

Н.Ш. Акимбеков<sup>1</sup> , Қ.Т. Тастамбек<sup>1\*</sup> ,  
Д.К. Шерелхан<sup>1</sup> , Н.П. Алтынбай<sup>1</sup> , Ш.О. Бастаубаева<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства,

Казахстан, Алматинская область, п. Алмалыбак

\*e-mail: [tastambeku@gmail.com](mailto:tastambeku@gmail.com)

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЫРЬЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗРАБОТКИ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО УДОБРЕНИЯ

Гуминовые вещества, образующийся в результате биотрансформации органических остатков, являются естественным продуктом кооперативной деятельности участников экосистемы. К настоящему времени накоплен огромный материал по изучению природы ГВ почв, однако альтернативные источники ГВ (торф, бурый уголь, окисленный уголь, компосты, т.п.) изучены недостаточно, поэтому необходимы комплексные исследования для использования этих веществ в сельском хозяйстве и в других областях народного хозяйства.

В Казахстане все больше ощущается дефицит органических удобрений/мелиорантов и существует ограничение на применение химических удобрений и средств защиты растений. В связи с этим обоснованным является поиск путей использования органических удобрений природного происхождения для повышения плодородия почвы. Именно таким сырьем получения ГВ могут служить низкокачественные бурые угли местных месторождений.

Углеродсодержащие породы содержат множество важных химических элементов, имеющих решающее значение для развития и питания сельскохозяйственных культур, что делает их ценным источником питательных веществ в почве. Внесение углеродистых пород в дерново-подзолистые почвы приводит к значительному увеличению численности микроорганизмов, нередко достигающему нескольких сотен раз. Использование углеродистых добавок горных пород в качестве удобрений почвы значительно усиливает активность микробных сообществ, участвующих в расщеплении органических компонентов. Следовательно, этот процесс приводит к увеличению доступности питательных веществ в почве.

В углистых породах содержатся разные химические элементы, необходимые для роста и развития сельскохозяйственных культур, поэтому они являются одним из резервов питательных элементов в почве.

При внесении углистых пород в дерново-подзолистые почвы численность микроорганизмов возрастает в сотни раз. При удобрении почвы углистыми породами значительно активизируют свою деятельность те микробные сообщества, которые участвуют в минерализации органических компонентов. В результате, почва обогащается доступными питательными веществами.

Цель данного этапа исследования – дать характеристику сырья (гуминовые вещества, выделенные из низкокачественных бурых углей Казахстанских месторождений и культуры бактерий, обладающие высокой метаболической активностью).

В результате дается полная характеристика сырья и были выделены и идентифицированы активные бактерий для использования разработки биотехнологии получения комплексного удобрения.

**Ключевые слова:** бурый уголь, гуминовые вещества, техническая характеристика, элементный состав, микробиом, метагеномика, бактерия.

N.Sh. Akimbekov<sup>1</sup>, K.T. Tastambek<sup>1\*</sup>,  
D.K. Sherelkhan<sup>1</sup>, N.P. Altynbay<sup>1</sup>, Sh.O. Bastaubayeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Kazakhstan, Almaty region, Almalybak

\*e-mail: tastambeku@gmail.com

### **General characteristics of raw materials for the use of the development of biotechnology for obtaining complex fertilizer**

Humic substances, formed as a result of the biotransformation of organic residues, are a natural product of the cooperative activities of ecosystem participants. To date, a huge amount of material has been accumulated in the study of the nature of soil HS, however, alternative sources of HS (peat, brown coal, oxidized coal, composts, etc.) have not been studied enough, therefore, comprehensive studies are needed for the use of these substances in agriculture and other areas. National economy.

In Kazakhstan, there is an increasing shortage of organic fertilizers/ameliorants and there is a restriction on the use of chemical fertilizers and plant protection products. In this regard, it is reasonable to search for ways to use organic fertilizers of natural origin to increase soil fertility. Low-quality brown coal from local deposits can serve as a raw material for the production of HW.

Coal-containing rocks possess a variety of essential chemical elements crucial for the advancement and nourishment of crops, making them a valuable source of nutrients within the soil. Introducing carbonaceous rocks into soddy-podzolic soils leads to a remarkable surge in microorganism population, often reaching several hundredfold. Utilizing carbonaceous rock amendments as soil fertilizers greatly enhances the activity of microbial communities engaged in the breakdown of organic constituents. Consequently, this process results in the enhancement of nutrient availability within the soil.

The purpose of this stage of the study is to characterize the raw materials (humic substances isolated from low-quality brown coals of Kazakhstan deposits and bacterial cultures with high metabolic activity).

As a result, a complete characterization of the raw material is given and active bacteria have been isolated and identified to use in the development of biotechnology for the production of complex fertilizer.

**Key words:** brown coal, humic substances, technical characteristics, elemental composition, microbiome, metagenomics, bacterium.

Н.Ш. Акимбеков<sup>1</sup>, Қ.Т. Тастамбек<sup>1\*</sup>,  
Д.К. Шерелхан<sup>1</sup>, Н.П. Алтынбай<sup>1</sup>, Ш.О. Бастаубаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты,

Қазақстан, Алматы облысы, Алмалыбақ ауылы

\*e-mail: tastambeku@gmail.com

### **Кешенді тыңайтқыш алу биотехнологиясын құрастыру үшін қолданылатын шикізаттың жалпы сипаттамасы**

Органикалық қалдықтардың биотрансформациясы нәтижесінде түзілетін гуминдік заттар – экожүйе қатысушыларының бірлескен қызметінің табиғи өнімі. Бүгінгі күнге дейін топырақтың ГЗ зерттеу бойынша материалдың үлкен көлемі жинақталған, алайда ГЗ-ның балама көздері (шымтезек, қоңыр көмір, тотыққан көмір, компост және т.б.) жеткілікті түрде зерттелмеген, сондықтан кешенді бұл заттарды ауыл шаруашылығында және басқа халық шаруашылығы салаларда қолдану үшін зерттеулер қажет.

Қазақстанда органикалық тыңайтқыштардың/мелиоранттардың тапшылығы артып келеді және химиялық тыңайтқыштар мен өсімдіктерді қорғау құралдарын пайдалануға шектеу қойылды. Осыған байланысты топырақ құнарлығын арттыру үшін табиғи органикалық тыңайтқыштарды қолданудың жолдарын іздестіру орынды. Жергілікті кен орындарының сапасыз қоңыр көмірі ГЗ өндіру үшін осындай шикізат бола алады.

Құрамында көмір бар таужыныстарда ауылшаруашылық дақылдарының дамуы мен қоректенуі үшін өте маңызды көптеген маңызды химиялық элементтер бар, оларды топырақтағы қоректік заттардың құнды көзі етеді. Көміртекті жыныстарды сазды-подзолиялық топыраққа енгізу микроорганизмдер санының айтарлықтай өсуіне әкеледі, көбінесе бірнеше жүз есеге жетеді. Топырақ тыңайтқыштары ретінде көміртекті тау жыныстарының қоспаларын пайдалану органикалық компоненттердің ыдырауына қатысатын микробтық қауымдастықтың белсенділігін айтарлықтай арттырады. Демек, бұл процесс топырақтағы қоректік заттардың қолжетімділігінің артуына әкеледі.

Зерттеудің бұл кезеңінің мақсаты – шикізатқа (Қазақстан кен орындарының төмен сапалы қоңыр көмірлерінен бөлінген гуминді заттар және метаболизмдік белсенділігі жоғары бактериялық дақылдар) сипаттама беру.

Нәтижесінде, шикізатқа толық сипаттама беріліп, кешенді тыңайтқыштар алу биотехнологиясын құрастыру үшін белсенді бактериялар бөлініп, идентификацияланды.

**Түйін сөздер:** қоңыр көмір, гуминді заттар, техникалық сипаттамасы, элементтік құрамы, микробиома, метагеномика, бактерия.

### Сокращения и обозначения

А – Зольность пробы угля (%), АСЕ – Оценка реального количества таксонов, EDX – Энергодисперсионный рентгеновской спектроскопия, ISO – Международная организация по стандартизации, OTU – Операционная таксономическая единица, Q – Удельная теплота сгорания пробы угля, кДж/кг, V – Выход летучих веществ в угле, %, W – Массовая доля влаги в аналитической пробе угля, %, ГВ – Гуминовые вещества, ОУ – Низкокачественный бурый уголь Ок-Карагайского угольного месторождения, ПЦР – Полимеразная цепная реакция, СНП – Секвенирование нового поколения, СЭМ – Сканирующий электронный микроскоп, ЭУ – Низкокачественный бурый уголь Экибастузского угольного месторождения.

### Введение

Одним из важнейших вопросов агробиологических исследований является поиск новых путей получения экономически выгодных и экологически безопасных для использования в антропогенных ландшафтах видов органических удобрений. При выборе сырья для производства отечественных удобрений исходят из того, что в Казахстане имеются довольно значительные запасы полезных ископаемых, содержащих ГВ, а также возможность для реализации производства экологически чистого и безотходного производства удобрений на их основе.

При накоплении в больших объёмах низкокачественные бурые угли создают высокую экологическую нагрузку, что чревато нарушением санитарно-токсикологической обстановки и самовозгораниями [1-3]. Необходима технология, позволяющая быстро и качественно нивелировать негативное влияние твердых отходов. Такого рода экологически безопасным и ресурсосберегающим способом является микробная конверсия, предполагающая утилизацию широкого спектра отходов, включая низкокачественные бурые угли.

Уголь является продуктом природного образования, представленным преимущественно минералом и органическим веществом. Установлено, что уголь, как осадочная порода состоит из растительных остатков и из продуктов их превращения в процессе гумификации [4]. Преобразование растительных остатков является важнейшим биохимическим процессом, имеющим огромное экологическое значение для природы и человека.

Гуминовые вещества – это композиция гуминовых кислот, фульвокислот и гумина, являются специфическими соединениями высокой молекулярной массы, относятся к органической части почв, осадочных пород, торфов, бурых и окисленных в пластах углей. Для экстракции ГВ, обладающих физиологически фитостимулирующим и фортификационным эффектом пригодны и окисленные бурые угли, характеризующиеся высоким содержанием лигнина [5-6]. Основной химической составляющей низкокачественных углей является гуминовая кислота [7].

Благоприятной экологической средой для развития и размножения микроорганизмов являются угольные месторождения (бассейны бурых углей и терриконы угольных шахт). Благодаря активной жизнедеятельности микроорганизмов, значение гуминовых кислот в органической массе угля существенно возрастает и сводится к изменению физико-химических свойств ГВ. Положительное влияние органического вещества низкокачественных углей на почвенную экосистему обусловлено, прежде всего, интенсивным метаболизированием их микроорганизмами [8-9].

В настоящее время существует несколько методических подходов к выделению ГВ из углей и их использование как средства повышения плодородия и здоровья почвы. Поэтому целесообразно рассматривать ГВ угольной природы как компонент органоминеральных удобрений и как стимулятор роста растений. Гуминовые продукты, полученные из разных углей химическими методами, применяют во многих странах мира, как средство повышения продук-

тивности сельскохозяйственных культур. По разным литературным источникам ГВ на основе угля повышают всхожесть семян, ускоряют рост и развитие растений, улучшают пищевые/кормовые качества, защищают растения в стрессовых условиях, и как правило, не содержат токсичных веществ [10-11].

Несмотря на ключевую роль микроорганизмов в формировании ГВ из низкокачественных углей, и в создании препаратов на их основе для использования в аграрном секторе, пока еще не накоплен достаточный опыт экспериментальных работ о влиянии на рост и развитие сельскохозяйственных культур, на величину и качество урожая в разных условиях при их использовании. В связи с этим, настоящие исследования являются актуальными и имеют определенную теоретическую и практическую значимость.

## Материалы и методы

**Объекты исследования.** В качестве исходного материала для исследования использовали окисленные бурые угли Экибастузского угольного месторождения Павлодарской области, Казахстан (ЭУ) и Ой-Карагайского угольного месторождения, Алматинской области, Казахстан (ОУ).

**Материалы.** В работе была использована модифицированная минеральная среда с углем (5%) для культивирования культур бактерий. Состав среды (мг л<sup>-1</sup>): NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 2,50, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,75, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,75, NaCl – 0,25 и (мкг л<sup>-1</sup>): ZnSO<sub>4</sub> – 88,0, MgSO<sub>4</sub> – 0,75, FeCl<sub>3</sub> – 88,0, MnCl<sub>2</sub> – 14,0, CuSO<sub>4</sub> – 16,0, MoO<sub>3</sub> – 7,0, Co (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 5,0. Среда Лурия-Бертани (г л<sup>-1</sup>): триптон – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 5,0. Элективные среды MYPGP agar для роста *Bacillus* sp. и *Pseudomonas*- S1 selective medium для *Pseudomonas* sp.

**Методы исследований.** Анализ проб проводился в соответствии с техническими протоколами, изложенными в различных стандартах ГОСТ [12][13][14][15]. Оценивали следующие параметры: зольность (А), влажность (W), летучих веществ (V) и теплоту сгорания (Q).

Элементный состав оценивали с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL-6380LV (Jeol, Япония), оснащенного детектором EDAX 2000, с использованием автоматического анализатора Vario EL Cube (Elementar, Германия).

Исследование микроструктуры проводили методом электронной микроскопии с использованием Hitachi S-4800 FE-SEM (Hitachi, Япония).

Инфракрасную спектроскопию с Фурье-преобразованием (FTIR) проводили на спектрометре Nicolet 6700 KBr (Thermo Fisher Scientific, США), записывая спектры в диапазоне 400–4000 см<sup>-1</sup>.

Характеристики флуоресценции растворенных образцов гуминовых кислот измеряли при 20°C с использованием флуоресцентного спектрометра FP-8500 (Jasco, Япония) с длиной волны возбуждения (Ex) от 250 до 600 нм и длиной волны излучения (Em) от 260 до 650 нм.

Для выделения гуминовых кислот из бурых углей низкого качества суспендировали 1 г порошкообразного угля в 50 мл 0,1 М NaOH, встряхивали при 20°C в течение 24 часов с последующим центрифугированием, фильтрованием и доводкой осаждения с помощью HCl.

Для биорастворения угля суточные культуры выращивали на питательной среде LB при 31°C с добавлением 5% (мас./об.) стерильного порошкообразного древесного угля. Инкубация длилась 14 дней, при этом в контрольных установках бактериальные культуры отсутствовали. Супернатанты собирали ежедневно, фильтровали и оценивали при А450 интенсивность биорастворения угля.

Для метагеномного анализа использовали технологию секвенирования нового поколения HiSeq (Illumina, США). Этапы включали экстракцию ДНК, идентификацию сайта секвенирования, скрининг праймеров, двойное штрихкодирование, секвенирование, биоинформатический анализ и визуализацию данных – все в соответствии со стандартными протоколами <https://www.illumina.com> [17].

Статистический анализ включал представление данных в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Ассоциации бактериальных культур статистически сравнивали с использованием точного двустороннего критерия Фишера (n = 10).

## Результаты и их обсуждение

Для работы были отобраны низкокачественные бурые угли Экибастузского угольного месторождения (51.730493846472825, 75.40909598924266) Павлодарской области, Казахстан (ЭУ) и Ой-Карагайского угольного месторождения (43.192321031572504, 80.5954200537039), Алматинской области, Казахстан (ОУ) (рис.1).

Экибастузское угольное месторождение является крупнейшим угольным месторождением

Казахстана, расположенное в Павлодарской области. Город Экибастуз находится в западной части месторождения, а центр области г. Павлодар – удален от него на 130 км к северо-востоку. Общие геологические запасы углей оставляет 10 млрд т. Угли Экибастузского бассейна являются каменными гумусовыми.

Угольное месторождение Ой-Карагай расположено восточнее Алматы на расстоянии 300 км в пределах Нарынкольского района Алматинской области Казахстана. Найденный здесь уголь относится к бурым углям марки БЗ, характеризующимся низкой зольностью (около 16 %), высокой теплотой сгорания (около 6,5

тыс. ккал/кг) и минимальным содержанием серы (менее 1 %). Кроме того, этот тип угля легко разлагается на воздухе. По оценкам, запасы угольного месторождения составляют около 80 миллионов тонн, из которых около 41 миллиона тонн пригодны для добычи полезных ископаемых открытым способом. Общие разведанные запасы угля, определенные геологоразведочными работами, составляют 124 млн тонн бурого угля.

В соответствии с положениями Кодекса Республики Казахстан «О недрах и переработке минерального сырья» данные месторождения отнесены к категории республиканского значения.

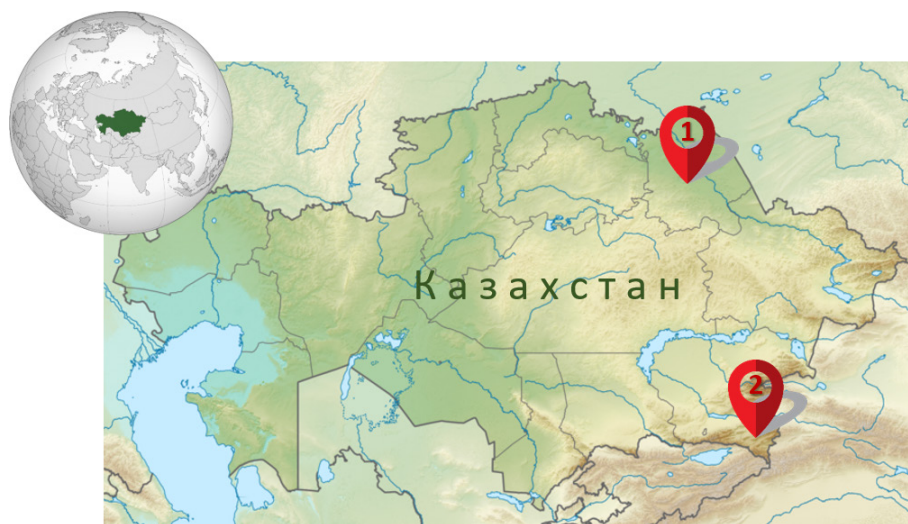


Рисунок 1 – Расположение точек отбора проб: 1 – ЭУ и 2 – ОУ

Процедуры отбора проб проводились в соответствии с ISO 18283:2006 Hard coal and coke – Manual sampling, ISO 13909-4:2016 Preview Hard coal and coke – Mechanical sampling – Part 4: Coal – Preparation of test samples, и правил ГОСТ 10742-71 для отбора проб. различные виды угля, включая бурые угли, каменные угли, антрацит, горючие сланцы и угольные брикеты. В процессе отбора проб были приняты строгие меры, чтобы предотвратить любую потерю материала пробы или влаги. Аналитические образцы тщательно помещались в контейнеры, предварительно взвешенные рядом с крышками. Эти контейнеры были запечатаны соответствующим материалом и прикреплены двумя этикетками. После этого было проведено повторное взвешивание с обеспечением погрешности не более 1 грамма. Каждый контейнер, в котором находились про-

бы угля, имел четкую маркировку, содержащую важную информацию: номер пробы (1), дату отбора проб (2) и обработки пробы (3), название пробы (4), первоначальный вес контейнера (5), предприятие. имя (6), тип продукта (7) и подпись ответственного лица (8), контролирующего процедуру сбора и обработки проб.

Отбор проб проводили согласно ISO 18283:2006 Hard coal and coke – Manual sampling и ISO 13909-4:2016 Preview Hard coal and coke – Mechanical sampling – Part 4: Coal – Preparation of test samples, а также ГОСТ 10742-71 «Угли бурые, каменные, антрацит, горючие сланцы и угольные брикеты. Методы отбора и подготовки проб для лабораторных испытаний». При отборе проб были соблюдены все меры, предотвращающие потери материала пробы и влаги: аналитические пробы помещали в контейнеры, пред-

варительно взвешенные вместе с крышками, материалом для опечатывания и двумя этикетками, и снова взвешивали (процедуру производили с погрешностью не более 1 г). Контейнеры с пробами углей снабжали этикетками, на которых указывали данные: номер пробы (1); дату

отбора (2) и обработки пробы (3); наименование пробы (4); массу тары (5); наименование предприятия (6); вид продукции (7); подпись лица (8), ответственного за отбор и обработку пробы.

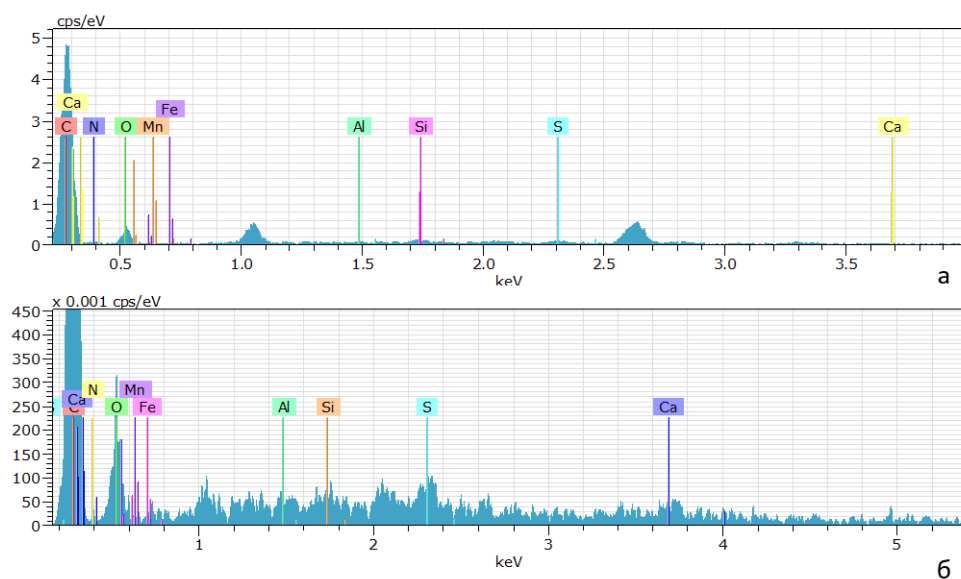
Основные характеристики проб низкокачественных углей приведены в табл. 1.

**Таблица 1** – Качественные характеристики проб углей

I. Макроскопические характеристики			
№	Описание	ЭУ	ОУ
2	Вид	Коричневато-бурый	Темно-бурый
3	Излом	Неровный, угловатый	Волокнистый
4	Блеск	Смолистый	Жирный
5	Текстура	Неоднородная, лигнитовая	Неравномерно-штриховатая
6	Отдельность	Экзогенная	Экзогенная
II. Физические характеристики (%)			
1	Влажность (W)	9,8	11,8
2	Зольность (A)	38,2	12,2
3	Выход летучих веществ (V)	26,3	35,8
4	Теплота сгорания, МДж/кг (Q)	13,5	15,6
III. Химический состав (%)			
1	Углерод (C)	78,5	75,0
2	Водород (H)	5,4	4,81
3	Азот (N)	0,0	1,5
4	Сера (S)	0,6	0,41
5	Кислород (O)	15,5	18,28

В исследовании также использовался метод рентгеноспектрального микроанализа с использованием энергодисперсионного (EDX)

анализатора. Результаты рентгеноспектрального микроанализа образцов представлены на рисунке 2.



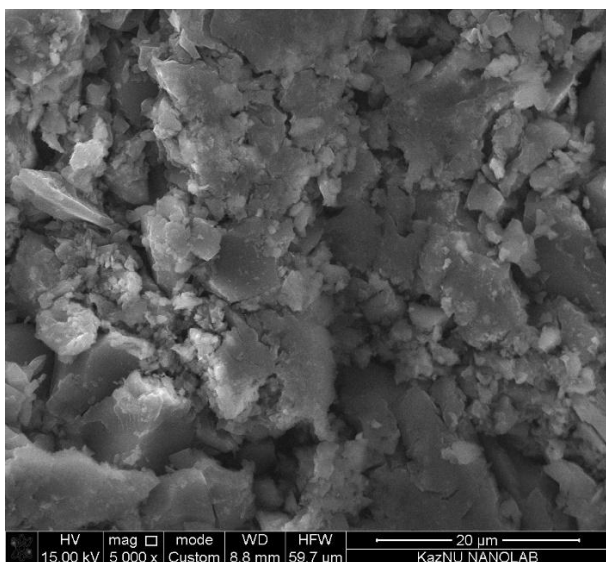
**Рисунок 2** – Рентгеноспектральный микроанализ проб углей: а – ЭУ и б – ОУ

Для исследования поверхности угля и его петрографических составляющих на микроструктурном уровне был использован метод СЭМ (рис.3). Микроструктура углей низших сортов отличается выраженной плотностью и наличием разнообразных участков с неровностями – разломами, трещинами и кавернами. Хорошо известно, что состав и расположение угля связаны с его неоднородностью, обусловленной наличием в нем различных органических и минеральных компонентов [18].

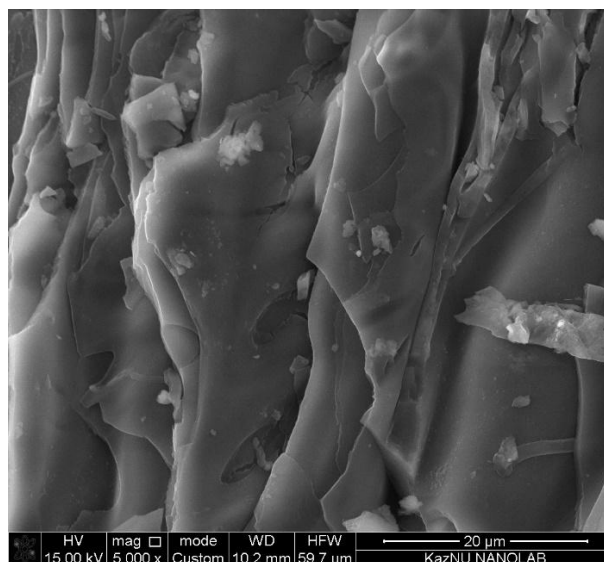
Следовательно, угли низкого качества Экибастузского и Ой-Карагайского месторождений содержат сложные органические вещества и дополнительные минеральные элементы. С помощью физических и химических анализов установлено, что эти угли обладают гуминовы-

ми свойствами, что делает их потенциальным ресурсом для производства гуминовых веществ (ГВ).

Гуминовые кислоты из образцов угля выделяли адаптированным методом щелочной экстракции [16], где использование раствора гидроксида натрия (NaOH) оказалось эффективным для извлечения гуминовых кислот из некондиционных углей с получением около 50% гуминовых кислот. В данном исследовании рассчитанные выходы гуминовых кислот составили 74,3% для Экибастузского угля (ЭУ) и 78,5% для Ой-Карагайского угля (ОУ). Впоследствии фокус сместился в сторону исследования гуминовых кислот, полученных из бурых углей, с использованием ряда спектроскопических методов.



а



б

Рисунок 3 – СЭМ-снимки проб углей: а – ЭУ и б – ОУ

Инфракрасные (ИК) спектры гуминовых кислот показывают заметные пики в диапазоне 2940–2900  $\text{см}^{-1}$ , что указывает на присутствие заметных алифатических групп. Кроме того, спектры в районе 1590–1520  $\text{см}^{-1}$  возникают из-за групп  $\text{COO}^{-1}$ , связей NH и связей  $\text{C}=\text{N}$  (рис. 4).

Гуминовые кислоты также были подвергнуты элементному анализу, выявившему содержание углерода (С) и азота (N). Для ЭУ образовав-

шиеся количества С и N составили 54,72 и 2,55, а для ОУ – 55,71 и 1,51 соответственно. Атомное соотношение О/С, используемое в качестве индикатора кислородсодержащих групп, показало типичное значение примерно 0,4 для обеих кислот. Более низкие значения О/С означают повышенную конденсацию ароматических соединений внутри гуминовых кислот, что отражает их структурную конфигурацию [19].

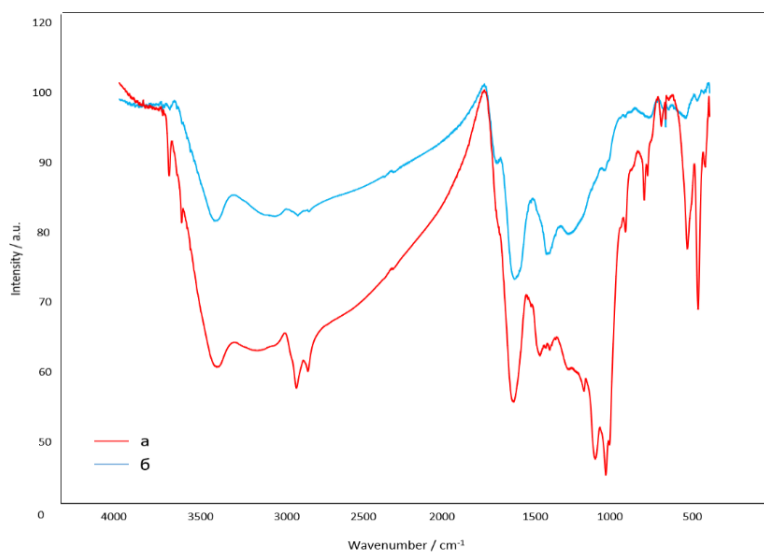


Рисунок 4 – ИК-спектр гуминовых кислот углей: а – ЭУ и б – ОУ

Атомное соотношение N/C дает представление о содержании азота в органических соединениях, причем более высокие значения характерны для гуминовых кислот из различных источников. Напротив, бурые угли обычно име-

ют значения ниже 0,05 [20]. Кроме того, соотношение N/O способствует пониманию состава азота и молекулярной массы, указывая на пониженное присутствие азота и более низкую молекулярную массу [2].

Таблица 2 – Элементный состав гуминовых кислот низкокачественных бурых углей

Гуминовые кислоты	Элемент, %						Атомное отношение			
	C	S	N	H	Ash	O <sup>diff.</sup>	H/C	O/C	N/C	N/O
ЭУ	54.72	0.13	1.52	2.55	4.31	36.77	0.56	0.50	0.02	0.05
ОУ	55.71	0.24	1.16	1.51	3.02	38.36	0.32	0.52	0.02	0.03

Элементный анализ показывает, что химический состав гуминовых кислот ЭК и ОУ отличается умеренной молекулярной массой и наличием уплотненных ароматических углеводородов.

В работе также проводились анализы по изучению природы и свойств гуминовых кислот с помощью усовершенствованной флуоресценции ЕЕМ. Такие анализы считаются точными и чувствительными, т.к. сопоставление спектров возбуждения и испускания дает более достоверную информацию [21]. Цель данного этапа состояла в том, чтобы исследовать свойства матрицы возбуждения-испускания (ЕЕМ) гуминовых кислот из проб бурых углей. Обычный контурный график ЭЭМ изображается посредством пиков флуоресценции максимальной интенсивности,

совпадающих с конкретными флуорофорами или функциональными группами (изображенными на рисунке 5). Прочные флуорофоры заметны при возбуждении/излучении длиной волны 270/440 нм в гуминовой кислоте, полученной из ЭУ. Согласно [22] существует восемь общих типов флуоресценции, где гуминовая, белковая и пигментная флуоресценции являются основными значениями. В настоящей работе максимумы пиков расположены в пределах области, названной пиком А, что указывает на ее гумусообразную природу. Для гуминовой кислоты пик ОУ расположен в широком спектре возбуждения/эмиссии в диапазоне от 275/440 нм до 275/450 нм, что объясняется разнообразным составом угля.



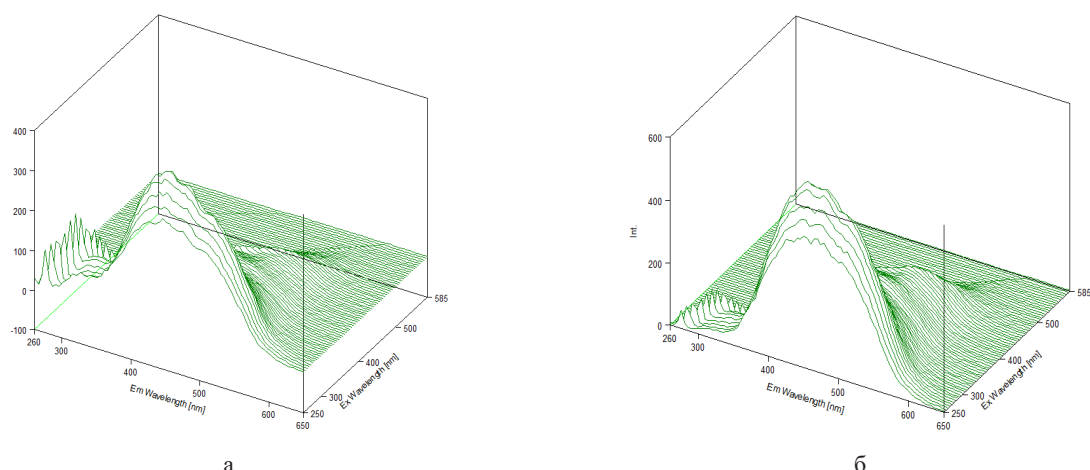


Рисунок 5 – Матрица возбуждения/испускания флуоресценции гуминовых кислот углей: а – ЭУ и б – ОУ

Таким образом, общее сходство гуминовых кислот ЭУ и ОУ лежит в основе идентификации всех пиков как гуминовых по природе. Тем не менее, заметны небольшие различия в положениях пиков, указывающие на тонкие различия в составе гуминовых кислот между образцами.

Выделение микробных культур проводили из проб угля Экибастузского и Ой-Карагайского угольных районов разработки месторождений. Молекулярные методы, позволяющие исследовать микробиологические характеристики в условиях *in-situ*, обещают идентифицировать большинство бактерий. Метагеномный анализ

оказывается ценным для комплексной оценки видового разнообразия в образце без необходимости культивирования. Более того, это облегчает понимание физиологического и функционального профиля микробной популяции. Примечательно, что метагеномная база данных отдает приоритет анализу *16S pPHK*, поскольку современная филогенетическая классификация бактерий основана на структуре этой РНК. На этом этапе исследования был проведен метагеномный анализ образцов ЭУ и ОУ. Первичные данные о видовом составе и показателях микробного разнообразия представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Основные показатели микробного разнообразия проб ЭУ и ОУ

Пробы	Наблюдаемые виды	Индекс Simpson	Индекс Shannon	ACE	Разнообразие филогенетического дерева	Chao1	Goods coverage
ЭУ	764	0.928	5.693	799	63	802	0.999
ОУ	551	0.093	0.637	904	46	871	0.997

Преобладающие составляющие микробных сообществ в обоих образцах включают *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* и *Tenericutes* (рис. 6). Примечательно, что протейобактерии, обычно доминирующие в почвенной микробиоте, составляют наиболее значительную часть этих микробных сообществ. Кроме того, значительную часть выборки ЭУ состав-

ляют представители *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Однако в пробе ОУ превосходят бактерии *Proteobacteria* на уровне типа и *Phyllobacteriaceae* (~97%) на уровне семейства (~96%).

Микробная популяция ЭУ в основном состоит из представителей родов *Pseudarthrobacter* на 21%, *Pseudomonas* на 16% и *Acinetobacter* на 7% (рис. 7). Примечательным наблюдением является повышенное присутствие груп-

пы *Candidatus\_Bacilloplasma* в пределах ОУ. В образцах эта группа составляет значительную часть, составляя до 62% от общего со-

става микробного сообщества, за ней следуют *Bacteroides* – 10%, *Shewanella* – 10%, *Vibrio* – 5% и другие (рис. 8).

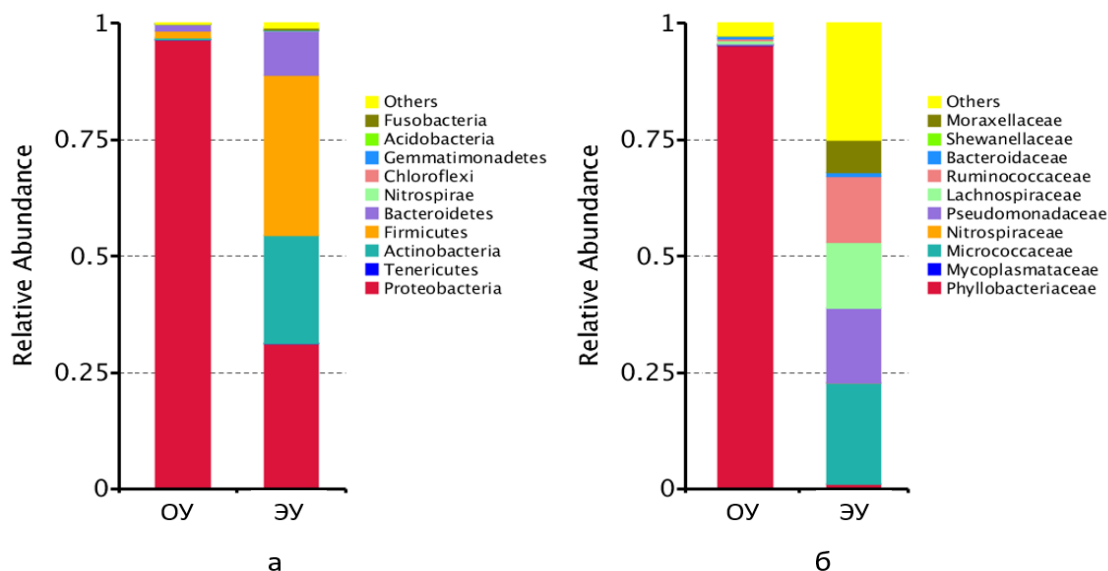


Рисунок 6 – Таксономическая структура бактерий проб ОУ и ЭУ на уровне типа (а) и на уровне семейства (б)

Для идентификации разнообразных физиологических групп бактерий были созданы специфические условия *in vitro* с использованием селективных сред, которые способствуют оптимальному росту и развитию конкретных типов бактерий. В результате исследования из проб угля были выделены изоляты, впоследствии идентифицированные на уровне рода. Эти иден-

тификации были дополнительно подтверждены посредством анализа 16S рРНК, как показано в Таблице 4.

Проведенное исследование позволяет связать особенности структуры бактериальных сообществ, изученные при помощи 16S rRNA и *in vitro*, с особенностями углей как экосистемы.

Таблица 4 – Морфо-культуральные и физиолого-таксономические характеристики культур бактерий

Родовая принадлежность	Элективные среды	Микробиологические характеристики	Пробы
<i>Bacillus</i> sp.	MYPGP agar	Грамположительные палочковид-ные аэробы, образуют внутри-клеточные споры. Каталазная + и оксидазная активность +.	ЭУ: Рис. 7: класс <i>Gamma</i> proteobacteria
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pseudomonas- S1 selective medium	Грамотрицательные, палочковид-ные аэробы, не образуют спор. Каталаза +, оксидаза +.	ОУ: Рис. 8: класс <i>Bacilli</i>

Изучение изолятов с целевой биотехнологической активностью в отношении солюбилизации углей проводили с применением метода погруженной/жидкой культуры. При концентрации низкокачественных углей (5%), степень солюбилизации ОУ значительно возрастала с увеличением продолжительности

инкубации до 10 дней у обеих культур, затем показатель роста оставался в стационарной фазе (рис. 9).

Более высокая метаболическая активность при ЭУ была показана для *Bacillus* sp., ее спектральная поглощаемость составляла  $3,60 \pm 0,1$  (рис. 10).

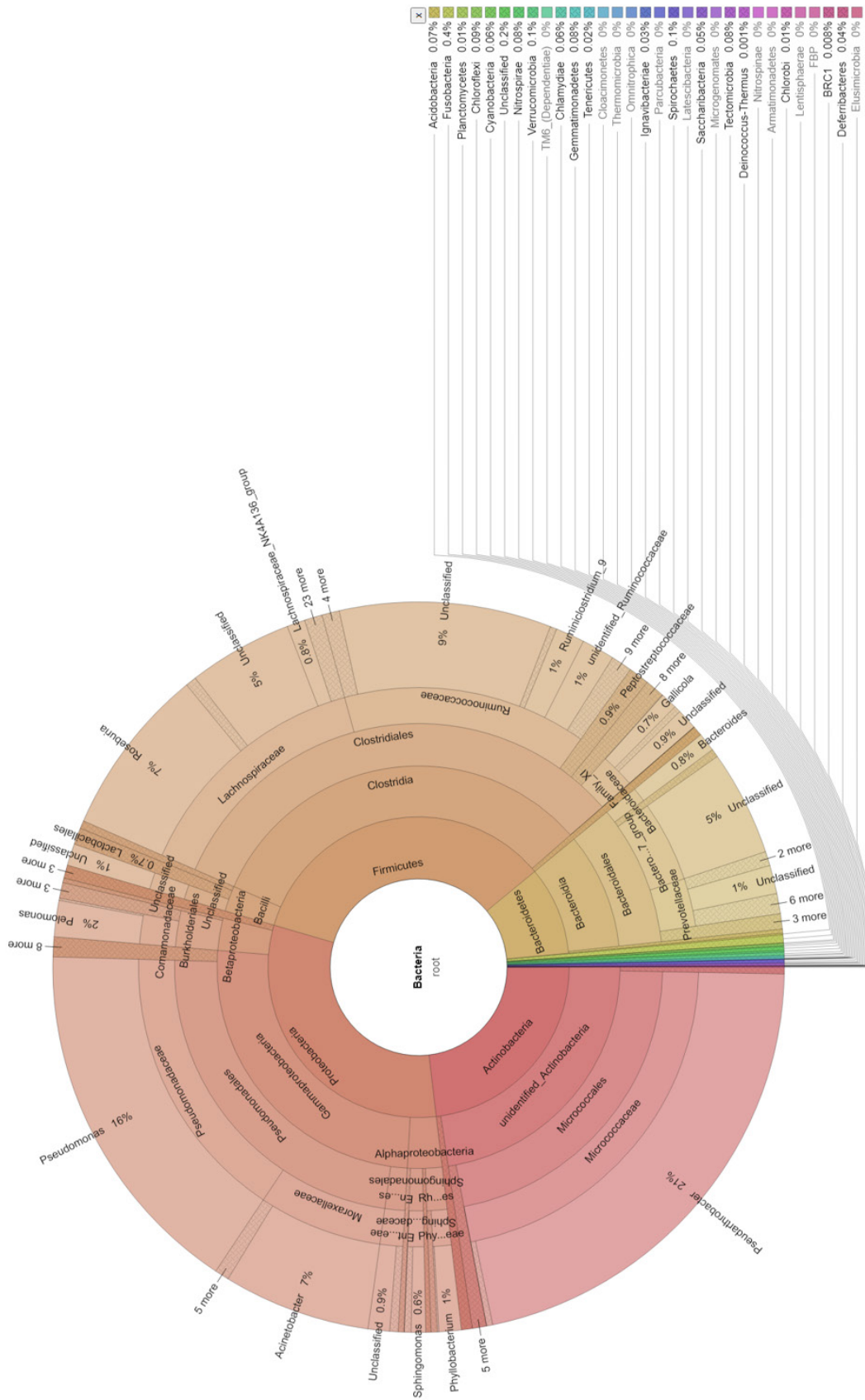


Рисунок 7 – Таксономическая классификация микробных сообществ проб ЭУ, визуализированная с помощью Клопа

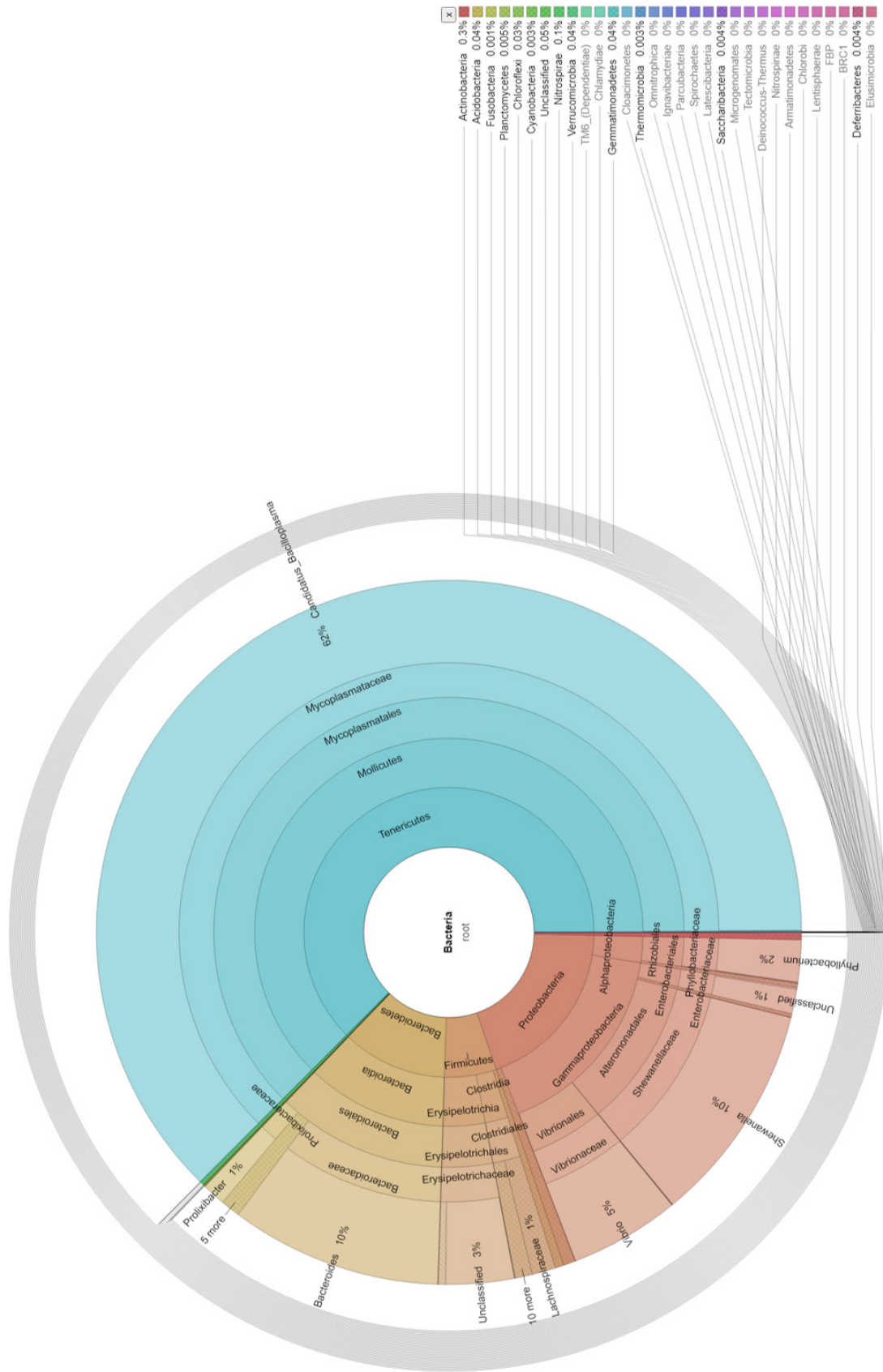


Рисунок 8 – Таксономическая классификация микробных сообществ проб ОУ, визуализированная с помощью Клопа

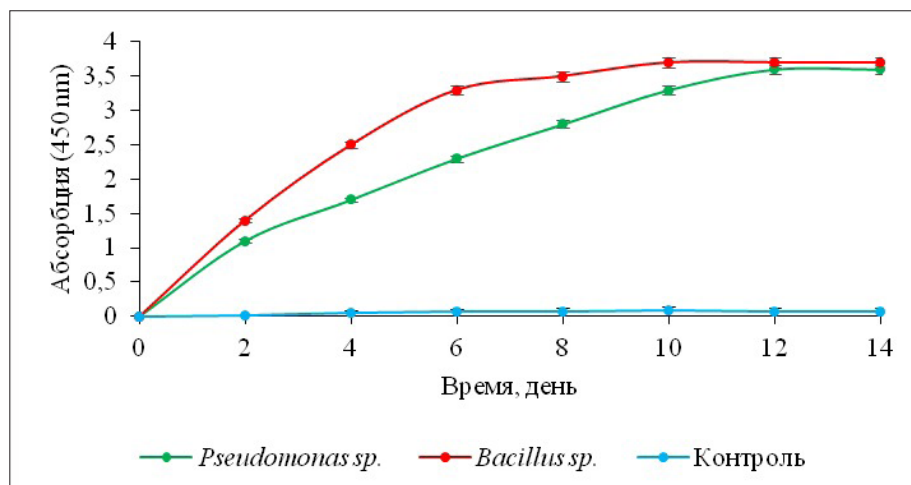


Рисунок 9 – Уровень биосолюбилизации ОУ культурами бактерий

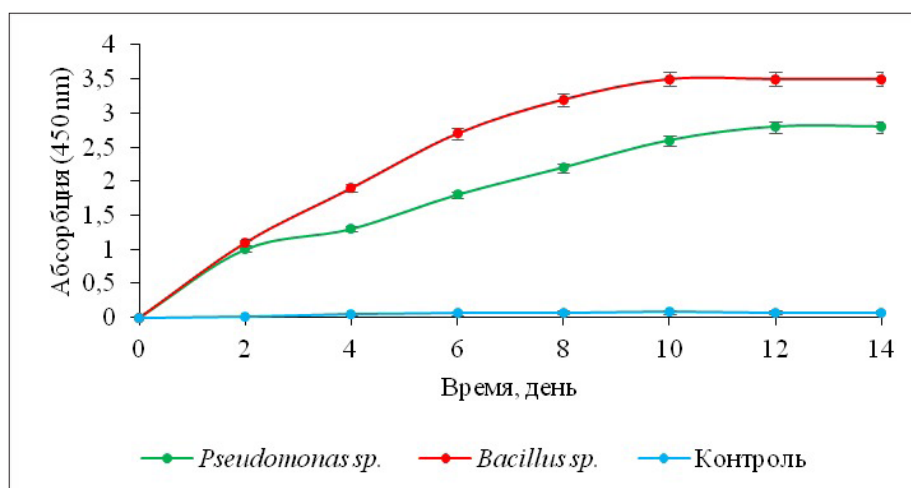


Рисунок 10 – Уровень биосолюбилизации ОУ культурами бактерий

Таблица 5 – Скорость потеря веса в процессе биосолюбилизации бурых углей

Дни	Потеря веса, %					
	<i>Bacillus sp.</i>		<i>Pseudomonas sp.</i>		Контроль	
	ОУ	ЭУ	ОУ	ЭУ	ОУ	ЭУ
3	14.6	14.3	14.7	13.1	0.02	0.01
5	15.8	15.5	15.2	13.8	0.07	0.05
10	17.9	18.0	16.5	13.9	0.1	0.1
12	20.8	20.5	16.4	14.2	0.2	0.1
14	22.9	23.0	16.6	14.3	0.2	0.1

Уровень биорастворения угля, достигнутый с помощью *Bacillus sp.* достигла 14,6% для ОУ и 14,3% для ЭУ на 3-й день, впоследствии увеличившись до 22,9% для ОУ и 23% для ЭУ на 14-й день (Таб. 5). Напротив, степень разложения угля в контрольных группах оставалась на уровне 0,2% в течение того же периода времени. Напротив, использование *Pseudomonas sp.* биорастворение дало самый низкий результат через 14 дней: 16,6% для ОУ и 14,3% для ЭУ.

### Заключение

Отбор проб некондиционных бурых углей соответствовал установленным критериям в Павлодарской и Алматинской областях. Две пробы угля были тщательно отобраны с участков добычи Экибастузского (ЭУ) и Ой-Карагайского (ОУ) угольных месторождений, обработаны и тщательно исследованы. Физико-химические и структурные оценки образцов окисленных бурых углей позволили установить следующие показатели угля марки ЭУ (мас.%): W (влажность) – 9,8, А (зольность) – 38,2, V (выход летучих веществ) – 26,3, Q (теплотворная способность) – 13,5 МДж/кг; химический состав (мас.%) С – 78,5, Н – 5,4, N – 0,0, O – 15,5, S – 0,6; а для угля марки ОУ (мас.%): W – 11,8, V – 35,8, А – 12,2, Q – 15,6 МДж/кг; химический состав (мас.%) С – 75,00, O – 18,28, Н – 4,81, N – 1,50, S – 0,41. Для характеристики молекулярной структуры макро- и микроскопических свойств углей низкого качества были использованы различные спектральные и микроскопические методы.

Гуминовые кислоты извлекали из углей щелочной экстракцией модифицированным методом. Рассчитанные выходы гуминовых кислот составили 74,3% для ЭУ и 78,5% для

ОУ. Для изучения гуминовых кислот как побочных продуктов бурых углей были использованы многочисленные спектроскопические методы.

С помощью высокопроизводительной технологии секвенирования нового поколения HiSeq (Illumina, США) были выяснены микробное разнообразие и таксономический состав микробного сообщества низкокачественных образцов бурого угля. Анализ выявил группы бактерий, включающие *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* и *Tenericutes*. Выделение и идентификация *Pseudomonas sp.* и *Bacillus sp.* бактерий с характеристикой их физиологических, биохимических, морфологических и культуральных свойств.

В процессе биорастворения *Pseudomonas sp.* и *Bacillus sp.* культуры демонстрировали активный рост на средах на основе бурого угля, причем фаза адаптивного роста завершалась в течение 24 часов. Эти метаболические способности, демонстрируемые изолятами, потенциально могут влиять на реализацию инновационных биотехнологических стратегий.

### Финансирование

Данное исследование финансируется Казахским научно-исследовательским институтом земледелия и растениеводства (договор №16-10 от 10 сентября) в рамках научно-технической программы «Выработка технологий ведения органического сельского хозяйства по выращиванию сельскохозяйственных культур с учетом специфики регионов, цифровизации и экспорта» (ИРН BR10764907).

### Литература

- 1 Schobert, H. 1 – Introduction to low-rank coals: Types, resources, and current utilization. In; Luo, Z., Agraniotis Fuel and Chemical Production, M.B.T.-L.-R.C. for P.G., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp. 3–21 ISBN 978-0-08-100895-9.
- 2 Jiang, F.; Li, Z.; Lv, Z.; Gao, T.; Yang, J.; Qin, Z.; Yuan, H. The biosolubilization of lignite by *Bacillus sp.* Y7 and characterization of the soluble products. *Fuel* 2013, 103, 639–645.
- 3 Gokcay, C.F.; Kolankaya, N.; Dilek, F.B. Microbial solubilization of lignites. *Fuel* 2001, 80, 1421–1433.
- 4 Bend, S.L. The origin, formation and petrographic composition of coal. *Fuel* 1992, 71, 851–870.
- 5 Sarlaki, E.; Sharif Paghaleh, A.; Kianmehr, M.H.; Asefpour Vakilian, K. Extraction and purification of humic acids from lignite wastes using alkaline treatment and membrane ultrafiltration. *J. Clean. Prod.* 2019, 235, 712–723.
- 6 Chen, Y.; Clapp, C.E.; Magen, H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2004, 50, 1089–1095.
- 7 Shah, Z.H.; Rehman, H.M.; Akhtar, T.; Alsamadany, H.; Hamooh, B.T.; Mujtaba, T.; Daur, I.; Al Zahrani, Y.; Alzahrani, H.A.S.; Ali, S.; et al. Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. *Front. Plant Sci.* 2018, 9, 263.

- 8 Ackerson, M.D.; Johnson, N.L.; Le, M.; Clausen, E.C.; Gaddy, J.L. Biosolubilization and liquid fuel production from coal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1990, 24, 913–928.
- 9 Kwiatos, N.; Jędrzejczak-Krzepkowska, M.; Strzelecki, B.; Bielecki, S. Improvement of efficiency of brown coal biosolubilization by novel recombinant *Fusarium oxysporum* laccase. *AMB Express* 2018, 8, 133.
- 10 Nikbakht, A.; Kafi, M.; Babalar, M.; Xia, Y.P.; Luo, A.; Etemadi, N. Effect of Humic Acid on Plant Growth, Nutrient Uptake, and Postharvest Life of *Gerbera*. *J. Plant Nutr.* 2008, 31, 2155–2167.
- 11 Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Lee, S.; Byrne, R. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *Eur. J. Soil Biol.* 2006, 42, S65–S69.
- 12 ГОСТ 10742-71. ISO 1988:1975. Угли бурые, каменные, антрацит, горючие сланцы и угольные брикеты. Методы отбора и обработка проб.
- 13 ГОСТ 11022-90. ISO 1171-81; Топливо твердое минеральное. Метод определения зольности.
- 14 ГОСТ 11014-81. Угли бурые, каменные, антрацит и сланцы горючие. Ускоренный метод определения влаги.
- 15 ГОСТ 6382-80. Угли бурые, каменные, антрацит и сланцы горючие. Метод определения выхода летучих веществ.
- 16 Dong, L.; Yuan, Q.; Yuan, H. Changes of chemical properties of humic acids from crude and fungal transformed lignite. *Fuel* 2006, 85, 2402–2407.
- 17 Oulas, A.; Pavloundi, C.; Polymenakou, P.; Pavlopoulos, G.A.; Papanikolaou, N.; Kotoulas, G.; Arvanitidis, C.; Iliopoulos, I. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform. Biol. Insights* 2015, 9, 75–88.
- 18 Fuentes, M.; González-Gaitano, G.; García-Mina, J.M. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Org. Geochem.* 2006, 37, 1949–1959.
- 19 Francioso, O.; Ciavatta, C.; Montecchio, D.; Tugnoli, V.; Sánchez-Cortés, S.; Gessa, C. Quantitative estimation of peat, brown coal and lignite humic acids using chemical parameters, <sup>1</sup>H-NMR and DTA analyses. *Bioresour. Technol.* 2003, 88, 189–195.
- 20 Nasir, S.; Sarfaraz, T.B.; Verheyen, T.V.; Chaffee, A.L. Structural elucidation of humic acids extracted from Pakistani lignite using spectroscopic and thermal degradative techniques. *Fuel Process. Technol.* 2011, 92, 983–991.
- 21 Mielnik, L.; Kowalczyk, P. Optical characteristic of humic acids from lake sediments by excitation-emission matrix fluorescence with PARAFAC model. *J. Soils Sediments* 2018, 18, 2851–2862.
- 22 Vergnoux, A.; Di Rocco, R.; Domeizel, M.; Guiliano, M.; Doumenq, P.; Théraulaz, F. Effects of forest fires on water extractable organic matter and humic substances from Mediterranean soils: UV–vis and fluorescence spectroscopy approaches. *Geoderma* 2011, 160, 434–443.

## References

- 1 Schobert, H. 1 – Introduction to low-rank coals: Types, resources, and current utilization. In: Luo, Z., Agraniotis Fuel and Chemical Production, M.B.T.-L.-R.C. for P.G., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp. 3–21 ISBN 978-0-08-100895-9.
- 2 Jiang, F.; Li, Z.; Lv, Z.; Gao, T.; Yang, J.; Qin, Z.; Yuan, H. The biosolubilization of lignite by *Bacillus* sp. Y7 and characterization of the soluble products. *Fuel* 2013, 103, 639–645.
- 3 Gokcay, C.F.; Kolankaya, N.; Dilek, F.B. Microbial solubilization of lignites. *Fuel* 2001, 80, 1421–1433.
- 4 Bend, S.L. The origin, formation and petrographic composition of coal. *Fuel* 1992, 71, 851–870.
- 5 Sarlaki, E.; Sharif Paghaleh, A.; Kianmehr, M.H.; Asefpour Vakilian, K. Extraction and purification of humic acids from lignite wastes using alkaline treatment and membrane ultrafiltration. *J. Clean. Prod.* 2019, 235, 712–723.
- 6 Chen, Y.; Clapp, C.E.; Magen, H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2004, 50, 1089–1095.
- 7 Shah, Z.H.; Rehman, H.M.; Akhtar, T.; Alsamadany, H.; Hamooh, B.T.; Mujtaba, T.; Daur, I.; Al Zahrani, Y.; Alzahrani, H.A.S.; Ali, S.; et al. Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. *Front. Plant Sci.* 2018, 9, 263.
- 8 Ackerson, M.D.; Johnson, N.L.; Le, M.; Clausen, E.C.; Gaddy, J.L. Biosolubilization and liquid fuel production from coal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1990, 24, 913–928.
- 9 Kwiatos, N.; Jędrzejczak-Krzepkowska, M.; Strzelecki, B.; Bielecki, S. Improvement of efficiency of brown coal biosolubilization by novel recombinant *Fusarium oxysporum* laccase. *AMB Express* 2018, 8, 133.
- 10 Nikbakht, A.; Kafi, M.; Babalar, M.; Xia, Y.P.; Luo, A.; Etemadi, N. Effect of Humic Acid on Plant Growth, Nutrient Uptake, and Postharvest Life of *Gerbera*. *J. Plant Nutr.* 2008, 31, 2155–2167.
- 11 Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Lee, S.; Byrne, R. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *Eur. J. Soil Biol.* 2006, 42, S65–S69.
- 12 GOST 10742-71. ISO 1988:1975. Угли бурье, каменные, антрацит, горючие сланцы и угольные брикеты. Методы отбора и обработка проб (in Russian)
- 13 GOST 11022-90. ISO 1171-81; Топливо твердое минеральное. Метод определения зольности (in Russian)
- 14 GOST 11014-81. Угли бурье, каменные, антрацит и сланцы горючие. Ускоренный метод определения влаги (in Russian)
- 15 GOST 6382-80. Угли бурье, каменные, антрацит и сланцы горючие. Метод определения выхода летучих веществ (in Russian)
- 16 Dong, L.; Yuan, Q.; Yuan, H. Changes of chemical properties of humic acids from crude and fungal transformed lignite. *Fuel* 2006, 85, 2402–2407.

- 17 Oulas, A.; Pavludi, C.; Polymenakou, P.; Pavlopoulos, G.A.; Papanikolaou, N.; Kotoulas, G.; Arvanitidis, C.; Iliopoulos, I. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform. Biol. Insights* 2015, 9, 75–88.
- 18 Fuentes, M.; González-Gaitano, G.; García-Mina, J.M. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Org. Geochem.* 2006, 37, 1949–1959.
- 19 Francioso, O.; Ciavatta, C.; Montecchio, D.; Tugnoli, V.; Sánchez-Cortés, S.; Gessa, C. Quantitative estimation of peat, brown coal and lignite humic acids using chemical parameters, <sup>1</sup>H-NMR and DTA analyses. *Bioresour. Technol.* 2003, 88, 189–195.
- 20 Nasir, S.; Sarfaraz, T.B.; Verheyen, T.V.; Chaffee, A.L. Structural elucidation of humic acids extracted from Pakistani lignite using spectroscopic and thermal degradative techniques. *Fuel Process. Technol.* 2011, 92, 983–991.
- 21 Mielnik, L.; Kowalczyk, P. Optical characteristic of humic acids from lake sediments by excitation-emission matrix fluorescence with PARAFAC model. *J. Soils Sediments* 2018, 18, 2851–2862.
- 22 Vergnoux, A.; Di Rocco, R.; Domeizel, M.; Guiliano, M.; Doumenq, P.; Théraulaz, F. Effects of forest fires on water extractable organic matter and humic substances from Mediterranean soils: UV–vis and fluorescence spectroscopy approaches. *Geoderma* 2011, 160, 434–443.