

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  
« 21 » июня 2018 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Конструирование и оценка эффективности систем контролируемой  
доставки сельскохозяйственных препаратов различного действия

тема работы

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель

\_\_\_\_\_

подпись, дата

к.б.н., доц.

\_\_\_\_\_

должность, ученая степень

А.Н. Бояндин

инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Е.А. Казанцева

инициалы, фамилия

Рецензент

\_\_\_\_\_

подпись, дата

к.б.н., н.с.

\_\_\_\_\_

должность, ученая степень

В.В. Величко

инициалы, фамилия

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4#
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	6#
1.1 Характеристика биоразлагаемых полиэфиров .....	6#
1.2 Полигидроксиалканоаты, их свойства и применение.....	7#
1.2.1 Разнообразие ПГА.....	7#
1.2.2 Биосинтез ПГА .....	9#
1.2.3 Поли-3-гидроксибутират: структура и свойства .....	11#
1.3 Поликапролактон, его свойства .....	13#
1.3.1 Биодegradация поликапролактона.....	15#
1.3.2 Синтез поликапролактона .....	17#
1.4 Полилактид. Синтез, структура, свойства, области применения и биоразложение .....	19#
1.5 Общее представление о пестицидах .....	24#
1.5.1 Рекомендации по уменьшению степени химического загрязнения биосферы пестицидами .....	27#
1.6 Основные виды минеральных удобрений.....	29#
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32#
2.1 Объекты исследования .....	32#
2.2 Изготовление полимерных форм .....	34#
2.2.1 Изготовление форм с использованием полимерного матрикса из П(ЗГБ) и его композита с древесными опилками.....	34#
2.2.2 Изготовление депонированных форм азотного удобрения (нитрат аммония) с использованием полимерного матрикса из П(ЗГБ) и его композита с древесными опилками.....	35#
2.2.3 Получение биополимерных гранул методом формирования осажденного полимера .....	36#
2.2.4 Получение биополимерных гранул методом экструзии из расплава .....	36#
2.2.5 Изготовление депонированных форм с пестицидами (метрибузин) с использованием полимерного матрикса из ПКЛЮ <b>ошибка! Закладка не определена.</b> #	
2.3 Изучение биодegradации полимерных и композитных форм различного состава и структуры в модельной почве .....	36#
2.4 Оценка эффективности применения разработанных форм азотного удобрения в лабораторных экспериментах с модельными растениями .....	38#

2.4.1	Схема эксперимента удобрений в почве .....	38#
2.4.2	Измерение количества азота в почве .....	41#
2.4.3	Определение азота в ирригационной воде .....	42#
2.5	Оценка эффективности применения разработанных форм метрибузина пролонгированного действия .....	43#
2.5.1	Оценка выхода метрибузина из полимерных форм в воду . <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #	
2.5.2.	Схема эксперимента пестицидов в почве <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #	
2.5.3	Оценка выхода метрибузина из полимерных форм в почву <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #	
2.5.4	Оценка остаточного количества метрибузина в матриксах из ПКЛ .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
2.5.5	Определение метрибузина в почве методом газовой хроматографии .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #		
3.1	Биодеградация полимерных матриксов различного состава и структуры в модельной почве .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
3.2	Оценка эффективности применения разработанных форм азотного удобрения с пролонгированным выходом в лабораторном эксперименте с растениями.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
3.2.1	Биодеградация таблетированных форм с азотным удобрением в почве .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
3.2.2	Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в ирригационной воде.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
3.2.3	Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в почву .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
3.2.4	Оценка влияния внесенной аммиачной селитры, депонированной в полимерный матрикс, на рост модельных растений <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #	
3.3#	Оценка эффективности применения разработанных форм метрибузина пролонгированного действия в модельной почве .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
3.3.1	Оценка выхода метрибузина из полимерных форм в воду методом газожидкостной хроматографии .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #
3.3.2	Оценка разрушения депонированных форм метрибузина и выхода активного компонента в почву .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b> #

Заключение .....	44#
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	45#

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Интенсивные технологии ведения сельского хозяйства требуют применения огромного количества разнообразных химических веществ для борьбы с вредителями, сорняками и возбудителями болезней культивируемых видов, так как во всем мире больше половины потенциального урожая теряется из-за этого. При этом не более 10 % применяемых и вносимых в окружающую среду пестицидов достигает цели: основная масса этих веществ аккумулируется в биологических объектах, загрязняет почвы, водоемы, вызывает гибель полезных организмов и нарушает равновесие в природных экосистемах.

В связи с этим, новые направления исследований, ориентированные на снижение риска неконтролируемого распространения химических препаратов в биосфере, заключаются в использовании биоразрушаемых полимеров в качестве основы для депонирования и адресной доставки препаратов сельскохозяйственного назначения [1, 2]. Полимеры разрушаются в почве и других биологических средах под воздействием почвенной микрофлоры до безвредных для живой и неживой природы продуктов и обеспечивают постепенный и длительный выход препаратов в почву. Такие формы позволяют сократить объемы вносимых в почву препаратов, поддерживая их длительную и контролируемую доставку в течение вегетационного сезона, исключая резкие выбросы в окружающую среду. Ключевым моментом для создания препаратов такого типа является наличие адекватного материала, обладающего специальными свойствами, среди

которых обязательными являются: экологическая совместимость с окружающей средой и глобальными биосферными круговоротными циклами; разрушаемость; безопасность для живой и неживой природы; длительная сохраняемость в природной среде и контролируемая деструкция с образованием нетоксичных продуктов; химическая совместимость с препаратами; возможность переработки доступными способами, совместимыми с технологиями изготовления пестицидов и удобрений.

Из полиэфиров, способных к биосовместимости и к биоразложению, наряду с полилактидами и полигликолидами, важное значение имеют полигидроксиалканоаты (ПГА), получаемые микробным биосинтезом, а также поли-ε-капролактон (ПКЛ) – относительно дешевый и биоразрушаемый полиэфир с низкой температурой плавления (57-60°C).

**Цель работы** заключалась в разработке способов конструирования систем контролируемой доставки биологически активных веществ (удобрений и пестицидов) сельскохозяйственного назначения на основе биоразрушаемых полимеров и оценке применимости полученных модельных форм.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **научные задачи**:

1. Получить биополимерные конструкции различных типов, различающиеся составом полимеров и способами их переработки, и исследовать закономерности их биоразрушения в модельной почве в лабораторных условиях;

2. Разработать и получить таблетированные формы удобрений длительного действия на основе аммиачной селитры с использованием в качестве биоразлагаемого носителя поли-3-гидроксibuтирата и его композита с древесными опилками, в том числе с дополнительным пленочным покрытием из поли-3-гидроксibuтирата;

3. Оценить эффективность разработанных таблетированных форм азотного удобрения на рост модельного растения – пшеницы;
4. Разработать и получить формы гербицида метрибузина пролонгированного действия методом совместной экструзии гербицида с поликапролактоном в качестве биоразлагаемого носителя;
5. Оценить характеристики высвобождения метрибузина из разработанных форм в модельной почве.

## **ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

### **1.1 Характеристика биоразлагаемых полиэфиров**

Мировая промышленность в настоящее время это огромная энергоемкая система, которая потребляет не возобновляемые ресурсы, миллионами тонн вырабатывает побочные продукты, которые необходимо утилизировать или разрабатывать сопутствующие производства для их превращения в востребованный продукт. Объем производства пластиков за последние семь лет вырос с 140 до 300 млн. тонн в год [3].

В передовых странах объем полимерных материалов подвергаемых вторичной переработке достигает 20%, а значит более 80% производимых полимерных материалов, через несколько месяцев переходит в разряд отходов, устойчивых к воздействию природной среды. В сложившейся ситуации, биополимеры представляются истинными «материалами будущего», вестниками нового времени, шагом к новому миру, где человечество не паразитирует на планете, а существует в гармонии с природой. Биополимеры сходные по свойствам с традиционными полимерами и вместе с тем подверженные биодegradации, не будут десятилетиями лежать на свалках, выделяя токсичные продукты распада.

Многие из этих полимеров встречаются в природе в составе живых организмов или могут быть получены синтетическим путем из возобновляемого сырья.

Существует несколько основных направлений развития технологии биополимеров. В первую очередь, это упаковочные материалы. Второе направление развития биополимеров – получение биосовместимых и биodeградируемых материалов для новейших медицинских технологий.

Природные полимеры, помимо высокой степени биосовместимости с организмом, являются высокоэффективными биостимуляторами, то есть активируют защитные механизмы организма. На их основе разрабатываются такие изделия как, системы контролируемого высвобождения лекарственных соединений, шовные нити, эндопротезы, раневые повязки, матриксы для тканевой инженерии и т. д. [3]. Эти изделия находят применение в хирургии, косметологии, травматологии, стоматологии, онкологии и во многих других отраслях медицины. Полимеры этого типа используют и в фармакологии для создания лекарств пролонгированного действия. С каждым годом ассортимент таких изделий все более расширяется. Область применения биodeградируемых материалов определяет направление разработок полимеров с нужным комплексом свойств [4].

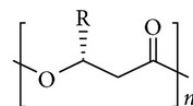
Основные полиэфиры, которые нашли широкое применение в медицине: полигликолиевая кислота или полигликоolid (ПГ), полимолочная кислота или полилактид (ПЛ), поли-ε-капролактон (ПКЛ), полипарадиоксанон, полигидроксибутират, полигидроксиивалериат и другие.

## **1.2 Полигидроксиалканоаты, их свойства и применение**

### **1.2.1 Разнообразие ПГА**

Среди биоразлагаемых полимеров в настоящее время растет интерес к группе биополиэфиров, известных как полигидроксиалканоаты (ПГА) [5].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот, которые синтезируются прокариотами в качестве депо углерода и энергии, как правило, при условии ограничения питательных элементов, но при избытке источника углерода. Общая структура ПГА показана на рисунке 1.



Poly(3-hydroxyalkanoates) [PHA]

R group	Poly(3-hydroxyalkanoates)	PHA
-CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxyvalerate)	PHV
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoate)	PHHex
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxyoctanoate)	PHO
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxydecanoate)	PHD
-CH <sub>2</sub> -	Poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate)	PHPV

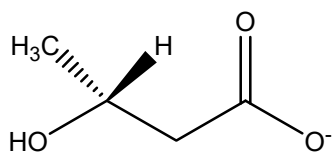
Рисунок 1 - Общая структура полигидроксиалканоатов (ПГА), а также примеры их структурных производных

Исследования показали, что существует около 150 типов мономеров составляющих ПГА и эти различные типы можно разделить на «естественные» и «искусственные». Первые являются естественными накоплениями микроорганизмов, вторые продуцируются микроорганизмами в лаборатории, при различных условиях питания.

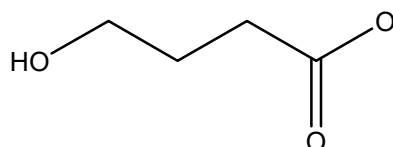
ПГА играет большую роль в создании заменителей химически синтезированных полимеров в связи с их механическими свойствами, аналогичными полипропилену, и характеризуются полным биоразложением в природной среде. В соответствии с количеством атомов углерода, составляющих мономерные единицы, бактериальные ПГА могут быть подразделены на три группы:

1. ПГА с короткой цепью, состоящая из 3-5 атомов углерода;
2. ПГА со средней длиной цепи, состоящая из 6 - 14 атомов углерода;
3. длинноцепочечные ПГА [6].

Физические свойства ПГА зависят от их соотношения мономерных единиц. Каждый тип ПГА обычно состоит из 1000-10000 мономеров (рис.2).

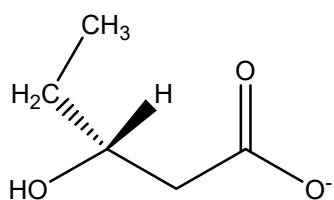


3-гидроксibuтират

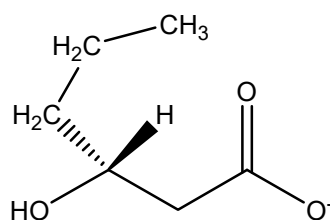


4-гидроксibuтират





3-гидроксивалерат



3-гидроксигексаноат

Рисунок 2 - Структурные формулы основных мономеров, составляющие короткоцепочечные ПГА

ПГА полимеры сохраняются в бактериальных клетках в виде гранул. Эти гранулированные частицы состоят из полиэфирных, белков и липидов. Состав был впервые исследованной Грибель в 1968 для ПГБ гранул *Bacillus megaterium*, которые состоят из 97,7% полиэфира, 1,87% белков, а также 0,46% липидов или фосфолипидов [7].

### 1.2.2 Биосинтез ПГА

ПГА синтезируют разновидности грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., и *Methylobacterium* sp., а также более 300 различных микроорганизмов. Как известно, они синтезируют и накапливают ПГА внутриклеточно. Эти виды микробов несут метаболическую способность biosynthesize молекул ПГА и аккумулируют их в цитоплазме в качестве источников углерода и энергии в форме гранул под питательными веществами ограничение условий с избытком углерода [8, 9].

Рекомбинация генома кишечной палочки (*Escherichia coli*), посредством введения генов традиционного продуцента ПГБ *Ralstonia eutropha* (по другим классификациям – *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha*, *Cupriavidus eutrophus*, *Cupriavidus necator*) дала возможность получения сверхвысокомолекулярного ПГБ [10]. Большинство классических штаммов кишечной палочки утилизируют глюкозу в процессе синтеза ПГБ, а к переработке сахарозы не способны. Однако, сахароза имеет ряд преимуществ экономических и экологических. Путем удаления гена, отвечающего за кодировку белка, подавляющего экспрессию генов

утилизации сахарозы, был создан трансгенный штамм *Escherichia coli*, способный синтезировать ПГБ из сахарозы на 30% более эффективно, чем из глюкозы. Это дает возможность использования сахарозы в качестве промышленного прекурсора в процесс биосинтеза полигидроксibuтирата [11].

В статье [12] представлены исследования, основанные на использовании в качестве источника углерода смеси отходов молочного производства, рисовых отрубей и морской воды. Установлено оптимальное сочетание компонентов смеси, а также уровень кислотности (pH=9), способствующий процессу синтеза. Максимальный выход ПГБ составил 6,37г/л [12].

А. Daneshi и соавторами предложена технология синтеза ПГБ, с использованием в качестве питательной среды кукурузного сиропа, который является побочным продуктом производства крахмала. Состав реакционной смеси был рассчитан методом математического моделирования. Максимальная производительность (0,17 г/л\*ч) была спрогнозирована для смеси с соотношением сироп/сульфат аммония/дигидрофосфаты – 50/0,078/1. Экспериментальные данные подтвердили расчетную модель [13].

Оптимизация условий культивации микробиологических ПГА является следующим шагом к производству в промышленном масштабе, то есть исследование влияния внешних факторов, таких как температура, аэрация, и т.д.

Интересные результаты представлены в статьях [14]. Исследования проводились с использованием штамма *Cupriavidus Necator*. В состав питательной смеси были введены компоненты, создающие стрессовые условия функционирования клеток: введены этанол в количество 0,5% и перекись водорода. Перекись вводили в две стадии: до начала культивирования – в количестве 0,5 моль/л и через 60 часов - 5 моль/л. Это привело к росту ферментативной активности и, как следствие, эффективность синтеза увеличилась на 30% по сравнению с контрольным

процессом. Молекулярная масса ПГБ, полученного в условиях стресса, была значительно выше по сравнению с контрольными процессами культивирования. Установлена зависимость молекулярной массы от концентрации факторов стресса [14].

В работе [15] отражены результаты исследования влияния интенсивности аэрации на процесс синтеза ПГБ. В качестве продуцента использовался штамм кишечной палочки, источником углерода служили глицерин и глюкоза. Глюкоза является классическим субстратом для микробиологического ПГБ, глицерин – прекурсор сравнительно новый, и оптимизация технологии синтеза ПГБ на его основе – очень важная задача. Установлено, что при низкой интенсивности перемешивания, глицерин стимулирует формирование ПГБ, а вот для глюкозы наблюдается обратная ситуация. Максимальная эффективность продуцирования в среде глицерина была достигнута при 125 оборотах в минуту, за 24 ч содержание ПГБ составило 30,1%, относительная молекулярная масса 1,9 МДА, это близкой к ПГБ синтезированному с использованием глюкозы [15].

### 1.2.3 Поли-3-гидроксibuтират: структура и свойства

Первым среди выделенных и наиболее полно к настоящему моменту охарактеризованным полигидроксиалканоатом является поли-3-гидроксibuтират (П(3ГБ)) (рис. 3).

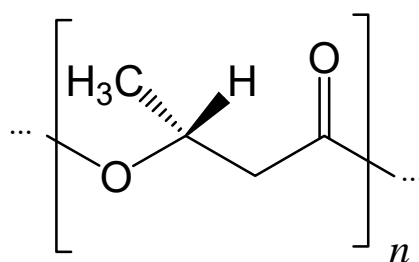


Рисунок 3 - Структурная формула поли-3-гидроксibuтирата

Основные свойства П(3ГБ) представлены в таблице 1 [16].

Таблица 1 - Свойства полигидроксibuтирата

Параметр	Значение
----------	----------

Температура стеклования, °С	15
Температура плавления, °С	175
Растворители	метиленхлорид, хлороформ, дихлорметан, трихлорэтилен, этиленкарбонат, пропиленкарбонат
Степень кристалличности, %	80

П(ЗГБ) представляет собой полукристаллический полимер, характеризующийся полиморфной кристаллизацией, который способен кристаллизоваться в двух формах,  $\alpha$  и  $\beta$ . Следует подчеркнуть, что процесс кристаллизации влияет на тепловые и механические свойства, а также способность к биологическому разложению биополимеров.

Термопластичные и кристаллизационные свойства П(ЗГБ) в значительной степени зависят от его молекулярной массы. Поли-3-гидроксибутират низкомолекулярной массы ( $<1 \times 10^3$  кДа) характеризуются хрупкостью и ранней термической деструкции, вблизи их температуры плавления (выше  $180^\circ\text{C}$ ) [17]. Такое поведение было объяснено в результате его  $\alpha$ -формы кристаллизации. Тем не менее, увеличение молекулярной массы П(ЗГБ) улучшает механические свойства пленок и волокон, способствуя  $\beta$ -формы кристаллизации [18].

Классическим методом получения полигидроксиалканоатов, и П(ЗГБ) в частности, является синтез полимера микроорганизмами-продуцентами. П(ЗГБ) служит источником питательных веществ [4], а также формирует защитную пленку и способствует сохранению жизнеспособности бактерий в условиях низких температур [19].

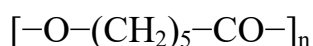
С момента своего открытия, П(ЗГБ) был использован в качестве замены для сыпучих пластиков, таких как полиэтилен и полипропилен, в химической промышленности. Совсем недавно, на основе его свойств биосовместимости и биоразлагаемости, новые привлекательные приложения для П(ЗГБ) были предложены в медицинских и фармацевтических областях,

где химический состав и чистота продукта являются критическими [20]. В области медицины П(ЗГБ) стали использовать в контролируемой доставке лекарств, восстановление тканей и питательных / терапевтических применений [21].

Во всех этих приложениях, молекулярная масса П(ЗГБ) является очень важной особенностью для рассмотрения, так как это определяет механические свойства полимера, и, в свою очередь, конечные приложения. Рекомбинация генома кишечной палочки (*Escherichia coli*), посредством введения генов традиционного продуцента ПГБ *Ralstonia eutropha* дала возможность получения сверхвысокомолекулярного ПГБ [10]. С биотехнологической точки зрения, манипуляции с молекулярной массой П(ЗГБ) посредством использования новых штаммов и манипулировании условий культивирования является удобным методом, который может значительно улучшить свойства П(ЗГБ), а так же расширение возможностей применения этого полимера, особенно в области медицины [22].

### 1.3 Поликапролактон, его свойства

Другим важным биоразлагаемым полимером является поликапролактон (ПКЛ). Это алифатический сложный полиэфир линейной структуры, производящийся из нефтехимических продуктов.



Впервые ПКЛ был синтезирован группой ученых под руководством Карозерса в 30-х годах прошлого века [23]. Коммерческую целесообразность он приобрел благодаря таким свойствам как биосовместимость и биodeградируемость [24].

Основные свойства ПКЛ приведены в таблице 2 [25]:

Таблица 2 - Свойства поликапролактона

Параметр	Значение
Температура стеклования, °С	-60
Температура плавления, °С	57

Растворители	Бензол, толуол, метиленхлорид, хлороформ, CCl <sub>4</sub> , тетрагидрофуран, циклогексанон, метилэтилкетон, диметилформамид, ацетон, этилацетат
Степень кристалличности, %	60-80

Растворимость в большом количестве доступных растворителей и низкая температура плавления, совместимость с некоторыми полимерами, наряду с биосовместимостью и биodeградируемостью, создали предпосылки для его применения в медицинских областях [26-28]. В 70-х - 80-х годах прошлого столетия, во времена «бума биodeградируемых полимеров», ПКЛ широко применялся для разработки систем с контролируемым высвобождением лекарственных веществ. Кинетика деструкции, а также механические свойства поликапролактона сделали его перспективным для получения эндопротезов. Путем добавления функциональных групп возможно регулировать такие важные для культивации клеток свойства как гидрофильность, адгезия или биосовместимость. Однако, в последние 20 лет, внимание, направленное на поликапролактон постепенно угасло, в связи с тем, что в заместительной хирургии больший интерес вызвали исследования в области применения металлических изделий, а в области лекарственных систем пролонгированного действия внимание было сосредоточено на быстро разлагаемых полилактиде и полигликолиде [23].

Возобновление интереса к ПКЛ произошло вместе с появлением совершенно новой области биомедицинской технологии – тканевой инженерии. Благодаря реологическим и вязкостным свойствам технология получения матриц различного назначения из поликапролактона оказалась сравнительно простой, что позволило ему превзойти многие деградируемые полимеры.

Как уже отмечено выше, интерес к данному полимеру в медицинской сфере обусловлен, прежде всего, тем, что ПКЛ в определенные (более

длительные, чем полилактид и полигликолид) сроки может разлагаться на безопасные для человеческого организма компоненты.

Способность ПКЛ образовывать прочные и эластичные нити, волокна и пленки связана с большими размерами и характерным линейным цепным строением молекул, что, в свою очередь, позволяет создавать конструкции пластичные и механически прочные одновременно [23]. Поликапролактон используют в смеси с такими полимерами, как целлюлоза, пропионат и бутират ацетата целлюлозы, полилактид и сополимер лактида и гликолида. Смеси ПКЛ с другими полимерами используются для снижения хрупкости, увеличению окрашиваемости, гидрофобности, адгезии и для регуляции скорости высвобождения лекарственных веществ [26]. Установлено, что сополимеры ПКЛ содержащие такие элементарные звенья, как этиленоксид, винилхлорид, этиленоксид, стирол, уретановые звенья, тетрагидрофуран (ТГФ), диликолид, дилактид, валерлактон, стирол, метилметакрилат и винилацетат, значительно увеличивают совместимость в полимерных смесях [27].

Полимер обладает хорошими адгезивными свойствами по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам и низкой клеточной токсичностью [23]. Все это лишний раз подтверждает, что продукты деградации поликапролактона оказывают минимальное токсическое воздействие на ткани организма [23].

### **1.3.1 Биodeградация поликапролактона**

ПКЛ разлагается в два этапа. Сначала постепенно уменьшается молекулярная масса поликапролактона без деформации тканеинженерной конструкции.

По мере уменьшения молекулярной массы ПКЛ начинает расщепляться на фрагменты, затем следует абсорбция и выведение. В естественных условиях деградация ПКЛ происходит главным образом гидролитическим процессом в течение 2—3 лет с образованием таких продуктов деградации,

как вода, углекислый газ и капроновая кислота. Причем чем ниже молекулярный вес поликапролактона, тем короче сроки деградации. В условиях *in vivo* волокна поликапролактона деградируют, создавая при этом хорошую основу для роста клеток, которые могут сформировать ткань [29].

Когда полимер считается биodeградируемым, необходимо иметь в виду, что это совсем не означает, что он является биорезорбируемым, равно как и отвод продуктов деградации, не означает, что они выводятся из организма.

Биорезорбция – это понятие, которое подразумевает полную ликвидацию инородного материала, а также низкомолекулярных продуктов его разложения, и что немаловажно – отсутствие остаточных побочных эффектов [30].

Поликапролактон деградирует под воздействием таких живых организмов как бактерии и грибы, однако, ПКЛ не разрушается в среде живого организма, ввиду отсутствия соответствующих ферментов [31]. Это не означает, что ПКЛ не является биорезорбируемым, а скорее говорит о более продолжительном процессе, который протекает по механизму гидролитической деструкции.

Известно, что процесс гидролиза может протекать на поверхности или в массе полимера вследствие диффузии молекул воды. Поверхностный гидролиз или эрозия подразумевает деструкцию полимерных цепей только на поверхности образца [32]. Этот процесс возникает, когда скорость деструкции цепи и диффузии олигомеров и мономеров в окружающую среду выше, чем скорость диффузии воды внутрь образца. В этом случае наблюдается истончение и потеря веса образца, в то время как молекулярный вес полимера внутри образца остается неизменным. Преимущество данного механизма, - предсказуемость процесса, и как следствие возможность управления скоростью высвобождения лекарственных компонентов [33].



Срок деструкции изделия из чистого поликапролактона от 2 до 4 лет, в зависимости от молекулярной массы полимера, формы и массы образца [34-36].

Чен и др. [37] изучали процесс разложения микрочастиц и пленок из ПКЛ *in vitro* в среде буферного раствора pH=7,4 при температуре 37°C. Существенного влияния формы образца на кинетику деструкции выявлено не было, что позволяет предположить, что в ходе процесса преобладает равномерный гидролиз в массе полимера [37].

Персенали и др. представили данные о двухстадийном процессе разложения полимерной цепи ПКЛ [38], на первом этапе наблюдалась реакция разрыва цепи по эфирным группам по реакции пиролиза, на втором этапе установлено образование циклического мономера капролактона, в результате расширенной реакции деполимеризации. Шивалингам и др. исследовали термическую деструкцию ПКЛ в растворе и сухом полимере [39, 40]. Установлено, что в растворе деполимеризация протекает путем случайного разрыва цепи, а в сухом виде наблюдается отщепление концевых звеньев.

Большее сроки биодegradации поликапролактона, в сравнении с полилактидом и полигликолидом, делают его перспективным для разработки изделий длительного (от года) существования в организме и длительными сроками биодegradации.

### **1.3.2 Синтез поликапролактона**

Поликапролактон является синтетическим полиэфиром. Существуют два основных пути получения ПКЛ, это поликонденсация 6-гидроксигексановой кислоты и полимеризация с раскрытием цикла капролактона. Реакция поликонденсации проводится под вакуумом, который создается для удаления воды, выделяющейся в ходе реакции, что позволяет сместить равновесие в сторону получения полимера. Реакция проходит в отсутствие катализатора при возрастающей температуре от 80 до 150 °C, и

завершается за 6 часов. Также в литературе описана реакция поликонденсации в присутствии липазы различных грибов в вакууме. Однако этот метод имеет ряд недостатков и не так распространен, как полимеризация капролактона [41].

История получения ПКЛ по методу полимеризации циклического  $\epsilon$ -капролактона начинается в тридцатых годах прошлого столетия [42].

В зависимости от катализатора существуют четыре основных механизма полимеризации циклов: анионный, катионный, мономер-активация и координация-вставка.

Анионный механизм подразумевает образование анионных комплексов, которые раскрываются. Основным недостатком данного метода является значительная внутримолекулярная переэтерификация на более поздних стадиях полимеризации. Это приводит к снижению молекулярной массы полимера, остановке полимеризации или получению циклических полимеров [43].

Катионный механизм заключается в формировании радикала катионного вида, который в последствии атакует кислород карбоксильной группы мономера посредством реакции нуклеофильного бимолекулярного замещения.

Активация мономера, предполагает активацию молекулы мономера с помощью катализатора и последующим присоединением активированного мономера к концу полимерной цепи.

Координация-вставка – наиболее распространенный вид полимеризации циклов, на самом деле является частным случаем анионного механизма. Процесс подразумевает ориентацию мономера и катализатора с последующим образованием связи металл-кислород между катализатором и молекулой мономера. Дальнейший рост цепи происходит за счет присоединения к металлу связи С-О.

В процессе полимеризации, благодаря присутствию катализатора может возникнуть реакция переэтерификации, которая бывает, как

межмолекулярная, так и внутримолекулярная. Как правило, эти реакции начинаются на поздних стадиях реакции полимеризации в условиях высоких температур. Это приводит к росту полидисперсности и потери контроля над процессом [43].

Конечная молекулярная масса полимера, молекулярно-массовое распределение и наличие функциональных групп могут варьироваться в зависимости от механизма полимеризации. Как правило, ПКЛ получают с молекулярной массой от 3 000 до 80 000 [44].

#### **1.4 Полилактид. Синтез, структура, свойства, области применения и биоразложение**

Одним из самых перспективных на сегодняшний день биополимеров является полилактид (ПЛ) [45]. Полилактид, полимолочной кислота, поли(3,6-диметил-1,4-диоксан-2,5-дион) - это биоразлагаемый, биосовместимый, термопластичный, компостируемый, алифатический сложный полиэфир, мономером для которого является молочная кислота. Для производства полилактида используется возобновляемое растительное сырье (кукуруза, картофель, сахарный тростник, маниок, рис и др.) [46], что делает его многообещающей альтернативной полимерам, получаем из нефти.

Впервые низкомолекулярный полилактид получил американский химик Wallace Carothers в 1932 году путем нагревания молочной кислоты под вакуумом и отделения конденсируемой воды [47]. Высокомолекулярный полилактид был синтезирован в 1954 году немецкими учеными V. J. Kleine и H. N. Kleine [48].

В настоящее время существуют два способа получения молочной кислоты (2-гидроксипропионовой) кислоты – мономера полилактида: химический синтез и ферментативное брожение. Сам полилактид получают в результате таких химических реакций как поликонденсация молочной кислоты (продуктом реакции является низкомолекулярный полилактид, так

как протекание реакции ограничено выделением побочного продукта – воды, отвод которой затруднен) и полимеризация лактида. Лактид – это димер молочной кислоты, который получается в результате реакции деполимеризации низкомолекулярного полилактида. В ходе реакции цепной полимеризации лактида с раскрытием цикла происходит образование высокомолекулярного полилактида [49]. На рисунке 4 представлена схема стадий производства полилактида.

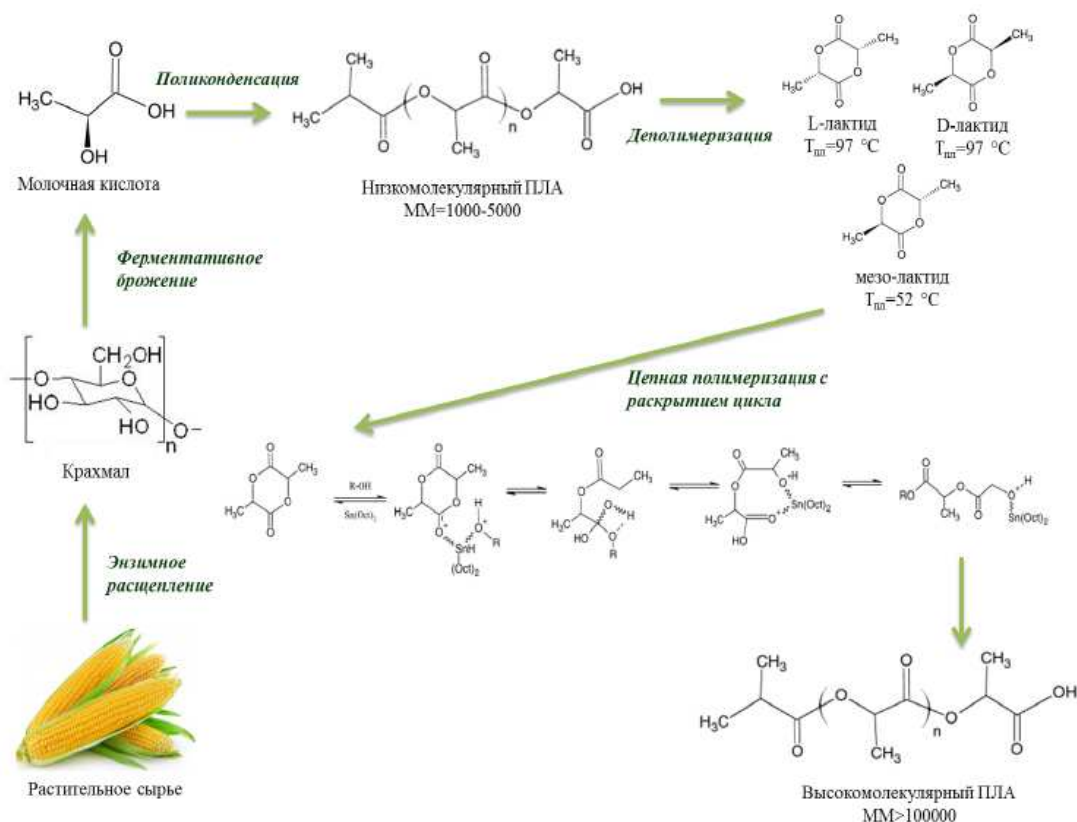


Рисунок 4 - Стадии производства полилактида [49]

Благодаря хиральной природе молочной кислоты существуют L- и D-стереоизомеры лактида, которые являются зеркальным отображением друг друга. Свойства получаемого полилактида будут зависеть от относительного содержания этих изомеров в полимере [50]. Полилактид из 100 % L-лактида (L - ПЛ) имеет высокую степень стереорегулярности, что придает ему кристалличность. L - ПЛ обычно имеет следующие характеристики:  $T_{ст} = 54-58^\circ\text{C}$ ,  $T_{пл} = 170-180^\circ\text{C}$ . Использование при полимеризации смеси D- и L-лактидов позволяет получать аморфный полилактид (L, D – ПЛ), температура

стеклования которого составляет 50-54°C. Температуру плавления L - ПЛ можно увеличить на 40-50°C, а температуру деформационной теплостойкости с 60 до 190°C путем физического смешения полимера с D – ПЛ. L – ПЛ и D –ПЛ образуют высокорегулярный стереокомплекс с высокой степенью кристалличности [51]. D. Bigg в своей работе [52] показал зависимости температуры стеклования и плавления от соотношения L- и D-изомеров в сополимере, которые представлены в Таблице 3.

Таблица 3 - Температуры перехода в сополимерах ПЛ

Соотношение сополимеров (L-/D,L) ПЛ	T <sub>ст</sub> , °C	T <sub>пл</sub> , °C
100/0	63	178
95/5	59	164
90/10	56	150
85/15	56	140
80/20	56	125

Температура перехода в полимере является очень важным параметром при переработке его в готовые изделия. Полилактид можно перерабатывать практически всеми методами, применяемыми для промышленных крупнотоннажных полимеров (экструзия, литье под давлением, пневмоформование, термоформование, вытягивание волокна, полив из раствора) [53]. Определенные сложности возникают при экструзионном пневмоформования и получении пленок ручным способом [54].

Изделия из полилактида отличаются хорошим внешним видом, прозрачностью, высокой механической прочностью, хорошими барьерными свойствами. Сравнение характеристик полилактида с промышленнопроизводимыми полимерами показало, что он не уступает, а наоборот превосходит их по многим показателям [55].

Полилактид нашел применение во многих отраслях промышленности. В упаковке [56] полилактид применяется в виде упаковочных пленок для пищевых продуктов, из него изготавливается термоусадочная упаковка,

чайные пакетики, одноразовая посуда и контейнеры для еды, цветочные горшки, мешки, пакеты. Средство женской гигиены и подгузники, автомобильные коврики [57], корпуса ноутбуков [58], телефонов [59], пультов дистанционного управления [60], музыкальных плееров [61], и другой мелкой бытовой техники - вот ещё несколько примеров использования полилактида. Активно применяются полилактидные нити в качестве материала для 3D печати. Ведутся разработки по использованию полилактида в очистке сточных вод [62].

Использование полилактида в медицине было начато ещё в 1966 году [63]. Полимер, обладая биосовместимостью и биоразлагаемостью, активно применяется в качестве костных имплантов [64], штифтов [65], пластин [66], сеток [67], и шовного материала [68]. Применения полилактида преимущественно в ортопедии связано с достаточно длительным сроком разложения полимера в теле (от 6 месяцев до 2 лет). Это позволяет постепенно переносить нагрузку на выздоравливающую область.

Существуют различные механизмы разложения полилактида: гидролитический [69], окислительный [70], биологический [71], термический [72], фото- и радиационный [73]. Особое внимание в литературе уделяется именно биоразложению полилактида. Согласно определениям, приведенным в стандарте ASTM D 6400-04, биоразлагаемым называется полимер, разлагающийся под действием природных микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и водоросли.

В зависимости от сферы применения изделий из ПЛА существуют различные методы их биологической деструкции после использования *in vivo* (в организме), характерный для изделий медицинского назначения, и разложение в условиях окружающей среды. Биологическое разрушение полилактида осуществляется за счет протекания процесса гидролиза особыми ферментами – гидролазами эфиров, выделяемыми микроорганизмами. В результате, нерастворимый в воде полимер распадается на растворимые составляющие (органические кислоты-

олигомеры), которые в процессе метаболизма превращаются в CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O и биомассу [74].

На механизм биоразложения полилактида оказывают влияние как физические, так и химические свойства полимера. Это состояние поверхности (площадь поверхности, гидрофильные и гидрофобные свойства), молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение, надмолекулярная структура и степень кристалличности. Степень кристалличности является одним из основных факторов, влияющим на биоразлагаемость, так как энзимы в основном расщепляют аморфные области полимера. Молекулы полимера в аморфных областях упакованы менее плотно, что делает их более подверженными разложению. Скорость биоразложения с ростом степени кристалличности полимера уменьшается [75].

Большое влияние на скорость разложения оказывают также условия окружающей среды. Так, при компостировании при 55–70°C и 80% относительной влажности процесс разрушения полимера протекает за один месяц. Однако при более низких температурах и влажности воздуха, данный процесс затормаживается, что позволяет изделиям из полилактида выполнять свое функциональное назначение. В Таблице 4 приведены периоды разрушения при различных температурах и условиях влажности воздуха.

Таблица 4 - Время разрушения полилактидов в зависимости от условий окружающей среды

Температура, °С	Относительная влажность воздуха, %	Начальная фрагментация спустя	Полное разрушение спустя
4	100	5,3 года	10,2 года
25	20	2,5 года	4,8 года
25	80	2 года	3,1 год
40	80	5,1 месяц	10 месяцев
60	20	1 месяц	2,5 месяца
60	80	15 дней	2 месяца

Так, Kale с соавторами [71] изучали биоразлагаемость полилактидных бутылок в компосте согласно методикам ASTM D 5338 и ISO 14885-1. ПЛ бутылки для воды помещали в компост, где поддерживалась постоянная температура ( $65\pm 5^\circ\text{C}$ ), влажность ( $63\pm 5\%$ ) и pH ( $8,5\pm 0,5$ ). На рисунке 5 приведены изображения разложения ПЛ бутылки с течением времени.

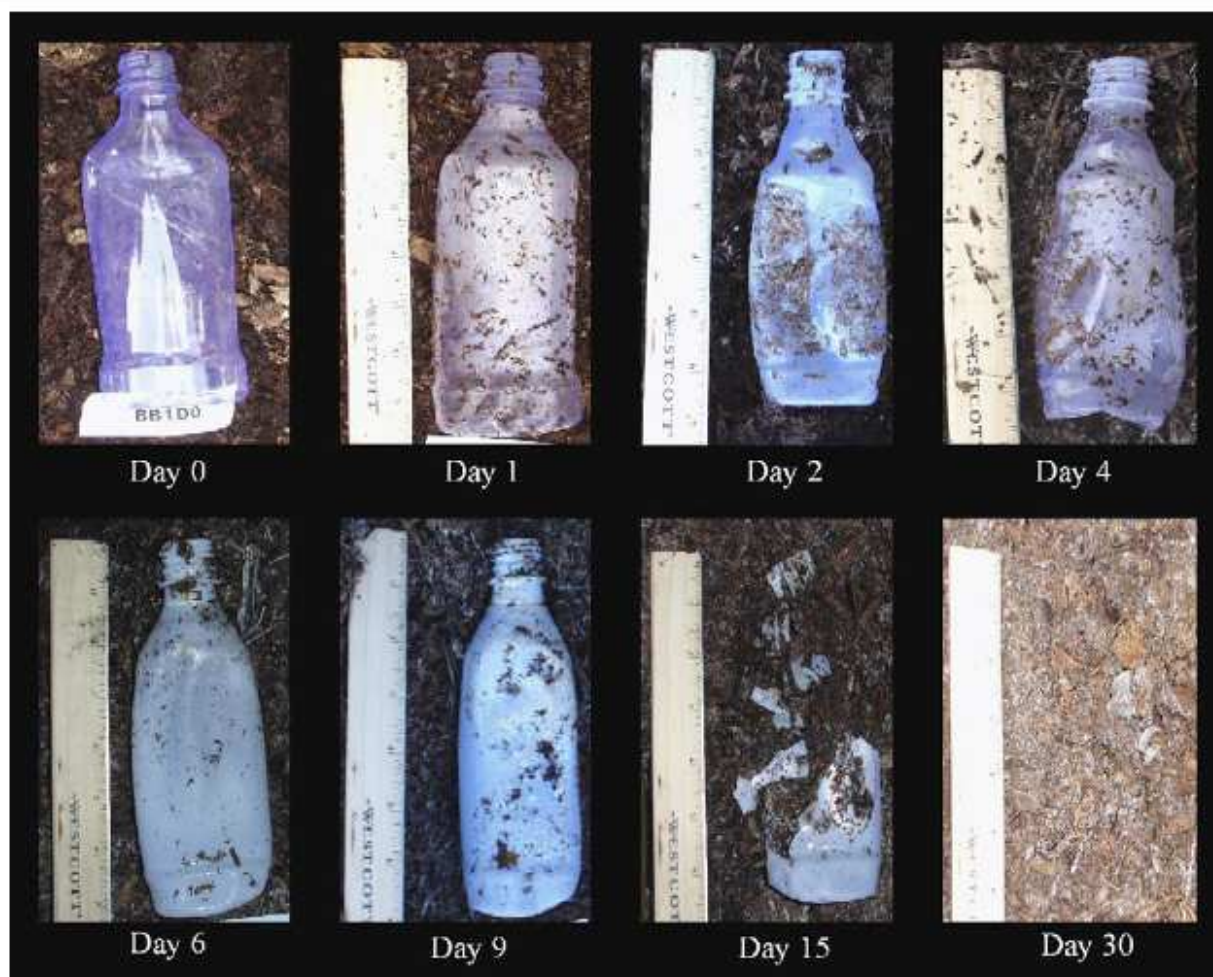


Рисунок 5 - Биоразложение полилактида в компосте [71]

Таким образом, полилактид – это многообещающий материал, который может служить альтернативой полимерам, получаемым из нефтехимического сырья. Он легок в переработке, обладает хорошими физико-механическими и барьерными свойствами, получается из возобновляемого растительного сырья и при определенных условиях может разлагаться за 1 месяц. При его производстве в атмосферу выбрасывается меньшее количество углекислого газа, а, значит, наносится меньший вред экосистеме планеты.



## 1.5 Общее представление о пестицидах

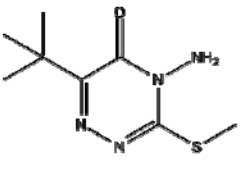
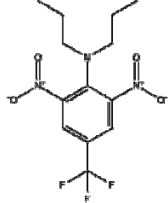
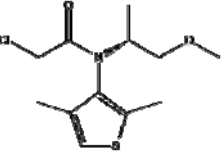
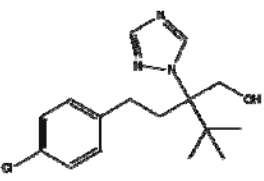
Слово «пестициды» с латинского переводится как «*pestis*» - зараза и «*cido*» - убиваю. Пестициды, или по-другому их ещё называют ядохимикаты, химические вещества, применяемые с целью повышения урожайности сельскохозяйственных культур, а также для борьбы с различного рода вредителями продуктов. Установлено, что ежегодно теряется не менее 1/3 урожая (зерна) из-за различного рода вредных насекомых, растений, фитопатогенных грибов. Огромный вред сельскому хозяйству причиняют грызуны. Большой ущерб наносит человеку вредные насекомые и клещи-переносчики заразных болезней (малярия, энцефалит, сыпной и возвратный тиф и др.). Отсюда понятно огромное значение для сельского хозяйства, промышленности и здравоохранения борьбы с вредными организмами. Химия дала народному хозяйству достаточно много сильных средств против вредных для сельскохозяйственной продукции насекомых, бактерий, грибов. Все эти средства и объединяются под общим названием «пестициды» [76].

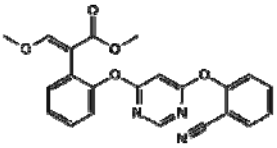
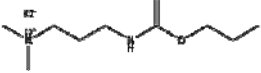
В настоящее время имеется около 10 тысяч различных пестицидов, которые классифицируются в соответствии с их назначением в следующие категории:

- 1 – инсектициды (применяются для уничтожения насекомых);
- 2 – гербициды (применяются для уничтожения сорняков или других нежелательных растений);
- 3 – фунгициды (токсичны по отношению к грибковым организмам и применяются для защиты растений от болезней);
- 4 – зооциды (применяются для борьбы с грызунами);
- 5 – дефолианты (для удаления листьев);
- 6 – дефлоранты (для удаления цветков).

В таблице 5 представлены некоторые виды фунгицидов и гербицидов с их структурной формулой и основными характеристиками.

Таблица 5 - Характеристики пестицидов

Гербициды:	Группа препаратов	Структурная формула	Основные характеристики
метрибузин	триазины [4-амино-6-трет-бутил-3-метилтио-1,2,4-триазин-5(4Н)-он]		Молекулярная масса 214,3; Температура плавления 125-126°C; Температура кипения 132°C; Растворимость (г/л) при 20 °С: вода - 1,05; гексан - 1,0; толуол - 87; этанол - 190; дихлорметан - 340; метанол - 450; ацетон - 820; этилацетат - более 600. Температура плавления: 126,2°C; Давление паров при 20°C < 10 <sup>-5</sup> мбар.
трифлуралин	Динитроанилины [альфа,альфа,альфа-трифтор-2,6-динитро-N,N-дипропил-пара-толуидин]		Молекулярная масса 335,28; Температура плавления 48,5-49°C; Температура кипения 96-97°C при 0,18 мм рт.ст.; Давление паров 1,99•10 <sup>-4</sup> ммрт.ст. при 29,5°C, 13,7•10 <sup>-2</sup> Па при 25°C, 6,1 мПа при 25°C; Растворимость в воде 1 мг/л при 27°C; 0,221 г/л (рН = 7, 27°C).
диметенамид-Р	Хлорацетанилиды [S-изомер диметенамида рацемического (RS)-2-хлор-N-(2,4-диметил-3-тиенил)-N-(2-метокси-1-метилэтил)ацетамид а]		Молекулярная масса 275,8; Температура кипения 127°C (при 26,7 Па) Растворимость в воде 1,2 г/дм <sup>3</sup> ; Плотность при 25°C 1,187; Давление паров 36,7 мПа (25°C); Температура вспышки - около 105°C; Температура воспламенения - около 425°C.
Фунгициды:	Группа препаратов	Структурная формула	Основные характеристики
тебуконазол	Триазолы [(RS)-1р-хлорфенил-4,4-диметил-3-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил-метил)пентан-3-ил]		Молекулярная масса 307,8; Температура плавления 104,7°C; Температура кипения: разлагается до кипения; Давление паров при 20 °С- 1,7•10 <sup>-3</sup> мПа; Растворимость в воде 0,032%.

азоксистробин	Стробилурины [Метил(Е)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат]		Молекулярная масса 403,4; Температура плавления 166 °С; Температура кипения 360 °С; Растворимость в воде: практически не растворим в воде 6,7 мг/л при 20 °С
пропамокарб	Карбаматы [пропил (диметиламино)пропилкарбамат, гидрохлорид]		Молекулярная масса 224,73; Температура плавления 45-55 °С; Температура кипения: разлагается до кипения; Давление паров при 25 °С 800 мПа; при 20 °С – $3,85 \cdot 10^{-2}$ мПа; Растворимость в воде (25 °С) 867 г/куб. дм.

Применение гербицидов за последние годы особенно возросло. Организмы, которые причиняют вред, составляет 0,1 % общего числа, около 3000 видов. Большинство из них это сельскохозяйственные вредители или переносчики болезней животных и человека, природную активность которых необходимо устранять. Синтетические органические инсектициды являются наиболее мощным средством для решения этой задачи. Уничтожение сорняков, так как и уничтожение вредных насекомых, является необходимой процедурой для эффективного ведения сельского хозяйства. Гербициды также используются для устранения нежелательной растительности толи шоссеиных дорог и в лесах [77].

### 1.5.1 Рекомендации по уменьшению степени химического загрязнения биосферы пестицидами

Пестициды, накапливаясь в почвах, растениях, животных, могут вызывать глубокие и необратимые нарушения нормальных циклов биологического круговорота веществ и снижение продуктивности почвенных экосистем. При увеличении масштабов применения пестицидов не дает гарантии повышения урожайности культур. Отсутствие выраженной корреляции урожайности зерновых с применением пестицидов может быть связано с тем, что подавляемые пестицидами виды не является фактором,

лимитирующим урожайность культур, либо с тем, что применяемые пестициды недостаточно эффективно подавляют деятельность регулируемых видов. В обоих случаях утверждение об исключительной важности использования пестицидов для увеличения продуктивности сельского хозяйства необоснованно. Подавляемые формы составляют не более доли процента от общего числа видов в любом агроценозе. Поэтому при использовании пестицидов поражаются не только объекты подавления, но и множество других видов, которые не являются мишени действия.

Только около 3% применяемых инсектицидов и фунгицидов достигают своей цели. Доля реально работающих гербицидов колеблется от 5% до 40% от применяемого количества. Пестициды в основном всегда отрицательно влияют на живое население почвы. Подавляемые виды насекомых и других вредителей быстро вырабатывают резистентность к используемым пестицидам, заставляя тем самым применять все более токсичные препараты, все новые и новые пестициды. Инсектициды влияют на насекомых-опылителей. Около 70% цветковых растений опыляются насекомыми и около 30% всех насекомых являются опылителями. Зачастую практически невозможно соблюдение необходимых требований их применения. Химические средства защиты должны быть лишь инструментом экстренного вмешательства при критических ситуациях, но не повседневной практикой. Вредители возникают ведь не от недостатка пестицидов в среде, так же как головная боль - не от отсутствия в крови анальгина.

Пути защиты почвенных экосистем и населения от загрязнения пестицидами сводятся в основном к решению организационных вопросов. Это умелое сочетание пестицидов с биологическими методами, более экономичное и целенаправленное применение пестицидов за счёт использования гранулированных препаратов, уменьшение масштабов авиационного способа внесения, отказ от применения стойких препаратов, соблюдение технологий хранения, транспортировки и внесения пестицидов.

Чтобы грамотно применять пестициды в сельском хозяйстве, необходимо представлять их судьбу в почвенных экосистемах. Эта «судьба» тесно связана с внутрпочвенными микробиологическими процессами и с процессами массопереноса почвенной влаги и воздуха. До 80% пестицидов адсорбируется почвенным гумусом, тем самым время жизни их в почвенном покрове существенно повышается. В адсорбированном состоянии большинство гербицидов почти не подвергаются биоразложению. Адсорбционные свойства почвы зависят от природы глинистых минералов и от содержания почвенного гумуса. Повышение сорбционной ёмкости и почвенных пород по отношению к пестицидам за счет гумифицирования глинистого слоя почвы позволяет сдерживать миграцию пестицидов и продуктов их трансформации в водоемы. С этой целью применяют перегной, торф, бурый уголь, лигнины [78].

## **1.6 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. 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 [79].

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 мочевины. 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 [80].

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 определенного 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 полиэфиров и покрытия удобрения полимером, т.е. создание полимерных конструкций с оболочкой. В работе [81] исследована способность к биодеградации полимерных матриксов с депонированным в их структуру бактериальным удобрением. Бактериальное удобрение включали в матрикс из полибутиленсукцината и смеси полибутиленсукцинат 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 приводила к увеличению скорости биодеградации

образцов. Данный эксперимент доказал возможное применение данных полимерных матриц в качестве матрикса для бактериальных удобрений.

## ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

Поли-3-гидроксибутират П(ЗГБ) и сополимер 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата П(ЗГБ/ЗГВ) с включением 3-гидроксивалерата 13% были получены 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 [82]. Молекулярная масса П(ЗГБ) составляла 920 kDa, ПД=2,52.

Поли-ε-капролактон (ПКЛ) в виде гранул был произведен Aldrich (США);  $M_n$  70,000-90,000 кДа.

Поли-L-лактид (ПЛ) в виде гранул был произведен NatureWorks LLC (Бельгия);  $M_n$  45,491 kDa,  $M_w$  163 kDa, ПД=3,6.

Древесные опилки получены измельчением древесины березы на деревообрабатывающем станке МД 250-85 (компания «СтанкоПремьер», Россия), с последующим просушиванием.

Метрибузин (4-амино-6-трет-бутил-4,5-дигидро-3-метилтио-1,2,4-триазин-5-он,  $C_8H_{14}N_4OS$ ) произведен фирмой «ЭКОЛАН» (Россия).

В качестве удобрения использовали нитрат аммония (аммонийную (аммиачную) селитру) –  $NH_4NO_3$  производства ЗАО «Чудовоагрохимсервис» (Россия).

В качестве тест-культуры в опыте была использована пшеница мягкая яровая (*Triticum aestivum*) сорт «Алтайская 70» (семейства Злаки (лат.



*Gramíneae*), 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). В работе использовался сорт «Алтайская 70», выведенный двукратным индивидуальным отбором из гибрида Алтайская 98 и Алтайская 325. Сорт проходил сортоиспытания по морозоустойчивости в суровом климате Сибири и Дальнего Востока. Сорт среднеранний (вегетационный период от всходов до восковой спелости 74-79 дней), с высокими значениями урожайности (3,59-4,51 т/га), с хорошим кущением, устойчив к шведской мухе, пыльной головне, полеганию, осыпанию и прорастанию на корню и в валках. Мучнистой росой поражается слабо. Относится к сортам интенсивного типа. Рекомендуются 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. Менино) – 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.

Реактивы, растворы и материалы, использованные в работе:

- Реактив Несслера ЧДА ( $K_2HgI_4 \times NaOH$ ) производства ООО ПКФ «ТД Реахим» (Россия) ГОСТ 6-09-2089-77
- Хлороформ ( $CHCl_3$ ) ХЧ ЗАО «Экос-1» (Россия) ТУ 2631-066-44493179-01
- 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
- н-Гексан ( $C_6H_{14}$ ) ХЧ ЗАО «Экос-1» (Россия) ТУ 2631-158-44493179-13
- Этилацетат ( $C_4H_8O_2$ )
- Ацетон ( $C_3H_6O$ ) производства ООО «Протон» ТУ 2631-039-92804628-2010
- Дихлорметан ( $CH_2Cl_2$ )
- Хлорид натрия ( $NaCl$ )
- Вода дистиллированная ( $H_2O$ )
- Красители:
  - Бриллиантовый зеленый
  - Нейтральный красный
  - Метилловый фиолетовый

## **2.2 Изготовление полимерных форм**

### **2.2.1 Изготовление форм с использованием полимерного матрикса из П(ЗГБ) и его композита с древесными опилками**

Образцы изготавливались методом холодного прессования в виде таблетированных форм.

В качестве полимерной основы использовался чистый порошкообразный поли-3-гидроксибутират, а также его смесь с порошкообразной древесиной (опилками), для этого полимер и древесину смешивали между собой в соотношении 1:1 (45 мг:45 мг). Далее порошкообразную смесь формовали прямым холодным прессованием с использованием автоматического пресса «Усиленный Суперпресс» (Белоруссия) (рис.6).

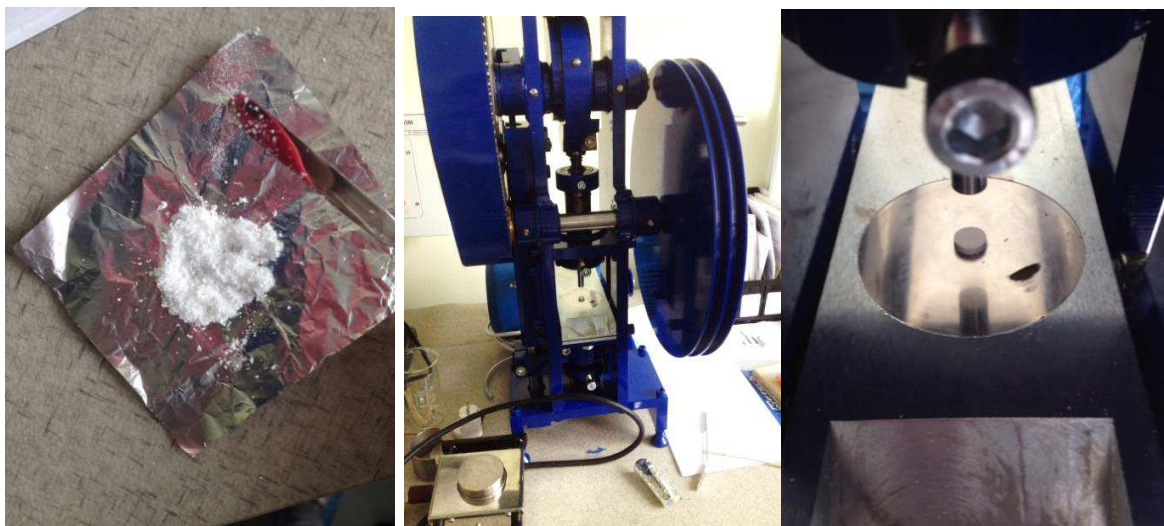


Рисунок 6 - «Усиленный Суперпресс» (Белоруссия) (фото автора)

Было получено два типа образца:

- на основе чистого П(ЗГБ) (0,090г П(ЗГБ) );
- на основе композита П(ЗГБ)/опилки в соотношении 1:1 (0,045г П(ЗГБ) : 0,045г опилки).

Масса исследуемых таблетированных форм составляла примерно  $0,090 \pm 1$ г.

### **2.2.2 Изготовление депонированных форм азотного удобрения (нитрат аммония) с использованием полимерного матрикса из П(ЗГБ) и его композита с древесными опилками**

Для получения депонированных форм, порошок чистого П(ЗГБ), а так же его смесь с древесными опилками смешивали с порошкообразной аммиачной селитрой, из расчета 25%-ного содержания удобрения в готовой форме.

Далее порошкообразную смесь формовали прямым холодным прессованием с использованием автоматического пресса, как описано в п.2.2.1. Масса исследуемых таблетированных форм составляла  $0,120 \pm 0,003$  г.

Было получено два типа образцов:

- на основе чистого П(ЗГБ) (0,090 г П(ЗГБ) : 0,030 г удобрение);
- на основе композита П(ЗГБ)/опилки/удобрение (0,045 г П(ЗГБ) : 0,045 г опилки : 0,030 г удобрение).

Часть таблетированных форм была покрыта дополнительной полимерной оболочкой. Для этого образцы погружались в 5%-ный раствор П(ЗГБ) и высушивались в течение 30 минут. Процедура повторялась 6 раз. После этого, масса исследуемых таблетированных форм составляла  $0,200 \pm 0,010$  г.

### **2.2.3 Получение биополимерных гранул методом формирования осажденного полимера**

Раствор ПГА в хлороформе осаждался двукратным объемом этилового спирта. Растворитель сливался, осажденный полимер с остатками растворителя пропусклся через механический гранулятор, что приводило к формированию рыхлых «сырых» палочковидных гранул (диаметр около 2 мм), которые затем высушивались.

### **2.2.4 Получение биополимерных гранул методом экструзии из расплава**

Для получения экструдированных гранул, гранулы, формованные из осадка (п. 2.2.3), после выпаривания подвергались экструзии с использованием одношнекового экструдера Brabender 19/25D (Германия) (рис.7). Полученный полимерный плуток, диаметром 1 мм, разрезался с помощью гранулятора Brabender (Германия) на обрезки длиной 2-2,5 мм.



Рисунок 7 – Одношнековый экструдер Brabender 19/25D (Германия) (фото автора)

*Изъято 0,5 страницы.*

### **2.3 Изучение биодegradации полимерных и композитных форм различного состава и структуры в модельной почве**

Для изучения деградации полимерных и композитных форм различного состава и структуры в почве было использовано восемь типов образцов:

- 1) П(ЗГБ), экструдированный (п.2.2.4);
- 2) П(ЗГБ), формованный из осадка (п.2.2.3);
- 3) П(ЗГБ/ЗГВ), экструдированный (п.2.2.4);
- 4) П(ЗГБ/ЗГВ), формованный из осадка (п.2.2.3);
- 5) ПКЛ, гранулированный (коммерческий);
- 6) ПЛ, гранулированный (коммерческий);
- 7) П(ЗГБ) (таблетированные формы, п.2.2.1);
- 8) П(ЗГБ)/опилки (таблетированные формы, п.2.2.1).

Образцы (1-6) по 300 мг и таблетированные формы (7-8) в количестве одна штука были помещены в специальные чехлы – мешочки из органзы. Полимерные конструкции помещали на почву, в контейнеры (объемом 500 см<sup>3</sup>), наполненные почвой около 200 грамм. Поверх форм насыпалась еще почва около 200 грамм.

Контейнеры с исследуемыми образцами размещали в климатической камере Conviron A1000AR (объемом около 3 м<sup>3</sup>) в регулируемых искусственных условиях при температуре 20°C. Наблюдения за образцами осуществлялось через специальное окошко в дверке (рис.9).



Рисунок 9 - Климатическая камера Conviron A1000AR (фото автора)

С интервалами семь дней осуществлялся полив образцов объемом водой 100 мл. Из каждой линейки образцов отбиралась часть образцов, полимерные формы извлекались и высушивались при комнатной температуре в течение 3 суток. Биодegradацию полимера оценивали по убыли массы образцов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010.

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

### **2.4.1 Схема эксперимента удобрений в почве**

Для оценки эффективности применения разработанных форм азотного удобрения были использованы образцы, включающие 0,045 г П(ЗГБ), 0,045 г опилок и 0,030 г аммиачной селитры. Наряду с обычными прессованными формами, были изготовлены формы того же состава, дополнительно покрытые полимерной оболочкой.



Таблетки, по две штуки, были помещены в специальные чехлы – мешочки из органзы, зашитые капроновыми нитками (рис.10а). В качестве вегетационных сосудов использовались пластиковые контейнеры объемом 350 см<sup>3</sup> в которые помещалось 270 грамм почвы, поверх которой горизонтально размещались чехлы с таблетками удобрения. Поверх таблетированных форм насыпалось еще 15 грамм почвы, затем засеивались зерна пшеницы в количестве 12 штук на горшок (рис.10б), и сверху дополнительно засыпалось 15 г почвы. Обильно поливалось водой. Общая масса почвы в горшке составляла 300 г.

В контрольные контейнеры полимерные образцы не помещались. Положительным контролем служили контейнеры с внесением эквивалентного количества – 60 мг, – свободного удобрения (рис.11). Отрицательным контролем служили контейнеры без внесения удобрения.



а

б

Рисунок 10 - Контейнеры с образцами (фото автора)



Рисунок 11 - Контейнер с аммиачной селитрой в гранулированном виде (фото автора)

Каждый вегетационный сосуд имел свой поливочный резервуар (со свободным объемом 150 см), в который, после полива, самотеком стекал ирригационный раствор (рис.12). Полив осуществляли по 50 мл водопроводной воды по мере подсыхания верхнего слоя почвы (2-3 раза в неделю).



Рисунок 12 - Вегетационные сосуды с поливочными резервуарами (фото автора)

Вегетационные сосуды с поливочными резервуарами размещали в климатической камере для выращивания растений Conviron A1000AR (рис. 9) в регулируемых искусственных условиях с моделированием фотопериода и суточной динамики температур (таб. 5). Для моделирования сезонной смены



климатических условий через семь недель в камере повысили температуру на четыре градуса.

Таблица 5 - Режим работы климатической камеры Conviron

	время	t, °C 1 – 7 неделя	t, °C 8 - 12 неделя	минимальная влажность, %	Освещенность, мкмоль/м <sup>2</sup> /с
1	0:00	10°C	14°C	50	0
2	6:00	12°C	16°C	50	100
3	9:00	14°C	18°C	40	200
4	12:00	18°C	22°C	20	300
5	16:00	16°C	20°C	30	200
6	20:00	13°C	17°C	30	100
7	23:00	10°C	14°C	40	0

Почва и ирригационная вода анализировалась на содержание растворенных форм аммонийного азота в конце каждой недели эксперимента, по методикам, приведенным в п.2.4.2 и п.2.4.3.

Из каждой линейки образцов (положительный контроль, отрицательный контроль и П(ЗГБ)/опилки) часть образцов периодически отбиралась, растения и таблетированные формы извлекались и высушивались при комнатной температуре в течение семи суток. На аналитических весах взвешивались отдельно корни, надземная часть растения и полимерные формы. Биodeградацию полимера оценивали по убыли массы образцов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010.

#### 2.4.2 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.

#### **2.4.3 Определение азота в ирригационной воде**

После полива образцов, вода стекала в поддон. Далее измеряли объем ирригационной воды в мерном цилиндре, производили фильтрацию с помощью бумажных фильтров ( $d = 14$  см) тем самым механически очищая от частиц почвы. Из колбы пипеткой отбирали по 5 мл ирригационного раствора, далее помещали в мерную колбу на 50 мл, довели дистиллированной водой до метки 46 мл, и добавляли к нему по 2 мл раствора Несслера и 2 мл раствора сегнетовой соли. Через 10 минут измеряли плотность растворов на фотоэлектроколориметре при длине волны 440 нм в кюветах длиной 1 см относительно дистиллированной воды. Количество (мг/мл) азота в растворе определяли по калибровочному графику.

*Изъято 18 страниц.*

## **Заключение**

1. На основе биоразрушаемых полимеров разного состава и с использованием различных способов их переработки разработана серия биополимерных конструкций, потенциально пригодных для разработки пролонгированных препаратов сельскохозяйственного назначения.

2. Исследована биодеградация полученных полимерных конструкций в течение 85 дней. Наибольшая скорость деградации в модельной почве отмечена для прессованных форм, при этом опилки не влияли на скорость деструкции. Наименьшая скорость деградации (9-11%) отмечена для экструдированных образцов всех типов полимеров, кроме П(ЗГБ/ЗГВ).

3. С использованием техники холодного прессования разработаны формы удобрения аммиачной селитры пролонгированного действия, в том числе с дополнительным биополимерным покрытием. В эксперименте с модельными растениями показано положительное влияние разработанных форм на основе композита ПГБ/опилки с дополнительным покрытием на прирост биомассы пшеницы по сравнению с удобрением в свободной форме.

4. Разработаны и получены формы гербицида метрибузина пролонгированного действия методом совместной экструзии гербицида с поликапролактоном в качестве биоразлагаемого носителя;

5. Изучена динамика выхода метрибузина из полимерного матрикса в воду в течение 1 недели. Высокая концентрация препарата в воде в первые сутки обусловлена тем, что изначально происходит смыв его с поверхности образцов и уже в дальнейшем идет выход из глубинных слоев;

6. Исследована биодеградация полученных полимерных конструкций с метрибузином в модельной почве в течение 14 недель. Отмечено увеличение скорости деградации образцов при увеличении содержания пестицида: от 9% при 10%-ном включении гербицида до 27% при 40%-ном включении. При этом динамика высвобождения препарата в почве из образцов с различным соотношением компонентов существенно не отличалась.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Войнова, О. Н. Микробные полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов / О. Н. Войнова, Г. С. Калачева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 4. – С. 427-431.
- 2 Прудникова, С. В. Долговременные системы доставки удобрений на основе полигидроксиалканоатов / С. В. Прудникова, В. Ц. Цыремпилов // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2012. №3.– С. 322-328.
- 3 Aremu, M. O. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) from cassava starch hydrolysate by *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950 / M. O. Aremu, S. K. Layokun, B. O. Solomon // American journal of scientific and industrial research. - 2010. -№ 1(3). - P. 42-426.
- 4 Pieja, A. J. Distribution and Selection of Poly-3-Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria / A. J. Pieja, K. H. Rostkowski, C. S. Criddle // Microbial Ecology. - 2011. - V. 62. - № 3. - P. 564-573.
- 5 Anupama, S. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System/ S. Anupama, K. Hae-Yeong, K. Young-Rok // BioMed Research International. - 2013. - V. 2013. - P. 1-12.
- 6 Jae, P. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter / P. S. Jae, P. J. Pil, L. S. Yup // Biotechnology letters. - 2002. - V. 24. - №3. - P. 185-189.
- 7 Baolin, G. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review / G. Baolin, P. Ma // Author Manuscript. - 2014. - № 57(4). - P. 490-500.
- 8 Steinbuchel, A. Physiology and molecular genetics of poly-( $\beta$ -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus* / A. Steinbuchel, H.G. Schlegel // Molecular Microbiology. - 2009. - № 5(3). - P. 535-542.

**9** Keshavarz, T. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda / T. Keshavarz, I. Roy // *Current Opinion in Microbiology*. - 2010. - № 13(3). - P. 321-326.

**10** Hiroe, A. Rearrangement of gene order in the phaCAB operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly [(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli* /H. Ayaka, T. Kenji, T. Christopher // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2012. - V. 78. - №. 9. - P. 3177-3184.

**11** Arifin, Y. Deletion of cscR in *Escherichia coli* W improves growth and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from sucrose in fed batch culture / Y. Arifin, S. Sabri, H. Sugiarto et al. // *J. Biotechnol.* - 2011. - V.156. - № 4. - P. 275-278.

**12** Pandiana, S. R. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3 / S. R. Pandiana, V. Deepaka, K. Kalishwaralala et al. // *Bioresource Technology* - 2010. - V. 101. - №. 2. - P. 705-711.

**13** Daneshi, A. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* from corn syrup: statistical modeling and optimization of biomass yield and volumetric productivity / A. Daneshi, H. Younesi, S. M. Ghasempouri et al. // *Chemical Technology and Biotechnology*. - 2010. - V. 85. - №. 11. - P. 1528-1539.

**14** Obruca, S. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly (3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator* / S. Obruca, I. Marova, Z. Svoboda et al. // *Folia Microbiologica*. - 2010. - V.55. - №. 1. - P. 17-22.

**15** Almeida, A. Effects of aeration on the synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli* / A. Almeida, A. M. Giordano, P. I. Nikel et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2010. - V.76. - №. 6. - P. 2036-2040.

**16** Karpova, S. Effect of external influences on the structural and dynamic parameters of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate-based biocomposites / S. G.

Karpova, A. L. Lordanskii, A. A. Popov et al. // *Physical Chemistry B*. -2012. - V. 6. - № 2. - P. 72–80.

**17** Hong, S. Thermal properties and applications of low molecular weight polyhyxybutyrate / S. G. Hong, H. W. Hsu, M. T. Ye

// *Thermal Analysis Calorimetry*. - 2013. - V. 111. - №. 2. - P. 1243–1250.

**18** Kabe, T. Physical and structural effects of adding ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] to wild type poly[(R)-3-hydroxybutyrate] / T.

Kabe, T. Tsuge, K. Kasuya, A. Takemura, T. Hikima, M. Takata, T. Iwata // *Macromolecules*. - 2012. - №. 45. - P. 1858-1865.

**19** Tribelli P. M. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions / Tribelli P. M., Lopez N. I. // *Extremophiles*. - 2011. - V. 15. - №. 5. - P. 541-547.

**20** Pena, C. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work / C. Pena, T. Castillo, A. Garcia, M. Millan, D. Segura // *Extremophiles*. – 2014. - № 7(4). – P. 278–293

**21** Chen, G. Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates / G. Chen, Y. Wang // *Polymer Science*. - 2013. - V. 31. - №. 5. - P. 719-736.

**22** Shishatskaya, E. Biocompatibility and resorption of intravenously administered polymer microparticles in tissues of internal organs of laboratory animals / E. I. Shishatskaya, A. V. Goreva, G. S. Kalacheva, T. G. Volova // *Biomaterial Science*. - 2011. - №. 22. - P. 2185-2203.

**23** Woodruff, M. A. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century / M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher // *Prog. Polym. Sci.* – 2010. – T. 35. – №. 10. – P. 1217-1256.

**24** Huang S. Biodegradable Polymers. In: Mark F, Bikales N, Overberger C, Menges G, Kroshwitz J, editors. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. - New York: John Wiley and Sons.- 1985. p. 220-43.

**25** Coulembier O. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(beta-malic acid) derivatives / O.

Coulember, P. Degee, J.L. Hedrick, P. Dubois // Prog. Polym. Sci.-2006.-Т. 31.- P.723-747.

**26** Chandra R. Biodegradable polymers/ Chandra R., Rustgi R. // Prog. Polym. Sci. - 1998.-Т.23.-P.1273-1335.

**27** Okada M. Chemical syntheses of biodegradable polymers / Masahiko Okada // Prog. Polym. Sci. - 2002. - Т.27. - P.87-133.

**28** Кильдеева, Н.Р. Биодegradуемые полимеры и их использование в медицине. Конспект лекций: учебное пособие/ Н.Р. Кильдеева, М.А. Бычук – М.:МГУДТ, - 2014.- 67с.

**29** Nair, LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials / Nair L.S., Laurencin C.T. // Prog. Polym. Sci.-2007.-Т.32.-P.762-798.

**30** Vert M. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters / Vert M., Li S.M., Spenlehauer G., Guerin P. // J. Mater. Sci. - Mater. Med.- 1992.- Т.3.-P.432-446.

**31** Vert M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts / Michel Vert // J. Mater. Sci. - Mater. Med. - 2009.- Т.20.-P.437-446.

**32** Ginde, R.M. In vitro chemical degradation of poly (glycolic acid) pellets and fibers / Ginde R. M., Gupta R. K. // J. Appl. Polym. Sci. – 1987. – Т. 33. – №. 7. – С. 2411-2429.

**33** Göpferich A. Predicting drug release from cylindric polyanhydride matrix discs / Göpferich A., Karydas D., Langer R. // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 1995. – Т. 41. – №. 2. – P. 81-87.

**34** Holland, S.J. Biodegradable polymers / Holland S.J., Tighe B.J. //Advances in Pharmaceutical Sciences. – 1992. – Т. 6. – P. 101-164.

**35** Middleton J.C. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices / John C. Middleton, Arthur J. Tipton //Biomaterials. – 2000. – Т. 21. – №. 23. – P. 2335-2346.



- 36** Gunatillake P. A. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering / Pathiraja A.Gunatillake, Raju Adhikari // Eur. Cell Mater. – 2003. – Т. 5. – №. 1. – P. 1-16.
- 37** Chen D.R. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation / Chen D.R., Bei J.Z., Wang S.G. // Polym. Degrad. Stab. – 2000.-№67.- P.455-459.
- 38** Persenaire O. Mechanisms and kinetics of thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone) / Persenaire O., Alexandre M., Degee P. // Biomacromolecules. – 2001.-№2.- P.288-294.
- 39** Sivalingam G. Thermal degradation of poly (epsilon-caprolactone) / Sivalingam G., Madras G. // Polym. Degrad. Stab. – 2003.- №80.- P.11-16.
- 40** Sivalingam G. Enzymatic and thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide), and their blends / Sivalingam G., Vijayalakshmi S.P., Madras G. // Ind. Eng. Chem. Res.- 2004.-№43.- P.7702-7709.
- 41** Labet M. Synthesis of polycaprolactone: a review / Labet M., Thielemans W. // Chem. Soc. Rev. – 2009. – Т.38. – №.12. – P. 3484-3504.
- 42** Van Natta F.J. Polymerization and ring formation, ε-caprolactone and its polymers / Van Natta F.J., Hill J.W., Carruthers W.H. // J. Am. Chem. Soc. -1934.- №56.-P.455-459.
- 43** J. O. Iroh, in Polymer Data Handbook, ed. J. E. Mark, Oxford University Press, New York.- 1999.- pp. 361–362.
- 44** Birmingham polymers, Chemical & Physical properties. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.birminghampolymers.com/>.
- 45** Фомин, В.А. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования / В.А. Фомин, В.В. Гузеев // Пластические массы. – 2001. - № 2. – С. 42-46.
- 46** Reddy, G. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review / G. Reddy, M. Altaf, B. J. Naveena, M. Venkateshwar, E. V. Kumar // Biotechnology Advances. – 2008. – Vol. 26. – P. 22-34.

**47** Carothers, W. H. Studies of polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters / W. H. Carothers, G. L. Dorrough, F. J. Natta // Journal of American Chemical Society. – 1932. – Vol. 54. – No. 2. – P. 761-772.

**48** Kleine, V. J. Uber hochmolekulare, insbesondere optisch active polyester der michtsäure, ein beitrage zur stereochemie makromolekularer verbindungen / V. J. Kleine, H. H. Kleine // Die Makromolekulare Chemie. – 1959. – Vol. 30. – No. 1. – P. 2-38.

**49** Sodergard, A. Industrial production of high molecular weight poly(lactic acid) / A. Sodergard, M. Stolt // Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 27-41.

**50** Albertsson, A. C. Design and Synthesis of Different Types of Poly(Lactic Acid) / A. C. Albertsson, I. K. Varna, B. Lochab, A. Finne-Wistrand, K. Kumar // Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 43-58.

**51** Sodergard, A. Properties of lactic acid based polymer and their correlation with composition / Sodergard A., Stolt M. // Progress in Polymer Science. – 2002. – Vol. 27. – P. 1123-1163.

**52** Bigg, D. M. Effect of copolymer ratio on the crystallinity and properties of polylactic acid copolymers / Digg D. M. // SPE ANTEC Technical Papers. – 1996. – P. 2028-2039.

**53** Clarinval, A. M. Classification and comparison of thermal and mechanical properties of commercialized polymers / Clarinval, A. M. // International Congress and Trade Show, The Industrial Applications of Bioplastics. – York: - 2002.

**54** Jamshidian, M. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites and release study / M. Jamshidian, E. A. Tehrany, M. Jacquot, S.

Desorby // Comprehensive Reviews in Food Science and Safety. – 2010. Vol. 9. – P. 552-571.

**55** Auras, R. Part II: Properties of Poly(Lactic Acid): // Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 67-188.

**56** Obuchi, S. Packaging and other commercial applications / S. Obuchi, S. Ogawa // Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 457-467.

**57** Mitsubishi Motors Corporation. Social and Environmental Report 2007 [Электронный ресурс]. URL: [http://www.mitsubishi-motors.com/en/social/pdf/2007e\\_all.pdf](http://www.mitsubishi-motors.com/en/social/pdf/2007e_all.pdf)

**58** Fujitsu and Toray Develop World's First Environmentally-Friendly Large-Size Plastic Housing for Notebook PCs [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fujitsu.com/global/about/resources/news/press-releases/2005/0113-01.html>

**59** Mobile phone which adopted the kenaf fiber-reinforced bioplastic in the housing over the entire surface released “FOMA (R) N70liECO” [Электронный ресурс]. URL: <http://www.nec.co.jp/press/ja/0603/0204.html>

**60** Toshiba has developed a remote control housing using a plant-derived resin [Электронный ресурс]. URL: <http://techon.nikkeibp.co.jp/article/NEWS/20060224/113647/>

**61** An eco-friendly approach to making Sony gadgets [Электронный ресурс]. URL: <http://blog.sony.com.2013/04/green-sony/>

**62** Hiraishi, A. Environmental Applications / A. Hiraishi // Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 447-486.

**63** Kulkari, R. K. Polylactic Acid for Surgical Implants / R. K. Kulkari, K. C. Pani, C. Neuman, F. Leonard // *Arch Surgery*. – 1966.– Vol. 93. – P. 839-843.

**64** Yaszemski, M. J. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone / M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. Langer, A. G. Mikos // *Biomaterials*. – 1996.– Vol. 17. – No. 2. – P. 268-275.

**65** Pihlajamaki, H. Long-term tissue response to bioabsorbable poly-lactide and metallic screws: An experimental study / H. Pihlajamaki, O. Bostman, O. Tynninen, O. Laitnen // *Bone*. – 2006.– Vol. 39. – No. 4. – P. 932-937.

**66** Suzuki, T. Resorbable poly-lactide plates and screws for the treatment of mandibular condylar process fractures: a clinical and radiologic follow-up study / T. Suzuki, H. Kawamura, T. Kasahara, H. Nafasaka // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2004.– Vol. 62. – No. 8. – P. 919-924.

**67** De tayrac, R. In vitro degradation and in vivo biocompatibility of poly(lactic acid) mesh for soft tissue reinforcement in vaginal surgery / R. de Tayrac, S. Chentouf, H. Garreau, C. Braud, I. Guiraund, P/ Boudeville, M. Vert // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2008.– Vol. 85B. – No. 2. – P. 526-539.

**68** Suzuki, S. Medical Application / S. Suzuki, Y. Ikada // *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications* / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 445-456.

**69** Tsuji, H. Degradation of Poly (Lactide)-Based Biodegradable Materials. / H/ Tsuji New York: Nova Science Pub Inc., 2008. – P. 76.

**70** Rasselet, D. Oxidative degradation of polylactide (PLA) and its effects on physical and mechanical properties / D. Rasselet, A. Ruellan, A. Guinault, G. Miquelard-Garnier, C. Sollogoub. B. Fayolle // *European Polymer Journal*. – 2013.– Vol. 50.– P. 109-116.

**71** Kale, G. Biodegradability of polylactide bottles in real and simulated compositing conditions / G. Kale, R. Auras, S. P. Singh, R. Narayan // *Polymer Testing*. – 2007. – Vol. 26. – No. 8. – P. 1049-1061.

**72** Kopinke, F. D. Thermal decomposition of biodegradable polyesters – II. Poly (lactic acid) / F. D. Kopinke, M. Remmler, K. Mackenzie, M. Moder, O. Wachsen // *Polymer Degradation and Stabilite*. – 1996. – Vol. 53. – P. 329-342.

**73** Sakai, W. Photodegradation and Radiation Degradation / W. Sakai, N. Tsutsumi // *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications* / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 413-422.

**74** Iwata, T. Enzymatic Degradation / T. Iwata, H. Abe. Y. Kikkawa // *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications* / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 383-399.

**75** Calabia, B. P. Biodegradation / B. P. Calabia, Y. Tokiwa, C. U. Ugwu, S. Aiba // *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications* / edited by R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., - 2010. – P. 423-430.

**76** Е Швайкова, М.Д. Токсикологическая химия. - М. Медицина. – 1975. – С. 376.

**77** Фелленберг, Г. Загрязнение природной среды. / Г. Фелленберг // *Введение в экологическую химию*. - М.: Мир. – 1997. – С. 232.

**78** Скурлатов, Ю.И. Введение в экологическую химию: Учеб. пособие для хим. технолог. спец. вузов / Ю.И. Скурлатов, Г.Г. Дука, А. Мизити // - М.: Высш. шк. – 1994. – С. 400.

**79** Артюшин, А.М. Краткий справочник по удобрениям / А.М. Артюшин, Л.М. Державин // — 2 изд. — Москва: Колос, - 1984. — С. 208.

**80** Ефимов, В.Н. Система удобрений / В.Н. Ефимов, И.Н. Донских, В.П. Царенко // – М.: Колос, - 2003. – С. 320.

**81** 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.

**82** T.G. Volova, E.G. Kiselev, O.N. Vinogradova, E.D. Nikolaeva, A.A. Chistyakov, A.G. Sukovaty, E.I. Shishatskaya, A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs, PLOS ONE 9 (2014) e87551


**83** МУК 4.1.1972-05 Определение остаточных количеств метрибузина в воде, почве, томатах и картофеле методом газожидкостной хроматографии.

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

« 21 » июня 2018 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Конструирование и оценка эффективности систем контролируемой  
доставки сельскохозяйственных препаратов различного действия  
тема работы

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель

  
подпись, дата

к.б.н., доц.

должность, ученая степень

А.Н. Бояндин

инициалы, фамилия

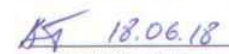
Выпускник

  
подпись, дата

Е.А. Казанцева

инициалы, фамилия

Рецензент

  
подпись, дата

к.б.н., н.с.

должность, ученая степень

В.В. Величко

инициалы, фамилия

Красноярск 2018