+7 916 235 9745
biostrategy.ru

АНАЛИЗЫ. ПОМЁТ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ПО ТЕХНОЛОГИИ «ЭКОР-К»

Задача:

1. Исследование влияния серии разведений гумата «ЭКОР-К» на физико-биохимические показатели птичьего помёта.
2. Исследование влияния серии разведений гумата «ЭКОР-К» на физико-биохимические показатели навоза КРС.

Протокол испытаний 1: Влияние концентраций гумата калия «ЭКОР-К» на физико-биохимические показатели птичьего помёта в дозировке 10, 30 и 50л/т. Время экспозиции 24 часа.

Таблица №1: **Анализ исходного сырья**

№	*Показатель*	*Количество,%*
1	pH	6,8
2	Зола	18,5
3	Влажность	15,2
4	Азот общий	2,7
5	Фосфор	2,1
6	Калий	1,4
7	Медь	15,6 мг
8	Железо	154 мг
9	Кальций	336 мг
10	Магний	14,3 мг
11	Молибден	3,2 мг
12	Аминокислоты общ.	1,4
13	Яйца гельминтов	Не обнаружено
14	Стафилококковый индекс	0,03
15	Энтеробактерии	32 КОЕ
16	Коли-фаги	Не обнаружено
17	Патогенная микробиота	525 КОЕ

Таблица №2: **физико-биохимические показатели птичьего помёта** при обработке гуматом калия «ЭКОР-К» в дозировке 10, 30 и 50 л/т. Время экспозиции 24 часа.

№	*Показатель*	*Количество,%*		
		10 л/т	**30 л/т**	**50 л/т**
1	pH	6,8	6,5	7,4
2	Зола	18,5	19,3	19,1
3	Влажность	15,2	16,1	17,5
4	Азот общий	2,7	3,2	6,1
5	Фосфор	2,1	2,5	2,4
6	Калий	1,4	2,3	3,8
7	Медь	15,6мг	15,1мг	18,5мг
8	Железо	154мг	142мг	121мг
9	Кальций	336мг	352мг	385мг
10	Магний	14,3мг	12,8мг	12,2мг
11	Молибден	3,2мг	3,5мг	3,8мг

12	Аминокислоты общ.	1,4	2,5	5,1
13	Яйца гельминтов	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
14	Стафилококковый индекс	0,03	<0,03	<0,03
15	Энтеробактерии	32 КОЕ	Не обнаружено	Не обнаружено
16	Коли-фаги	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
17	Патогенная микробиота	212 КОЕ	75 КОЕ	12 КОЕ

Вывод: В результате эксперимента полезная микрофлора увеличилась в 9 раз, а патогенная уменьшилась в 25 тысяч раз. При количестве 50л/т гумата «ЭКОР-К» произошёл процесс ускоренной переработки, как результат удалось сохранить макро- и микросоставляющую в том виде, в каком они изначально заложены. Процентное содержание макросоставляющей и микросоставляющей не изменился. Аммиачный азот уменьшился, запах пропал сразу после внесения рабочего раствора.

Через 7 дней исследуемый помёт представлял собой рассыпчатую массу от тёмно-коричневого до чёрного цвета, без характерного запаха аммиака и других неприятных запахов. Масса рассыпалась и была пригодна для применения на полях. Как видно с анализа, она насытилась микрофлорой, и процесс ферментации продолжался. По содержанию вредных веществ и тяжёлых металлов, по содержанию макро- и микроэлементов, необходимых для нормального развития растений, полученный продукт отвечает требованиям ТУ 984900300008064-95 и СанПиН 2.1.7.573-96. Полученные высокоэффективные удобрения могут быть рекомендованы для применения в сельском хозяйстве и на садово-огородных участках для восстановления плодородия почв, получения более высоких урожаев, повышения питательных свойств растений и их жизнестойкости к заболеваниям и колебаниям погоды. По своему агрегатному состоянию полученные удобрения удобны для механического внесения на поля и для ручного внесения в грядки.

<u>Главная ценность всей технологии</u> по переработке птичьего помёта.

Удалось между функциональными группами гумата и птичьего помёта запустить реакции ионного обмена, комплексообразования, донорно-акцепторного взаимодействия с образованием слоистого полимера. В результате на выходе получается комплексное органоминеральное удобрение пролонгированного действия.

Анализ удобрения из куриного помёта «ЭКОР-К» закваска

№	*Элемент*	*Количество,%*
1	Влажность	12,3
2	Сухое вещество	87,7
3	Минеральная часть	51,2
4	Органическая часть	48,8
5	Гуминовые кислоты	1,1
6	Фульвовые кислоты	3,2
7	Азот общий	2,8
8	Азот подвижный	5,2
9	Фосфор	5,1
10	Калий	1,9
11	Кальций	4,8
12	Магний	2,2
13	Железо	0,51
14	Сера	0,6

15	Марганец	0,8
16	Цинк	1,2
17	Молибден	2,1
18	Витамин С	6,8мг
19	Витамин B_6	15,2мг
20	Витамин А	15,0мг
21	Витамин B_1	7,4мг
22	Витамин РР	6,2мг
23	Витамин Е	42,3мг
24	Глицин	5,2мг
25	Лейцин	9,1мг
26	Глутамин	2,8мг
27	Лизин	8,1мг
28	Триптофан	3,1мг
29	Аргинин	5,8мг
30	Валин	6,2мг
31	Пролин	7,1мг

Рентгеноструктурный анализ сухого помёта, обработанного гуматом «ЭКОР-К» жидким

В результате проведения рентгенодифракционного анализа, исследуемого вещества (куриный помёт обработанный жидким гуматом «ЭКОР-К») были получены следующие данные:

Образец	*C*	*H*	*N*	*O (по разности)*	*H/C*	*O/C*
1	94,8	51,2	66,3	21,8	0,74	0,54

Приблизительная формула исследуемого вещества: ******, составленная на основании рентгенодифракционных расчётов, приведённых в виде графика.

№	*Функциональная группа*	*Количество*
1	Карбоксильные **–COOH**	181
2	Гидроксильные **–OH**	12
3	Нитрогруппы **$–NO_2$**	17
4	Амидные **$–CONH_2$**	31

Количество функциональных групп было определено как среднее и в большей степени были отнесены к *кислородсодержащим* (карбоксильные и гидроксильные), а также *азотсодержащие* (амидные и нитрогруппы). Данный образец обладает высокой каталитической и химической активностью по отношению к веществам любой химической природы.

Исследование гуматов «ЭКОР-К» и «Водной вытяжки из куриного помёта, обработанного гуматами «ЭКОР-К» на синтез и стабилизацию матричной рибонуклеиновой кислоты (далее - мРНК).

мРНК является главным промежуточным генетическим фактором при синтезе белковой молекулы в любой живой системе. мРНК является переносчиком скопированной информации из ядра клетки в центры синтеза белка, где эта информация считывается и за счёт этого идет синтез той или иной аминокислоты, а затем и сбор самой молекулы нужного клетке белка. Эксперимент проводился при помощи полимеразной цепной реакции (далее ПЦР).

Оборудование и реактивы: Миницентрифуга-ВортексMicroSpin FV-2400; Твердотельный термостат «Термит»; Детектирующий термоциклер DT-PRIME; ПЛР ванная FYREXTRAN; ПЛР анализатор BioRAD; Набор стандартных РНК олигонуклеотидов; Модифицированные олигонуклеотиды: флуоресцентно-меченные, 3/- блокированные; Полимер для секвенирования ПМР-6; Внутренний стандарт S-450; Спейсеры: С3, С9, С18.

Ход эксперимента: образцами для анализа были пророщенные зёрна пшеницы ярой сорт «Печерянка» и озимая сорт «Фаворитка», сахарной свеклы сорт «Первомайский» и «Белоцерковский» и кукурузы сорт «Заря».

1. С пророщенных зерен растений с помощью ПЦР было выделено в чистом виде мРНК, которая отвечает за синтез белка в представленных растениях;
2. Пророщенные зёрна подвергались обработке различными концентрациями гумата «ЭКОР-К» (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100% растворы), инкубация проходила в сухо-воздушном термостате при температуре 25^0С;
3. Взаимодействие гумата с растением детектировалось при помощи ПЦР через 40 минут; 1ч.; 5ч.; 8ч.; 12ч.; 24ч.; 48ч.;
4. Контролем были растения, пророщенные на дистиллированной воде без добавления гумата;
5. С ростков экспериментальных растений выделялась мРНК с помощью полимера для секвенирования ПМР-6, и модифицированных 3/- блокированных праймеров;
6. В результате эксперимента была обнаружена зависимость синтеза и стабильности мРНК от различных концентраций гумата «ЭКОР-К» и «водных вытяжек с куриного помёта. обработанного гуматами «ЭКОР-К» от времени их взаимодействия с растениями.

Проверка на токсичность жидкой фракции гумата «ЭКОР-К»

Исследования проводились на клеточной культуре (L52 – стволовые клетки надпочечников белой лабораторной мыши). Клеточная взвесь в концентрации 100тыс. клеток/мл среды рассаживалась по 2мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами на дне флакона. В качестве культуральной среды используется среда 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС). После формирования клеточного монослоя на стекле (24 часа) культуральная среда сливалась и заменялась на среду 199 с добавлением 1%-го водного раствора:

- Вариант 1: 1%-й водный раствор гумата «ЭКОР-К» жидкая фракция;
- Вариант 2: 1%-й водный раствор гумата «ЭКОР-К» закваска;
- Вариант 3: 1%-й водный раствор куриного помёта, обработанного гуматом «ЭКОР-К» жидкая фракция;
- Вариант 4: 1%-й водный раствор куриного помёта, обработанного гуматом «ЭКОР-К» закваска.

Контролем служила клеточная культура без добавления исследуемых веществ. Флаконы инкубировались в термостате при 37ºС в течение 96 часов, каждые 24 часа готовились морфологические препараты по общепринятой методике (по 4 препарата на точку) и проводился подсчёт числа митотических клеток в монослое (митотический индекс МИ) и общее количество выросших клеток методом

случайных полей по С.Б. Стефанову. Также проводились гистохимические исследования на общий белок и дыхательный фермент СДГ.

Результаты исследований:

Таблица 1: **Митотический индекс исследуемых вариантов**

Вариант / *Время экспозиции, часов*	*Митотический индекс*			
	24 часа	*48 часов*	*72 часа*	*96 часов*
1: 1% водный раствор гумата «ЭКОР-К» жидкая фракция	5,2	6,2	7,8	8,1
2: 1% водный раствор гумата «ЭКОР-К» закваска	6,4	9,1	9,8	9,9
3: 1% водный раствор куриного помёта обработанного гуматом «ЭКОР-К» жидкая фракция	2,8	4,2	5,0	5,2
4: 1% водный раствор куриного помёта обработанного гуматом «ЭКОР-К» закваска	3,1	5,6	6,6	6,8
5: Контроль	2,8	3,3	4,1	4,5

Примечание: Митотический индекс исчислялся по формуле:

$$\mathrm{MitoticI} = \frac{(\mathrm{P+M+A+T})}{\mathrm{N}} * 100\%$$

, где

(P+M+A+T) – сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы, а N – общее число проанализированных клеток.

Вывод: Митотический индекс показывает интенсивность деления по наличию клеток в фазе роста (делящихся клеток). Чем выше значение, тем интенсивнее происходит процесс деления клеток и наоборот. Индекс может говорить о нормальном протекании митоза, об угнетении процесса деления клеток или, напротив, усилении митотической активности тканей.

Как видно с таблицы 1, количество делящихся клеток контрольной группы возрастала по экспоненте до 72 часов эксперимента, а далее количество делящихся клеток выходит на фазу «плато» и далее происходит процесс отмирания в связи с уменьшением количества питательных веществ в среде. Этот показатель подтверждает целостность и чистоту культуры, взятую для эксперимента.

В опытном *варианте 1* (1% водный раствор гумата «ЭКОР-К» жидкая фракция) на протяжении 48 происходит активное увеличение делящихся клеток в системе, а по прохождению 72 часов количество делящихся клеток выходит на фазу «плато» и практически не увеличивается. Схожий процесс наблюдается и в других опытных вариантах. Данное изменение митотического индекса объясняется наличием в добавляемом исследуемом веществе стимуляторов деления клеток, которыми в первую очередь являются гуминовые кислоты, а также витамины, микроэлементы и аминокислоты.

Таблица 2: **Количество общего белка в исследуемых вариантах**

Вариант / *Время экспозиции, часов*	*Количество общего белка, г/л*			
	24 часа	*48 часов*	*72 часа*	*96 часов*
1: 1% водный раствор гумата «ЭКОР-К» жидкая фракция	43	45	48	51
2: 1% водный раствор гумата «ЭКОР-К» закваска	45	48	50	53

3: 1% водный раствор куриного помёта обработанного гуматом «ЭКОР-К» жидкая фракция	41	45	45	47
4: 1% водный раствор куриного помёта обработанного гуматом «ЭКОР-К» закваска	46	48	49	49
5: Контроль	38	39	51	51

Вывод: результаты по количеству общего белка приведенные в таблице 2 подтверждают данные по митотическому индексу. Изменение количества общего белка объясняется ростом клеточной культуры за счёт влияния на неё ростостимулирующих веществ, внесённых с исследуемым веществом.

Таблица 3: **Количество дыхательного фермента СДГ**

Вариант / *Время экспозиции*	*Количество дыхательного фермента, МЕ/л*			
	24 часа	*48 часов*	*72 часа*	*96 часов*
1: 1% водный раствор гумата «ЭКОР-К» жидкая фракция	0,4	0,8	1,2	1,1
2: 1% водный раствор гумата «ЭКОР-К» закваска	0,1	0,4	0,6	0,4
3: 1% водный раствор куриного помёта обработанного гуматом «ЭКОР-К» жидкая фракция	0,5	0,9	1,3	1,1
4: 1% водный раствор куриного помёта обработанного гуматом «ЭКОР-К» закваска	0,3	0,4	0,6	0,5
5: Контроль	1,1	1,6	1,8	1,9

Вывод: количество дыхательного фермента СДГ (сукцинатдегидрогеназы) – это специфическая метка митохондрий, так как она прочно связана с внутренней мембраной этих органелл, показательно характеризует энергетический обмен, процессы аэробного дыхания. Как видно с таблицы 3, активность данного фермента увеличивается на протяжении 72 часов с момента закладки опыта и выходит в фазу «плато» на 96 час эксперимента.

Общий вывод: исходя из полученных данных можно судить о том, что гумат «ЭКОР-К» как закваска, так и его жидкая фракция относятся к 4 классу биологической опасности. То же самое можно сказать и о влиянии на клеточные культуры ферментированного при помощи гуматов куриного помёта. Входящие в состав исследуемых веществ биологически активные компоненты не только не оказывают угнетающего действия на стволовые клетки, а, наоборот, стимулирует их деление и биологическую активность.

с уважением, **Г.Н. Косьяненко**