

Б16/6

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
 Т.Г. Волова  
подпись инициалы, фамилия  
« 30» июня 2016 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Системы контролируемой доставки удобрений на основе поли-3-гидроксibuтирата  
и его композитов в виде таблетированных форм и форм с пленочным покрытием  
тема работы

Руководитель

 28.06.16  
подпись, дата

к.б.н. доц

должность, ученая степень

А.Н. Бояндин

инициалы, фамилия

Выпускник

 27.06.16  
подпись, дата

Е.А. Казанцева

инициалы, фамилия

Красноярск 2016

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	7
1.1 Основные виды минеральных удобрений.....	7
1.2 Биоразрушаемые полимерные материалы, перспективные для депонирования удобрений. ....	9
1.2.1 Поли-3-гидроксibuтират (ПЗГБ).....	10
1.2.2 Полимер - древесные композиты, их свойства .....	13
1.3 Деградация ПГА в природных условиях и в модельных средах при контролируемых условиях .....	17
1.4 Области применения поли(3-гидроксibuтирата).....	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	20
2.1 Объекты исследования.....	20
2.2 Изготовление депонированных форм азотного удобрения (нитрат аммония) с использованием полимерного матрикса из ПГБ и его композита с древесными опилками .....	22
2.3 Анализ динамики деградаций образцов и выход аммония в лабораторных условиях.....	22
2.4 Оценка эффективности применения разработанных форм азотного удобрения в лабораторных экспериментах с модельными растениями ....	22
2.5 Определение азота в водной среде.....	22
2.6 Измерение количества азота в почве .....	22
2.7 Определение азота в ирригационной воде .....	23
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	24
3.1 Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в водный раствор.....	24
3.2 Деградация таблетированных образцов и выход аммиачной селитры в модельную почву .....	24
3.3 Оценка эффективности разработанных форм азотного удобрения с пролонгированным выходом в лабораторный эксперимент с растениями .	24
3.3.1 Биодеградация полимера в почве	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>

3.3.2	Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в ирригационной воде.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3.3	Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в почву	<b>Ошибка!</b>
3.3.4	Оценка влияния внесенной аммиачной селитры, депонированной в полимерный матрикс, на рост модельных растений	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
	ВЫВОДЫ .....	25
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	25

## **ВВЕДЕНИЕ**

Удобрения — препараты, которые применяются для улучшения питания растений, свойств почвы, увеличения урожайности. Применение минеральных и органических удобрений считается основой химизации земледелия. Питание - это основа жизни каждого живого организма, даже растений. Вне питания тяжело понять суть процессов роста и развития (А. М. Артюшин 1984). Главнейшим средством улучшения питания, роста растительной продукции считается, прежде всего, использование органических, а так же минеральных удобрений.

Главным источником снабжения сельскохозяйственных культур питательными веществами является почва. Но для ежегодного выращивания высоких урожаев, которые бы имели хорошие качества, довольно часто оказывается недостаточным, то количество питательных веществ, которое поступает в растения из органического вещества и труднорастворимых минеральных соединений почвы. В этом случае растения нуждаются в систематическом внесении минеральных удобрений.

Одним из важных типов удобрений являются азотные. К ним относятся неорганические и органические азотсодержащие вещества, подразделяющиеся на нитратные, амидные и аммиачные. Из синтетического аммиака главным образом получают азотные удобрения. Из-за высокой мобильности соединений азота его низкое содержание в почве часто лимитирует развитие культурных растений, поэтому внесение азотных удобрений вызывает высокий положительный эффект.

Большинство азотных удобрений представляют собой белый или желтоватый кристаллический порошок (кроме цианамид калия и жидких удобрений), хорошо растворимы в воде, не поглощаются или слабо поглощаются почвой. По выпуску и использованию в сельском хозяйстве наиболее важными являются аммиачная селитра и мочевина, составляющие око-

ло 60% всех азотных удобрений. Азотные удобрения содержат азот в трех основных формах:

1) в форме аммиака, связанного с какой-нибудь минеральной кислотой, — аммиачные удобрения;

2) в нитратной форме, т. е. в виде солей азотной кислоты, — нитратные удобрения;

3) в амидной форме—амидные удобрения

Кроме перечисленных видов азотных удобрений, имеются также удобрения, содержащие азот одновременно в аммиачной и нитратной форме (например, аммиачная селитра).

В то же время традиционное внесение удобрений имеет определенные издержки, связанные с их максимальной (зачастую слишком высокой) концентрацией после внесения, и ее падением через определенное время. Особенно это актуально для азотных удобрений, в связи с высокой подвижностью минерального азота и его высокой склонностью к вымыванию из почвы.

Одним из решений может являться связывание азотных удобрений с дополнительными компонентами, замедляющими их высвобождение в почве, тем самым обеспечивая постепенный выход препарата и, соответственно, поддержание относительно стабильных концентраций удобрения на протяжении требуемого периода. В качестве таких компонентов могут быть использованы, например, биоразрушаемые полимеры, медленно разлагающиеся с участием почвенной микрофлоры, что сопровождается выходом депонированного препарата. С использованием матриц из биоразрушаемых материалов возможно конструирование различных форм препаратов для сельского хозяйства и разработка способов их доставки (F. Sorena 2005). Важным моментом в создании таких матриц служит их полная биоразлагаемость в почве, абсолютная нетоксичность продуктов деструкции для биоты и человека, контролируемая доставка (В. К. Штефан 1981). В качестве материалов носителей для конструирования форм про-

лонгированного действия могут быть использованы биоразрушаемые полимеры различного состава, в частности бактериальные полигидроксиканоаты, продукты переработки древесины, а так же композиты на их основе.

Цель работы: Разработка депонированных форм азотных удобрений на основе поли-3-гидроксibuтирата и его композитов с древесными опилками для обеспечения их пролонгированного выхода в окружающую среду.

Для достижения цели сформулированы следующие задачи:

1) Разработать и получить таблетированные формы удобрений на основе аммиачной селитры с использованием в качестве биоразлагаемого носителя поли-3-гидроксibuтирата и его композита (древесные опилки), в том числе с дополнительным пленочным покрытием из поли-3-гидроксibuтирата.

2) Оценить высвобождение аммиачной селитры из разработанных форм в модельные среды – воду, почву.

3) Оценить эффективность разработанных форм на рост модельного растения – пшеницы.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### **Основные виды минеральных удобрений.**

Минеральные удобрения – источник различных питательных элементов для растений и свойств почвы, в первую очередь азота, фосфора и калия, а также кальция, магния, серы, железа. Все эти элементы относятся к группе макроэлементов, так как они поглощаются растениями в значительных количествах. Кроме того, растениям необходимы другие элементы, хотя и в очень небольших количествах. Их называют микроэлементами. К микроэлементам относятся марганец, бор, медь, цинк, молибден, йод, кобальт и некоторые другие. Все элементы в равной степени необходимы растениям. При полном отсутствии любого элемента в почве растение не может расти и развиваться нормально. Все минеральные элементы участвуют в сложных преобразованиях органических веществ, образующихся в процессе фотосинтеза. Растения для образования своих органов – стеблей, листьев, цветков, плодов, клубней – используют минеральные питательные элементы в разных соотношениях. В почвах обычно имеются все необходимые растению питательные элементы. Но часто отдельных элементов бывает недостаточно для удовлетворительного роста растений. На песчаных почвах растения нередко испытывают недостаток магния, на торфяных почвах – молибдена, на черноземах – марганца и т. д. Недостаток элементов восполняется при помощи удобрений. Почвенную кислотность устраняют при помощи углекислых солей кальция и магния. Применение минеральных удобрений – один из основных приемов интенсивного земледелия. С помощью удобрений можно резко повысить урожаи любых культур на уже освоенных площадях без дополнительных затрат на обработку новых земель. При помощи минеральных удобрений можно использовать даже самые бедные, так называемые бросовые земли.

Вырабатываемые химической промышленностью основные минеральные удобрения подразделяются на:

- а) фосфорные (главным образом простой и двойной суперфосфаты и преципитат);
- б) азотные (сульфат аммония, аммиачная селитра, кальциевая и натриевая селитры);
- в) калийные (хлористый калий и смешанные калийные соли);
- г) борные, магниевые и марганцевые (соединения и соли, содержащие эти элементы);
- д) удобрения, содержащие комплексы микроэлементов.

Наиболее важными минеральными удобрениями являются азотные. Он необходим растениям в больших количествах, так как используется для синтеза органических азотсодержащих соединений, прежде всего аминокислот и – далее – белков. Если азота не хватает, то листья начинают вянуть, блекнуть, приобретают желтоватую окраску. При недостатке азота ослабляется процесс закладки новых почек будущего урожая, завязавшиеся завязи плодов осыпаются. Из азотных удобрений наиболее распространены аммиачная селитра и мочеви́на. Под фруктовые деревья эти удобрения вносят весной по всей проекции кроны. Нормы внесения зависят от вида плодового дерева и его возраста. Азотные удобрения относятся к быстрорастворимым, и поэтому азотные питательные вещества для роста легко и быстро усваиваются растениями. В общем случае азотные удобрения подразделяются на амидные, аммиачные и нитратные (В. Н. Ефимов и др., 2003).

Однако переизбыток азота также нежелателен, так как он способствует избыточному росту растений и слабому закладыванию плодовых почек. При этом замедляются фазы развития растения, ухудшаются сроки хранения урожая, накапливаются в плодах нитраты, не безопасные для организма.

Одним из решений является депонирование удобрений в специальных носителях (в частности, разрушаемых биополимерах), которое служит для удержания азотсодержащих удобрений от выхода в почву на протяжении опре-

деленного периода времени. По мере потребности удобрения извлекаются, и растения их эффективно потребляют. Такое депонирование в сорбированном виде удобрений, препятствует их вымыванию из почвы водой во время снеготаяния и дождей. Тем самым снижают потребность внесения удобрений и экономят их. Экономия составляет до 40% от потребности растений.

Для дозированного внесения удобрений в почву изучены методы инкапсулирования удобрений в матрикс из биоразрушаемых полиэфигов и покрытия удобрения полимером, т.е. создание полимерных конструкций с оболочкой. В работе (Woudneh, M. B. Acidic herbicides in surface water of Lower Fraser Valley, 2007) исследована способность к биодеградации полимерных матриксов с депонированным в их структуру бактериальным удобрением. Бактериальное удобрение включали в матрикс из полибутилен сукцината и смеси полибутилен сукцинат с крахмалом. Полимерные формы погружали в стерильный солевой раствор, температура которого равнялась 37°C, и анализировали динамику выхода препарата. Как оказалось, выход удобрения проходил с высокой скоростью, так же было отмечено, что скорость биодеградации полимерного матрикса из композита так же была высокой. Эксперимент составил 180 дней, за период которых образцы разрушились на 48%. Наблюдалось, что увеличение количества крахмала в матриксе приводило к увеличению скорости биодеградации образцов. Данный эксперимент доказал возможное применение данных полимерных матриксов в качестве матрикса для бактериальных удобрений.

### **Биоразрушаемые полимерные материалы, перспективные для депонирования удобрений.**

Существует множество различных биоразлагаемых полимерных материалов, которые могут быть использованы для депонирования удобрений. Возможно использование полимерных материалов, из возобновляемых ресурсов, таких как крахмал, целлюлоза и древесная мука, а из синтезированных материалов, таких как полибутиленсукцинат (PBSU) (Lai and Huang, 2005), (Ratto, 1999), полимолочная кислота (ПМК) (C. S. Wu, 2005), поли(ε-капролактона)

(ПКЛ) (J. Sprevec, 1866) и поли(3-гидроксибутирата) (ПГБ) (M. Vorckenhagen, 1998). Для своего эксперимента будут использованы такие биоразрушаемые полимеры как поли-3-гидроксибутират и березовые опилки.

### Поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ)

Первым среди выделенных и наиболее полно к настоящему моменту охарактеризованным полигидроксиалканоатом является поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ) (рис. 1).

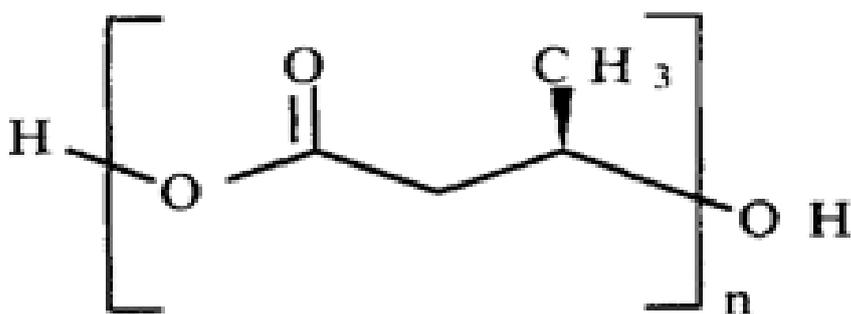


Рисунок 1 - Структурная формула поли-3-гидроксибутирата.

Полигидроксибутират ( $C_4H_6O_2$ ) является гомополимером D(-)-3-β-оксимасляной кислоты и представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами ( $C_4H_6O_2$ ) (G. Braunegg, 1998). ПГБ – это бесцветное полукристаллическое гидрофобное вещество (Т. Г. Волова и др., 2013). В отличие от сложных синтетических полиэфиров, полигидроксибутират – это стереорегулярный оптически активный полимер, который образует спирали в растворе и кристаллизуется в сферолиты.

Стереоспецифичный полимеризующий фермент — ПГБ-синтетаза — определяет стереорегулярность ПГБ (R. A. Verlinden Hill, 2007). Стереоспецифичность и распределение электронной плотности в молекуле объясняет высокую — до 80% — кристалличность полиэфира, а его гидрофобность — амфорное состояние во внутриклеточных включениях. Молекулярная масса ПГБ может составлять от нескольких сотен до миллионов Da. Эта величина зависит от типа используемого продуцента, условий его выращивания, а также метода экстракции полимера из биомассы и применяемых при этом растворителей. Молеку-

лярная масса полимера является очень важным параметром, так как определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. Поэтому данному параметру уделяется существенное внимание.

ПГБ является запасом углерода и энергии, необходимых для жизнедеятельности бактерий, подобно жирам и углеводам в жизни млекопитающих. Биополимер нетоксичен и обладает рядом специфических свойств: хорошая биосовместимость с живой тканью организма, полная биодеструкция во времени в некоторых средах, причем, время распада зависит от вида изделий, изготовленных из этого полимера. Так, пластины и волокна разрушаются в тканях организма в течение нескольких месяцев, а для биодegradации пленок, внесенных в почву, требуется всего несколько недель. Конечным продуктом биодegradации в почве является двуокись углерода, а в живом организме - 3-гидроксимасляная кислота, которая является одним из компонентов крови.

ПГБ - термопластичный материал с физико-химическими характеристиками, занимающими как бы промежуточное положение между полиэфиром и полипропиленом. Полимер хорошо кристаллизуется и потому при механических нагрузках может быть довольно хрупким. ПГБ оптически активен и обладает пьезоэлектрическими свойствами; он устойчив к действию ультрафиолета и гамма-облучению, что особенно важно при стерилизации изделий из биополимера. Пленки из биополимера обладают газобарьерными свойствами, так как имеют низкую кислородопроницаемость. Главным свойством ПГБ является способность полимера к биоразложению. Дegradация бывает гидролитической и ферментативной.

Так, в ряде работ была изучена гидролитическая degradation сополиэфиров поли-3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата и поли-3-гидроксibuтирата-со-4-гидроксibuтирата (Yoshiharu Doi, 1990) и смесей поли-3-гидроксibuтирата и поли-3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата (Hidenori Satoh, 1994) при 55°C в 0,01 мол буферном растворе фосфата (pH 7,4).

При деградации сополиэфиров поли-3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата и поли-3-гидроксibuтирата-со-4-гидроксibuтирата массы всех пленок оставались неизменными в течение 58 дней, что показало, что при 55° С не происходит эрозии полимеров. Но при этом молекулярные массы сополиэфиров со временем уменьшались. Очевидно, что скорость потери молекулярной массы зависит от состава сополиэфиров.

Ферментативная деградация смесей поли-3-гидроксibuтирата и полиэтиленоксида проводилась в течение 19 ч. Для сравнения был выполнен простой гидролиз смесей поли-3-гидроксibuтирата и полиэтиленоксида при 37° С в отсутствие деполимеразы ПГБ в 0,1 моль буферном растворе фосфата (рН 7,4). В отсутствие деполимеразы ПГБ масса пленки ПГБ оставалась неизменной в течение 19 ч, что показывает, что при 37° С не происходит эрозии полимера. Однако потеря массы пленок смеси поли-3-гидроксibuтирата и полиэтиленоксида наблюдалась даже в отсутствие деполимеразы ПГБ. В этом случае потеря массы смесей поли-3-гидроксibuтирата и полиэтиленоксида почти совпадала с исходным содержанием компонента полиэтиленоксида в смесях, что позволяет предположить, что этот компонент в пленках растворился в водном буферном растворе за 19 часов. Пленки смеси поли-3-гидроксibuтирата и полиэтиленоксида полностью деградировали в присутствии деполимеразы ПГБ за 19 часов. В этом случае зависящие от времени изменения массы пленок смеси были исследованы во время ферментативной деградации. Вся масса компонента полиэтиленоксида (1,25 мг) в пленках поли-3-гидроксibuтирата и полиэтиленоксида (5 мг) растворилась в водном буферном растворе за 1 час, а остаточный компонент ПГБ постепенно деградировал под действием деполимеразы ПГБ.

Также, биodeградация ПГБ зависит от микроорганизмов, обитающих в конкретной природной среде, поэтому необходимо проведение всесторонних экологических и таксономических исследований многообразия микроорганизмов-деструкторов полимеров в различных биологических средах. Впервые

микроорганизмы, разрушающие ПЗГБ, были выделены более 40 лет назад (Chowdhury, 1963).

Таким образом, способность ПГБ к биоразложению является именно тем свойством, на котором основано его широкое применение, как в чистом виде, так и в виде смесей и сополимеров на его основе. Эта способность ПГБ к деструкции в окружающей среде под действием микроорганизмов делает этот полимер перспективным для сельскохозяйственной деятельности (в качестве матриксов для доставки пестицидов и удобрения для безопасного пролонгированного высвобождения веществ) (О. Н. Войнова, Г. С. Калачева и др., 2009).

### **Полимер - древесные композиты, их свойства**

Полимер - древесные композиты (ПДК) - это материалы, где древесина смешивается с полимером, которые затем полимеризуются и смешиваются в процессе экструзии для приобретения требуемых свойств.

Анализ литературных данных показал, что для получения полимер-древесных композитов применяют различные наполнители и термопластичные связующие. В состав таких полимер-древесных композитов могут входить различные типы биоразлагаемых полимеров микробного и синтетического происхождения, древесная мука (опилки) представляющая собой мелкие частицы древесины произвольных форм, получаемые специально в процессе размола древесины твердых и мягких лиственных и хвойных пород, а так же минеральные и органические наполнители (О. В. Ершова и др., 2014).

Древесина является арсеналом химических соединений – известно давно. Ее химический состав разнообразен, но основная масса приходится на целлюлозу (50%), лигнин (27 %) и гемицеллюлозу(30%). **Опилки древесные**, являются отходами в виде мелких частиц получаемые при распиливании древесины,

используются как сырьё в гидролизном производстве, при получении древесной муки, в качестве наполнителя, как топливо.

Древесные опилки, имеющие в своем составе такие достаточно устойчивые химические соединения как целлюлоза лигнин и гемицеллюлозу, превращаясь при определенных условиях в другие ценные продукты, проявляют при этих превращениях интересные химические свойства, по этой причине их можно рассматривать как химические реагенты.

Основным компонентом древесины является полисахарид **целлюлоза**, – линейный-глюкан [поли-β-D-глюкопираноза] общей формулы  $[C_6H_7O_2(OH)_3]_n$ . Это один из наиболее распространенных биополимеров, входящий в состав клеточных стенок растений и микроорганизмов (некоторые из них, а также отдельные виды беспозвоночных - черви, древооточцы благодаря ферменту целлюлазе, расщепляющему целлюлозу, могут ее усваивать). Содержание целлюлозы по массе в волокнах семян хлопчатника 95-98%, лубяных 60-85%, тканях древесины 40-44%, низших растениях 10-25% (Э. Хейзер, 1933).

Целлюлоза – волокнистое вещество. Она не плавится и не переходит в парообразное состояние: при нагревании примерно до 350°C целлюлоза разлагается – обугливается. Целлюлоза нерастворима ни в воде, ни в большинстве других неорганических и органических растворителях. Растворителем целлюлозы является реактив Швейцера – раствор гидроксида меди (II) с аммиаком, с которым она одновременно и взаимодействует. Концентрированные кислоты (серная, фосфорная) и концентрированный раствор хлорида цинка также растворяют целлюлозу, но при этом происходит ее частичный распад (гидролиз), сопровождающийся уменьшением молекулярной массы (С. Н. Ушаков, 1941).

Одно из наиболее характерных свойств целлюлозы – способность в присутствии кислот подвергаться гидролизу с образованием глюкозы. Так как в молекулах целлюлозы имеются гидроксильные группы, то для нее характерны

реакции этерификации. Из них практическое значение имеют реакции целлюлозы с азотной кислотой и ангидридом уксусной кислоты. При взаимодействии целлюлозы с азотной кислотой в присутствии концентрированной серной кислоты, в зависимости от условий образуются динитроцеллюлоза и тринитроцеллюлоза, являющиеся сложными эфирами: Целлюлоза горит. При этом образуются оксид углерода (IV) и вода. При нагревании древесины без доступа воздуха происходит разложение целлюлозы и других веществ. При этом получают древесный уголь, метан, метиловый спирт, уксусная кислота, ацетон и другие продукты (З. А. Роговин, 1972).

Вторым важным компонентом является **лигнин**. Это сложный (сетчатый) ароматический природный полимер входящий в состав наземных растений, продукт биосинтеза. После целлюлозы, - лигнин самый распространенный полимер на земле, играющий важную роль в природном круговороте углерода. Возникновение лигнина произошло в ходе эволюции при переходе растений от водного к наземному образу жизни для обеспечения жесткости и устойчивости стеблей и стволов (подобно хитину у членистоногих). Лигнин не изготавливают специально; он и его химически модифицированные формы являются отходами биохимического производства. В ходе физико-химической переработки растительной ткани молекулярная масса лигнина уменьшается в несколько раз, а его химическая активность возрастает.

Лигнины, получаемые из разных растений, значительно отличаются друг от друга по химическому составу. Молекула лигнина неопределенно велика и имеет много разнообразных функциональных групп. Общей структурной единицей всех видов лигнина является фенилпропан ( $C_9H_{10}$ ), а различия связаны с разным содержанием функциональных групп (Ф. Э. Браунс и др., 1964). В соответствии с современными познаниями лигнин - сложный трехмерный сетчатый полимер, имеющий ароматическую природу, получающийся в результате поликонденсации нескольких монолигнолов - коричных спиртов (паракумарового, конеферилового, синапового). При нормальных условиях лигнин плохо

растворяется в воде и органических растворителях. В химических технологиях и в окружающей среде лигнин может участвовать в самых разнообразных химических реакциях и превращениях. Обладает биологической активностью. Лигнин проявляет пластические свойства при повышенном давлении и температуре, особенно во влажном состоянии.

И третьим необходимым компонентом является **гемицеллюлозы**. Полисахариды, содержащиеся наряду с целлюлозой и лигнином в клеточной стенке растений. Большинство гемицеллюлоз отличается от целлюлозы лучшей растворимостью в растворах щелочей и способностью легко гидролизироваться. В растениях гемицеллюлозы служат опорным конструкционным материалом и, возможно, резервным питательным веществом. Содержание гемицеллюлоз в древесине и других растительных материалах – соломе, шелухе семян, кукурузных кочерыжках и т.п. составляет 13-43%. Извлекают гемицеллюлозы обычно щелочными растворами непосредственно из растительных материалов или экстракцией диметилсульфоксидом из холоцеллюлозы (углеводного комплекса, остающегося после выделения из древесины лигнина). В последнем случае получается продукт, близкий по составу природному (В. И. Шарков, 1972).

Макромолекулы гемицеллюлоз разветвлены и построены из пентоз (ксилозы, арабинозы) или гексоз (маннозы, галактозы, фруктозы); степень полимеризации 50-300; мол. Масса значительно меньше, чем у целлюлозы.

Опилки как удобрение нельзя заделывать в почву в свежем виде, так как в этом случае почвенные микроорганизмы примутся активно перерабатывать древесину, поглощая из верхних слоев грунта значительные объемы азота. А ведь азот является важнейшим элементом питания растений, без которого невозможно их полноценное развитие. Поэтому опилки часто рекомендуют использовать как один из компонентов питательных смесей.

## **Дегградация ПГА в природных условиях и в модельных средах при контролируемых условиях**

В естественных природных условиях ПГА разрушаются до конечных продуктов – диоксида углерода и воды в аэробных условиях, метана и воды -в анаэробных. Пленки ПГА главным образом разрушаются путем деятельности микроорганизмов. Скорость биоразложения зависит от нескольких факторов данной окружающей среды, таких как численность микроорганизмов, температура, уровень влажности, рН, питательных веществ, кристалличности и площади поверхности (Y. Doi, 1992).

Оценка биодегградации материалов из ПГА в естественных условиях была произведена при контроле различных свойств образцов (размер, молекулярная масса, механическая прочность) (Y. Doi, K. Kasuya, 1996), (K. E. Gonda, D. Jendrossek, 2000), (J. Mergaert, A. Wouters, 1995), (M. Kitano and Y. Yakabe, 1994).

Для того чтобы оценить способность к разложению микроорганизмами ПГА, организацией по экономическому сотрудничеству и развитию были проведены исследования в водных средах, с использованием химических веществ под номером 301С (R. Liang, 2007). Проведены исследования по сравнению степени дегградации полигидроксиалканоатов со средней длиной цепи в тропических лесах и мангровых почвах (S.-P. Lim, 2005). Они показали, что в лесных почвах пленки из ПГА теряли вес намного быстрее, чем в лесных почвах на берегу ручья и мангровых почвах. Доказано, что разложение ПГА уменьшается по мере увеличения общей кристалличности (D. P. Martin, 1999). Высокие температуры в лесных и мангровых почвах могли также способствовать быстрому темпу дегградации ПГБ в этих двух сравниваемых участках, но они были ниже чем в лесных почвах (K. Mukai, 1993).

С целью выявления механизма дегградации полигидроксиалканоатов исследуется их разрушаемость в различных модельных средах (буферные растворы, растворы ферментов, кровь, сыворотка, культуры клеток), при различных

значениях pH, температуры, солености и т.д. Для исследования закономерностей биodeградации ПГА используют полимеры различного химического состава, имеющие разные исходные значения молекулярной массы и кристалличности, а также полимерные изделия различной формы и структуры. Как правило, показателями деструкции ПГА служат уменьшение молекулярной массы и степени кристалличности полимера, а также изменение общего веса полимерных изделий и их прочностных свойств (Y. Doi, 1994).

Так, изучены закономерности биodeградации полигидроксибутирата, выявлена зависимость разрушения от температуры среды, выделены доминирующие микроорганизмы – деструкторы полимеров (*Pseudomonas lemoignei*, *Streptomyces*, *Aiteromonas haloplanktis*, *Penicillium*, *Paracoccus denitrificans*, *R. rubrum*) (X. Han, S. Chena and X. Hu, 2009), (M. Z. Hussein и др., 2005), (A. Jarosiewicz, M. Tomaszewska, 2003).

В работах (Wu, C.-S. Controlled release evaluation of bacterial fertilizer using polymer composites as matrix, 2008) и (Wu, C.-S. Controlled release evaluation of bacterial fertilizer using polymer composites as matrix, 2008) выявлено, что ПГА чрезвычайно деградируют в буферных растворах, при этом менее кристаллические сополимеры - быстрее по сравнению с высококристаллическим ПГБ. Также было показано, что динамика разрушения ПГА зависит от исходной молекулярной массы материала.

### **Области применения поли(3-гидроксибутирата)**

ПГБ и его сополимеры используют в хирургии в качестве хирургических имплантатов, также применяется в стоматологии, гинекологии и многих других медицинских областях. В биотехнологии он может быть использован как матрикс для клеточных культур (R. Handrick, 2004).

Из материалов на основе ПГБ получают пленки, нити, трубки и пористые структуры для тканевой инженерии (H. Kenar, 2008). Из ПГБ получают трубки, в дальнейшем которые будут использоваться для восстановления поврежден-

ных волокон периферической нервной системы (D. F. Kalbermatten, 2009). Также получают матриксы на основе ПГБ и его сополимеров с различной пористостью для улучшения пролиферации костных клеток, это является перспективным направлением (Н. Najjali, 2012). Кроме всего этого, ПГБ применяют для инкапсуляции и пролонгированного выхода различных химических веществ, в том числе обладающих фармакологической активностью и это позволяет использовать его в качестве лекарственных полимерных систем для контролируемого выхода. При выращивании клеток на матриксах из ПГБ, в экспериментах *in vitro*, было отмечено достаточно хорошая выживаемость клеток разных типов, и при всем этом наблюдалась низкая воспалительная реакция ткани на материал, который был имплантирован (В. А. Лившиц, 2009).

Существенное снижение себестоимости при использовании всевозможных добавок и сополимеризации ПГБ делает возможным его использование в промышленности и сельском хозяйстве только при условии сохранения способности к биодеструкции.

Материалы, ограниченные сроком действия для производства упаковки, способны существенно понизить загрязнение окружающей среды, чему содействует микробиологическое производство ПГБ на субстрате из отходов пищевой промышленности (G. Braunegg, 1998).

В других отраслях, таких как сельское хозяйство, материалы на основе ПГБ могут быть применимы для капсулирования семян с минеральными удобрениями с целью их защиты и увеличения всхожести.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

В качестве удобрений использовали нитрат аммония (аммонийную (аммиачную) селитру) –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  производства ЗАО «Чудовоагрохимсервис» (Россия).

В качестве носителя удобрений для обеспечения их пролонгированного выхода в почву использовали поли-3-гидроксibuтират (ПГБ) и его композит с древесиной (березовые опилки).

Поли-3-гидроксibuтират был получен микробным биосинтезом с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* В-10646 (штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов). Бактерии культивировали в строго стерильных условиях в периодическом режиме в культиваторе BioFlo 115 (“New Brunswick”, США) объемом 7,5 л, на минеральной среде с глюкозой (Т. Г. Volova, 2014). Молекулярная масса ПГБ составляла 920 кДа, ПД=2.52.

Березовые опилки получали измельчением березовой древесины и просушиванием.

В качестве тест-культуры в опыте была использована пшеница мягкая яровая (*Triticum aestivum*) сорт «Алтайская 70» (семейства Злаки (лат. *Gramineae*), или Мятликовые (лат. *Poaceae*)). Она является ведущей зерновой культурой во многих странах.

Однолетние травянистые растения 30 - 150 см высотой. Стебли прямостоячие, полые или выполненные. Листья 3 - 15 (20) мм шириной, обычно плоские, линейные или широколинейные, голые или волосистые, шероховатые. Корневая система мочковатая (С. А. Невский, 1934).

Сорт пшеницы – «Алтайская 70» выведен двукратным индивидуальным отбором из гибрида Алтайская 98 и Алтайская 325. Проходил сортоиспытания по морозоустойчивости в суровом климате Сибири и Дальнего Востока. Этот сорт показывает прекрасные результаты по урожайности 3,59-4,51

т/га. Среднеранний сорт – вегетационный период от всходов до восковой спелости 74-79 дней. За счет хорошего кущения и устойчивости к шведской мухе формирует густой стеблестой. Сорт устойчив к пыльной головне, полеганию, осыпанию и прорастанию на корню и в валках. Мучнистой росой поражается слабо. Относится к сортам интенсивного типа. Рекомендуется возделывать по пару, зернобобовым с использованием минеральных удобрений. Сорт внесен в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию в 2009 году.

Полевая почва (Красноярский край, пос. Манино) – агрочернозем криогенно-мицелярный, характеризуется высоким содержанием гумуса в слое 0-20 см (7,9-9,6%), слабощелочной реакцией среды (рН 7,1-7,8). Плотность почвы имеет рыхлое и нормальное сложение пахотного слоя (0,85-1,11г/см<sup>3</sup>). Общий титр органотрофных бактерий составил 16,3±5,1 млн. КОЕ в 1 г.

В качестве химических реактивов были использованы:

- Реактив Несслера ЧДА ( $K_2HgI_4 \times NaOH$ ) производства ООО ПКФ «ТД Реахим» (Россия) ГОСТ 6-09-2089-77
- Хлороформ ХЧ ЗАО «Экос-1» (Россия)
- Калий хлористый (KCl) производства ООО ПКФ «ТД Реахим» (Россия) ТУ 6-09-2567-83
- Сегнетова соль (Калий натрий виннокислый  $C_4H_4KNaO_6 \times 4H_2O$ ) ХЧ производства ЗАО «Купавнареактив» ТУ 6-09-2677-89

**2.2 Изготовление депонированных форм азотного удобрения (нитрат аммония) с использованием полимерного матрикса из ПГБ и его композита с древесными опилками**

**2.3 Анализ динамики деградаций образцов и выход аммония в лабораторных условиях**

**2.4 Оценка эффективности применения разработанных форм азотного удобрения в лабораторных экспериментах с модельными растениями**

[Изъято 6 страниц]

**2.5 Определение азота в водной среде**

Определение азота проводилось согласно ГСО 7259-96 (Методика определения азота - ГСО 7259-96). Из колбы пипеткой брали по 1 мл исследуемого раствора, при высоких концентрациях ионов аммония производили разведение, далее помещали в мерную колбу на 50 мл, доводили дистиллированной водой до метки 47 мл, и добавляли к нему по 2 мл раствора Несслера. Через 5 минут измеряли плотность растворов на фотоэлектроколориметре при длине волны 400 нм в кюветах длиной 3 см относительно дистиллированной воды. Количество (мг/мл) азота в растворе определяли по калибровочному графику.

**2.6 Измерение количества азота в почве**

Определению количества азота мешают присутствующие в почвенных вытяжках  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Они осаждаются реактивом Несслера и вызывают опалесценцию растворов. Для устранения этого в вытяжку перед добавлением реактива Несслера вносят сегнетову соль  $\text{KNaC}_4\text{H}_{40}\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (калий-натрий виннокислый), образующую с кальцием и магнием растворимые комплексные соединения.

Ход определения

В колбу отбирали 10 г экспериментальной почвы и добавляли к ней 2% раствор KCl (100 мл). Колбу встряхивали в течение часа, и содержимое отфильтровывали через фильтр «белая лента». Затем отбирали 5 мл вытяжки и разбавляли ее дистиллированной водой (35 мл). После этого добавляли 2 мл сегнетовой соли (50%), 2 мл реактива Несслера и разбавляли дистиллированной водой (6 мл), доводя объем раствора до 50 мл. Через 2-3 минуты раствор колориметрировали на фотоколориметре (длина волны 425 нм) в кюветах длиной 3 см относительно дистиллированной воды. Содержание (мг/мл) азота в растворе устанавливали по калибровочной кривой.

## **2.7 Определение азота в ирригационной воде**

[Изъят 1 абзац]

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

### **3.1 Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в водный раствор**

[Изъята 1 страница]

### **3.2 Деградация таблетированных образцов и выход аммиачной селитры в модельную почву**

[Изъято 4 страницы]

### **3.3 Оценка эффективности разработанных форм азотного удобрения с пролонгированным выходом в лабораторный эксперимент с растениями**

Для оценки эффективности разработанных форм в эксперименте вносили образцы, нагруженные удобрением. Одновременно в контрольные контейнеры (положительный контроль) вносили свободное удобрение в рекомендуемой дозе - 60 мг/контейнер. Негативным контролем служила почва без внесения удобрения. В качестве растительной культуры использовали пшеницу сорта «Алтайская 70».

[Изъято 7 страниц]

Таким образом, полученные данные показали возможность управления скоростью оттока аммиачной селитры из систем «удобрение - полимер» путем подбора состава полимерного носителя и технологии изготовления форм, и позволили получить препараты удобрения с замедленным выходом, обеспечившие в лабораторных условиях более высокий прирост биомассы растений по сравнению со свободной аммиачной селитрой.

## **ВЫВОДЫ**

[Изъята 1 страница]

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Артюшин А. М., Державин Л. М. Краткий словарь по удобрениям – 2-е изд. – М., 1984г.
2. Волова, Т. Г. Физико-Химические свойства полигидроксиалкананов различного химического строения. / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов, А. Д. Васильев, А. Г. Суковатый, А. J. Sinskey // Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2013, том 55, № 7, с. 775–786.
3. Ершова О. В., Чупрова Л. В., Муллина Э. Р., Мишурина О. В. Исследование зависимости свойств древесно-полимерных композитов от химического состава матрицы // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 2
4. Ефимов В. Н., Донских И. Н., Царенко В. П. Система удобрений/Под ред. В. Н. Ефимова – М.: КолосС, 2003-320с.
5. З. А. Роговин «Химия целлюлозы», М: „издательство «химия», 1972 год., 258 с.
6. Лившиц В. А., Бонарцев А. П., Иорданский А. Л. и др. Микросферы из поли-3-гидроксибутирата для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. — 2009. — Т. 51. — С. 1243–125.
7. Методика определения азота - ГСО 7259-96
8. Невский С. А. Род 202. Пшеница — *Triticum L.* Изд-во АН СССР, 1934. — Т. II. — С. 675—688. — 778 + XXXIII с. — 5175 экз.
9. О. Н. Войнова, Г. С. Калачева и др., Микробные полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов / Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 4. – Стр. 427-431.
10. С. Н. Ушаков «Эфиры целлюлозы и пластические массы на их основе», Госхимтехиздат ленинградское отделение., 1941 год., 501 с.

11. Ф. Э. Браунс, Д. А. Браунс, М. Химия лигнина. Лесная промышленность, 1964, с 190.
12. Шарков В. И., Куйбина Н. И., Химия гемицеллюлоз, М., 1972.
13. Штефан В. К. Жизнь растений и удобрений – М., 1981г.
14. Э. Хейзер, перевод с немецкого под редакцией Доц. Л. Е. Акима, «Руководство по химии Целлюлозы», Госхимтехиздат ленинградское отделение., 1933 год., 275 с.
15. Braunnegg G., Lefebvre G., Genser K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects // J. Biotechnol. — 1998. — Vol. 65. — P. 127–161.
16. C. S. Wu, Improving polylactide/starch biocomposites by grafting polylactide with acrylic acid - characterization and biodegradability assessment, Macromol. Biosci. 5 (2005) 352–361.
17. Chowdhury A. A. Poli-3-hydroxybuttersaure abbauende Bakterien und Exoenzym // Arch. Mikrobiol. – 1963. Vol. 47. – P. 167-200
18. Doi Y. Biodegradation of biosynthetic and chemosynthetic polyhydroxyalkanoates. / Y. Doi, K. Mukai, K. Kasuya, K. Yamada // Biodegradable plastics and polymers. – 1994. – P. 39–51.
19. Hajiali H., Hosseinalipour M., Karbasi S., Shokrgozar M. A. The influence of bioglass nanoparticles on the biodegradation and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds // Int. J. Artif. Organs. — 2012. — Vol. 35 (11). — P. 1015–1024
20. Han X. Controlled-release fertilizer encapsulated by starch/polyvinyl alcohol coating / X. Han, S. Chena and X. Hu // The Third Membrane Science and Technology Conference of Visegrad Countries (PERMEA) – 2009. – V.240. – P.21-26.
21. Handrick R., Reinhardt S., Schultheiss D. et al. Unraveling the function of the Rhodospirillum rubrum activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (hasing) // J 106 Bacteriol. — 2004. — Vol. 186. — P. 2466–2475.

22. Hidenori Satoh, Naoko Yoshie and Yoshio Inoue “Hydrolytic degradation of blends of poly(3-hydroxybutyrate) with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)” (1994) *Polymer* Volume 35, Number 2, 286-290
23. Hussein, M. Z. Nanocomposite-based controlled release formulation of an herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetate encapsulated in zinc–aluminium-layered double hydroxide / M. Z. Hussein, A. H. Yahaya, Z. Zainal and L. H. Kian // *Science and Technology of Advanced Materials*. – 2005. – V. 6. – P.956-962.
24. J. Mergaert, A. Wouters, C. Anderson and J. Swings, *Canadian Journal of Microbiology* – 1995 – V.41 – P.154.
25. J. Spevacek, J. Brus, T. Divers, Y. Grohens, Solid-state NMR study of biodegradable starch/polycaprolactone blends, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 1866–1875.
26. J. A. Ratto, P. J. Stenhouse, M. Auerbach, J. Mitchell, R. Farrell, Processing, performance and biodegradability of a thermoplastic aliphatic polyester/starch system, *Polymer* 40 (1999) 6777–6788.
27. A. Jarosiewicz, Controlled release NPK fertilizer encapsulated by polymeric membranes / A. Jarosiewicz, M. Tomaszewska // *J. Agric Food Chem.* – 2003. – V.51 – P.413-417.
28. K. E. Gonda, D. Jendrossek and H. P. Molitoris, *Hydrobiologia* – 2000 – V.1 – P.173.
29. Kalbermatten D. F., Pettersson J., Kingham P. J. et al. New fibrin conduit for peripheral nerve repair // *J. Reconstr. Microsurg.* — 2009. — Vol. 25 — P. 27– 33.
30. Kenar H., Kocabas A., Aydinli A., Hasirci V. Chemical and topographical modification of PHBV surface to promote osteoblast alignment and confinement // *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2008. — Vol. 85. — P.1001– 1010.
31. Liang, R. Controlled release NPK compound fertilizer with the function of water retention / R. Liang, M. Liu, L. Wu // *Reactive and Functional Polymers* – 2007. – V. 67. – P. 769-779.

32. S.-P. Lim, Degradation of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in tropical forest and mangrove soils / S.-P. Lim, S.-N. Gan and I.K.P. Tan // *Applied Biochemistry and Biotechnology* – 2005. – V. 126.
33. M. Borkenhagen, R. C. Stoll, P. Neuenschwander, U. W. Suter, P. Aebischer, In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel, *Biomaterials* 19 (1998) 2155–2165.
34. M. Kitano and Y. Yakabe *Biodegradable Plastics and Polymers*, Ed. Y. Doi and K. Fukuda, Elsevier, NY, USA: - 1994 – V.12 – P.217.
35. Martin, D. P. Polyhydroxyalkanoate compositions having controlled degradation rates / D.P. Martin, F.A. Skraly, S.F. Williams // PCT Patent application – 1999. – № WO 99/32536.
36. Mukai, K. Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium / K. Mukai, K. Yamada, Y. Doi // *Polym. Degrad. Stab.* – 1993 – V. 41. – P.85-91.
37. S.-M. Lai, C. K. Huang, H.-F. Shen, Preparation and properties of biodegradable poly (butylene succinate)/starch blends, *J. Appl. Polym. Sci.* 97 (2005) 257–264.
38. Sopena, F. Controlled release of the herbicide norflurazon into water from ethylcellulose. / F. Sopena, A. Cabrera, C. Maqueda, E. Morillo // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – V.53 (9). – P.3540–3547.
39. Verlinden R. A., Hill D. J., Kenward M.A. et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates // *J. Appl. Microbiol.* — 2007. — Vol. 102. — P. 1437–1449.
40. Volova T. G., Kiselev E. G., Vinogradova O. N., Nikolaeva E. D., Chistyakov A. A., Sukovatyi A. G., Shishatskaya E. I., 2014 год
41. Woudneh, M. B. Acidic herbicides in surface water of Lower Fraser Valley / M. B. Woudneh, M. Sekela, T. Tuominen, M. Gledhill // *Journal of Chromatography A.* – 2007. – V.1139. – P.121-129.

42. Wu, C.-S. Controlled release evaluation of bacterial fertilizer using polymer composites as matrix / C.-S. Wu // *Journal of Controlled Release* – 2008. – V.132. – P.42-48.
43. Wu, L. Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention / L. Wu, M. Liu, R. Liang // *Bioresource Technology* – 2008. – V.99. – P.547-554.
44. Y. Doi, K. Kasuya, H. Abe, N. Koyama, S. Ishiwatari, K. Takagi and Y. Yoshida, *Polymer Degradation and Stability* - 1996 – V.51 – P.281.
45. Y. Doi, Y. Kanesawa, N. Tanahashi and Y. Kumagai, *Polymer Degradation and Stability* - 1992 – V.36 – P.173.
46. Yoshiharu Doi, Youko Kanesawa, Masao Kunioka and Terumi Saito “Biodegradation of Microbial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxybutyrate)” (1990) *Macromolecules*, 23, 26-31.