, подавление развития фитопатогенов, повышение продуктивности растений на фоне водного дефицита и неблагоприятных температур, повышенной кислотности, засоления или загрязнения почвы. Микробные

препараты позволяют направленно регулировать состав и численность микробного комплекса на корнях растений в соответствии с потребностями и возможностями растений. С целью получения сухих препаративных форм в виде порошка и гранул, проведены эксперименты по созданию комплексных биопрепаратов, содержащих в качестве активного компонента иммобилизованных на частицах глауконита производственных штаммов *Agrobacterium radiobacter* 204 *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 [9]. *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Flaviobacterium fulvum* L 30 применяются в качестве бактериальных удобрений по коммерческими названиями «Агробактерин», «Ризоторфин», «Флавобактерин» соответствен-

но, а *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 является действующим началом в биофунгициде «Псевдобактерин 2». Данные биопрепараты выпускаются биофабрикой Саратовского филиала ФГБУ «Россельхозцентр». Микроорганизмы культивировали на соответствующих жидких питательных средах с дальнейшей иммобилизацией на глауконите и высушиванием. На рисунке 1 а представлена культура производственного штамма *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 (рост на среде Кинга В) – грамотрицательные, прямые или слегка изогнутые палочки, размером $0.6 \times 2 - 3.0$ мкм. Производственный штамм *Flaviobacterium fulvum* L-30 представлен на рисунке 1 б – тонкие, неподвижные неспорообразующие палочки размером $0.5 \times 1.2 - 1.3$ мкм, на среде Кинга В образуют блестящие желто-коричневые колонии.

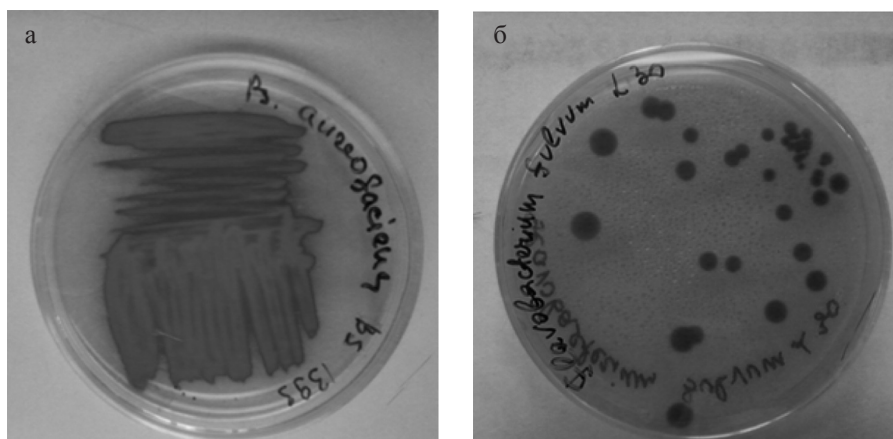


Рис. 1. Микроорганизмы, культивированные на жидких питательных средах: а – производственный штамм *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393, б – производственный штамм *Flaviobacterium fulvum* L-30

Весовое соотношение биомассы и глауконита составляло от 1:1 до 1:4. Высушивание, проводили в естественных условиях и при помощи роторно-вакуумного испарителя. На ри-

сунке 2 представлен производственный штамм *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii* культивированный в жидкой среде, и иммобилизованного на глауконите, его сухая порошковая форма.

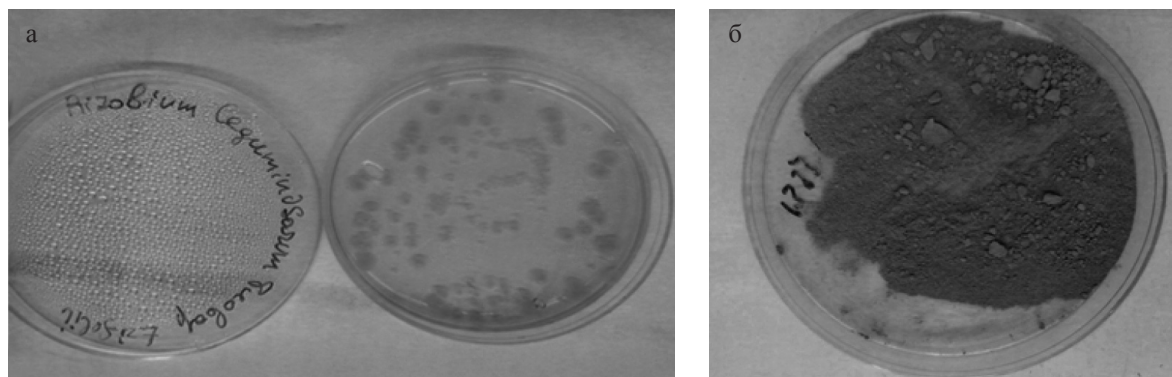


Рис. 2. Производственный штамм *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*: а – культивировано в жидкой среде; б – сухая порошковая форма (иммобилизация на глауконите)

На рисунке 3 представлены электронно-микроскопические изображения минеральной матрицы для иммобилизации бактерий – мелкодис-

перного порошка глауконитового концентрата и пленки бактерий ризобий на поверхности минерала.

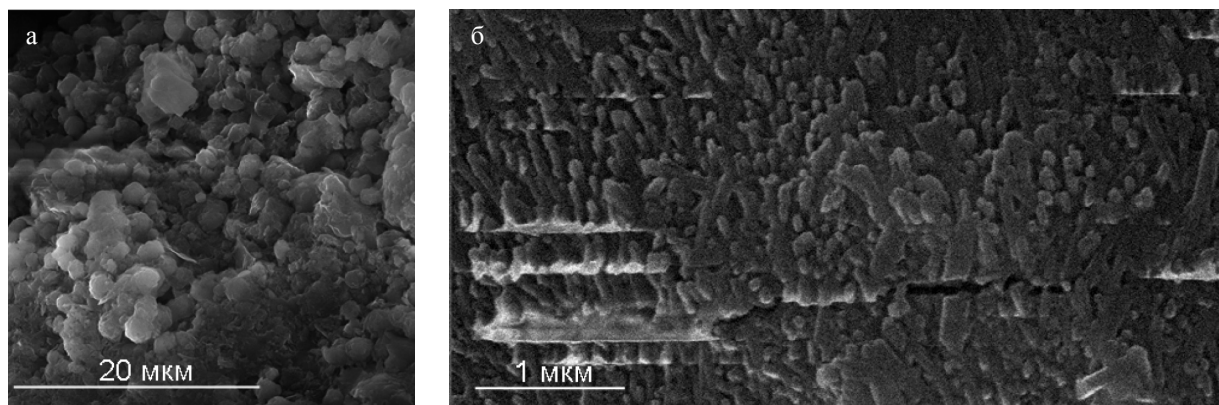


Рис. 3. Мелкодисперсная фракция обогащенного глауконита (а) и пленка ризобии (б) на поверхности минерала

Полученные образцы хранили при температуре 22–24 °С. В таблице 1 приведены результа-

ты определения жизнеспособности иммобилизованных бактерий в течение 4 месяцев.

Таблица 1

Изменение титра при хранении *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393, *Flaviobacterium fulvum* L 30 на глауконите (порошковая форма) (КОЕ/г глауконита) (Р₀, 95)

Биомасса: глауконит	Порошковая форма биопрепарата, полученная высушиванием при 22–24 °С		Порошковая форма биопрепарата, полученная выпариванием на роторно-вакуумном испарителе при 40 °С	
	0	4 мес.	0	4 мес.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> биовар <i>trifolii</i>				
1:1	2.1×10^9	1.2×10^9	1.8×10^9	9.9×10^8
1:2	2.5×10^9	1.4×10^9	2.0×10^9	1.2×10^9
1:4	2.4×10^9	1.6×10^9	1.9×10^9	1.1×10^9
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 204				
1:1	2.0×10^9	1.2×10^9	1.4×10^9	9.0×10^8
1:2	2.3×10^9	1.1×10^9	1.8×10^9	1.0×10^9
1:4	2.1×10^9	1.4×10^9	1.6×10^9	9.8×10^8
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> BS 1393				
1:1	2.4×10^9	1.0×10^9	1.9×10^9	8.3×10^8
1:2	2.7×10^9	1.6×10^9	1.7×10^9	9.7×10^8
1:4	2.6×10^9	1.3×10^9	1.8×10^9	9.6×10^8
<i>Flaviobacterium fulvum</i> L 30				
1:1	1.9×10^9	9.9×10^8	1.3×10^9	8.9×10^8
1:2	2.0×10^9	1.0×10^9	1.5×10^9	9.3×10^8
1:4	2.4×10^9	1.1×10^9	1.3×10^9	9.9×10^8

Данные таблицы свидетельствуют, что через 4 месяца хранения при температуре 22–24 °С титр микроорганизмов, в большинстве образцов, полученных при высушивании в течение 24 часов при 22–24 °С превышал 1×10^9 КОЕ/г, а в образцах, полученных путем выпаривания на роторно-вакуумном испарителе в течение 40 мин при 40 °С титр микроорганизмов был ниже 1×10^9 КОЕ/г.

Согласно результатам проведенных экспериментов, наиболее оптимальное весовое соотношение «биомасса: носитель (глауконит)» составляет 1:2 и 1:4.

Изготовление глауконитовых гранул с соотношением «биомасса: носитель (глауконит)» 1:4 проводилось методом экструзии на шнековом грануляторе. Длительность процесса формирования составляла 10–15 мин, температура

не более 40 °С. Высушивание гранул проводили в течение 24 часов при 22–24 °С. На рисунке 4 представлена фотография глауконитовой гранулы, показывающая пористость ее структуры.

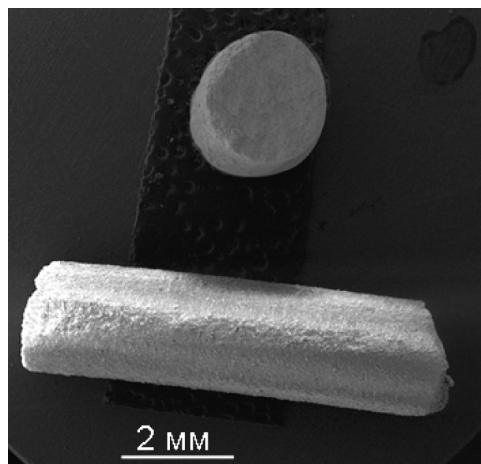


Рис. 4. Общий вид глауконитовой гранулы с иммобилизованными микроорганизмами

Гранулы так же хранились на протяжении 4 месяцев. В таблице 2 представлены результаты определения жизнеспособности иммобилизованных на глауконитовых гранулах микроорганизмов. Из таблицы видно, что через 4 месяца хранения количество живых микроорганизмов составляет не менее 10^9 КОЕ/г.

Таким образом, нами показано, что на основе глауконита Белоозерского месторождения, могут быть получены длительно жизнеспособные биоактивные композиты при иммобилизации бактериальных клеток *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393. Технология использования их достаточно проста: биоактивные композиты вносятся на поверхность почвы на обширных

территориях, вспашка и увлажнение способствуют быстрейшему началу почвообразовательного процесса [10].

Таблица 2

Изменение титра *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393, *Flaviobacterium fulvum* L 30 при хранении на глауконитовых гранулах (КОЕ/г глауконита) (Р₀, 95)

Микроорганизм	Срок хранения	
	0	4 мес
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	2.3×10^9	1.2×10^9
<i>Rhizobium leguminosarum</i> биовар <i>trifolii</i>	2.5×10^9	1.4×10^9
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> BS 1393	2.1×10^9	1.0×10^9
<i>Flaviobacterium fulvum</i> L 30	2.6×10^9	1.0×10^9

Представленные биотехнологии основаны на использования природного легкодоступного минерала глауконита.

Разработанные глауконитовые сорбенты отличаются многофункциональностью: опасный агент связывается с сорбентом не только физически за счет сформированной тонкопористой структуры сорбента, но и химически за счет процессов ионообмена, происходящих благодаря природе слоистого силиката глауконита, активная функция которого не только сохраняется, но и усиливается. Глауконит с иммобилизованными бактериями является безопасным самовосстанавливающимся сорбентом вредных веществ и средством, способствующим восстановлению и увеличению биологической продуктивности почв и улучшению их качественного состава в зонах техногенных катастроф и горных отвалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хапцев З. Ю., Степанов С. А. Создание иммобилизованных форм биопрепаратов для повышения плодородия почв на основе глауконита // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и био-технологий». Под ред. А. В. Молчанова, В. В. Строгова. Саратов: Издательский центр «Наука», 2017. С. 138–146.
2. Зубкова Т. А., Карпачевский Л. О. Нанотехнологии в почве // Теоретическая и прикладная экология, 2009. № 1. С. 4–9.
3. Вениг С. Б., Сержантов В. Г., Сплюхин В. П., Шаповал О. Г., Щербакова Н. Н., Селифонова Е. И., Наумова Г. Н., Захаревич А. М. Биологически активный комплекс на основе природного сорбента // Сб. науч. трудов по матер. Межд. научно-практич. конф. «Актуальные проблемы развития современной науки и образования». 2015. С. 48–50.
4. Селифонов А. А., Вениг С. Б., Бессуднова Н. О., Сержантов В. Г., Падалкина О. А., Сплюхин В. П., Щербакова Н. Н. Изучение сорбционных свойств различных фракций природного сорбента // Сб. статей по материалам II Всероссийского семинара памяти профессора Ю. П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения». Саратов, 2015. С. 111–115.

5. Щербакова Н. Н., Синельцев А. А., Сержантов В. Г. Эффективный комплексный сорбент для очистки воды на основе природного сырья // Сб. материалов III международной конференции по химии и химической технологии НАН Р А 16–20 сентября, Ереван. 2013. С. 616.

6. Щербакова Н. Н., Синельцев А. А. Обогащение глауконитовых песков месторождений Саратовской области // Технологическая минералогия в оптимизации процессов рудоподготовки и обогащения минерального сырья. Сб. статей по материалам докладов VIII Российского семинара по технологической минералогии. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. С. 159–163.

7. Сержантов В. Г., Синельцев А. А., Рыбков В. С., Щербакова Н. Н. Создание производственного комплекса по выпуску экспортно-направленной импортозамещающей продукции: многоцелевого глауконитового концентрата и гранулированных наноструктурированных сорбентов нового поколения с использова-

нием СВЧ-излучения // Седьмой саратовский салон изобретений, инноваций и инвестиций, 20–22 марта 2012 г. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2012. С. 12–13.

8. Хапцев З. Ю. Глауконит-перспективный носитель для создания сухих препаративных форм биоудобрений // Материалы IV международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии». Под ред. А. В. Банниковой, О. С. Ларионовой. Саратов: ИЦ «Наука», 2017. С. 217–222.

9. Горельникова Е. А., Хапцев З. Ю. и др. Биотехнологические подходы к использованию глауконита в сельском хозяйстве // Аграрный научный журнал, 2018. № 5. С. 11.

10. Патент РФ № 2403103 Способ детоксикации грунта, загрязненного нефтепродуктами / Сержантов В. Г., Сержантов В. В., Сержантов Д. В. Патентообладатель Сержантов В. Г., заявл. 01.11.2009, опубл. 10.11.2010.