

Б16/4

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 пленок и форм с пленочным покрытием

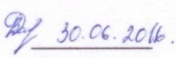
тема работы

Руководитель  к.б.н. доц.

А.Н. Бояндин

подпись, дата должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник  30.06.2016. ББ12-04Б

Д.Е. Варыгина

подпись, дата 041204292

инициалы, фамилия

Красноярск 2016

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1. Виды минеральных удобрений .....	6
1.2. Полигидроксиалканоаты – природные полиэферы нового поколения..	13
1.2.1 Полигидроксibuтират, его свойства .....	15
1.2.2. Поликапролактон, его свойства .....	19
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	21
2.1 Объекты исследования. ....	21
2.2. Изготовление депонированных форм азотного удобрения (нитрат аммония) с использованием полимерного матрикса из ПГБ и его композита с ПКЛ. ....	22
2.2.1. Изготовление пленочных форм. <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>	
2.2.2. Изготовление таблетированных форм..... <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>	
2.3.1 Анализ динамики деградации пленочных образцов и таблетированных форм ПГБ, ПКЛ, и выход аммония в лабораторных условиях в водный раствор..... <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>	
2.3.2. Анализ динамики деградации таблетированных форм ПГБ, ПКЛ, и выход аммония в лабораторных условиях в почву, как модельную среду .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.3.3 Изучение динамики деградации таблетированных форм ПГБ, и выход аммония в лабораторных условиях из полимерных форм в почву и ирригационную воду .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.4. Методика определение азота в водной среде.....	22
2.5. Методика определения азота в почве. ....	23
2.6. Методика определения азота в ирригационной воде. ....	23
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	24
3.1. Выход аммиачной селитры из пленочных образцов в водный раствор (Эксперимент 1) .....	24

3.2. Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в водный раствор (Эксперимент №2) .....	24
3.3. Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в почвенную среду (Эксперимент 3).....	24
3.4. Выход аммиачной селитры таблетированных образцов в почву и ирригационную воду (Эксперимент 4) .....	24
ВЫВОДЫ.....	24
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	25
<b>Приложение 1.....</b>	<b>50</b>

## **ВВЕДЕНИЕ.**

### Актуальность работы

Россия, располагает безграничными и огромными возможностями для успешного развития сельского хозяйства. Наша страна обладает самым большим в мире фондом земли, в том числе земель сельскохозяйственного назначения. Однако климатические условия, неблагоприятное географическое положение, а так же, применение огромного разнообразия химических веществ, которые чаще всего пагубно воздействуют по почвы и урожай, существенно ограничивают эти возможности.

Традиционное применение удобрений вступило в противоречие с глобальной проблемой защиты окружающей среды. Используемые в большинстве случаев в виде суспензий, порошков, и эмульсий, химические вещества часто не обеспечивают контролируемую доставку препаратов, что приводит к их распылению и последующему накоплению в биосфере. Новым способом исследований, которые ориентируются на снижение риска бесконтрольного распространения и аккумуляции химических веществ в биосфере, является использование экологически безопасных препаратов нового поколения с точным и контролируемым выходом активного начала за счет использования специальных покрытий и/или матриц из биоразрушаемых материалов. Среди материалов, которые могут оказаться пригодными для этих целей, -разрушаемые полиэферы микробиологического происхождения (полигидроксиалканоаты, ПГА) (Цыремпилов. В.Ц.,2012). ПГА характеризуются биоразрушаемостью в почве под воздействием типичной почвенной микрофлоры.

## **Цель работы:**

Разработка долговременных форм удобрений для обеспечения их пролонгированного выхода в окружающую среду.

Для достижения цели сформулированы следующие **задачи**:

1. Конструирование удобрений долговременного действия в виде пленочных образцов и 3D форм с пленочным покрытием, с использованием в качестве биоразлагаемого носителя поли-3-гидроксibuтирата и его композита с поли-ε-капролактоном.
2. Исследование закономерности биodeградации полимерных матриц, и высвобождения удобрений в почве и водном растворе
3. Оценка эффективности использования разработанных форм в лабораторном эксперименте с модельными растениями.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Виды минеральных удобрений

Удобрения – это вещества, предназначенные для повышения урожаев, применяемые для улучшения питания растений. свойств почвы. Их эффект обусловлен тем, что данные вещества предоставляют растениям один или несколько химических компонентов, находящихся в дефиците, необходимых для их нормального роста и развития. (Ефимов В.Н., и др.,2003.)

В свою очередь, удобрения можно разделить следующим по признакам:

- по происхождению (минеральные и органические);
- по агрегатному состоянию (жидкие, полужидкие, твёрдые);
- по способу их внесения в почву: основное, подкормочное, внутрипочвенное, поверхностное;
- по способу кормления растений: корневые подкормки, внекорневые подкормки (по листу) ( Порохин А.А и др.,1972).

Минеральные удобрения, являются неорганическими соединениями, которые могут содержать все необходимые для растений элементы питания, такие как:

- макроэлементы, к ним относятся: азот, фосфор и калий, кальций, магний, сера, железо;
- микроэлементы - бор, марганец, цинк, медь, йод ,молибден, кобальт и другие.

Все минеральные элементы, так или иначе содействуют в сложных модернизациях органических веществ, которые образуются в процессе фотосинтеза. Растения, для образования своих органов - стеблей, плодов, листьев, клубней, цветков используют минеральные питательные элементы в разных пропорциях. В почве обычно имеются все необходимые растению

жизненно важные элементы. Но очень часто отдельных элементов бывает не хватает для благоприятного роста растений. К примеру, почвенную кислотность устраняют при помощи углекислых солей кальция и магния (Капуцкий Ф.Н., Тикавый В.Ф, 1979). На песчаных почвах растения нередко испытывают недостаток магния, на черноземах – марганца, на торфяных почвах - молибдена, и т. д. Так же недостаток элементов восполняется при помощи удобрений. Применение 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 земельных участков. При помощи грамотного внесения неорганических удобрений можно использовать даже самые бедные почвы (Муравин Э.А., 2010).

Выделяют три наиболее популярных вида минеральных удобрений:

- Калийные удобрения – это вещества, которые содержат калий – один из важнейших элементов в питании растений. Сырьем для производства этой группы удобрений являются природные калийные соли.
- Фосфорные удобрения, содержащие фосфор в различных химических соединениях. Сырьем для получения фосфорных удобрений являются природные фосфорсодержащие руды – апатит и фосфорит, а также отходы металлургической промышленности
- Азотные удобрения, содержат азот в различных химических соединениях. Их производство основано на получении синтетического аммиака из молекулярного азота воздуха и водорода. Источником водорода служит природный газ, коксовые и нефтяные газы.

Ведущая роль в повышении урожая сельскохозяйственных культур принадлежит азоту. Степень достатка азота у сельскохозяйственных растений, является главным условием, который определяет среднюю высоту

урожая. Самой важной ролью азота в жизни растений представлено большое значение азотных удобрений, в приросте урожайности сельскохозяйственных растений. (Волошин Е.И., 2011).

Азот входит в состав белков, где является важнейшей составной частью ядра клеток и цитоплазмы, так же входит в состав нуклеиновых кислот, фосфатидов, хлорофилла, ферментов, большинства витаминов и других азотистых соединений, играющих не последнюю роль в процессах жизнедеятельности растения. (Рудой Н.Г. 2003). Соли азотной кислоты (нитраты) и соли аммония, являются значимым источником азота для растений. Катионами  $\text{NH}_4^+$  и анионами  $\text{NO}_3^-$ , которые находятся в почвенном растворе и в обменно-поглощенном почвенными коллоидами состоянии, именно ими в естественных условиях происходит питание растений азотом. (Муравин Э.А. и др., 2005). Сложный цикл превращения проходят формы азота, которые поступили в растения минеральные, в конечном итоге включаясь в состав органических азотистых соединений — амидов, аминокислот, и белка. Через аммиак происходит синтез органических азотистых соединений, после его образования, завершается и их распад. «Аммиак, есть альфа и омега в обмене азотистых веществ у растений», по выражению Д. Н. Прянишникова,

«Большое влияние на рост и развитие растений оказывают условия азотного питания. Синтез органических азотистых веществ будет усиливаться, при достаточном снабжении растений азотом. Растения хорошо растут и кустятся, образуют мощные листья и стебли с интенсивно-зеленой окраской, улучшается формирование и развитие органов плодоношения. В результате резко повышаются урожай и содержание белка в нем. Однако при одностороннем избытке азота задерживается созревание растений, они образуют большую вегетативную массу, но мало зерна или клубней и корнеплодов; у зерновых и льна избыток азота может вызывать полегание. Рост растений резко замедляется, листья бывают мелкие, бледно-зеленой



окраски, что связано с нарушением синтеза хлорофилла, преждевременно желтеют, стебли становятся тонкими и слабо ветвятся, все это возникает при недостатке азота. Ухудшаются также формирование и развитие репродуктивных органов и налив зерна, сильно снижается урожай и содержание белка в нем.» (Прянишников Д.Н., 1934).

Азотные удобрения хорошо растворимы в воде, не поглощаются или слабо поглощаются почвой, поэтому они легко вымываются, что ограничивает их применение осенью в качестве основного удобрения. По выпуску и использованию в сельском хозяйстве наиболее важные из этой группы аммиачная селитра и мочевины, составляющие около 60% всех азотных удобрений (Кулешов М.Н., 2003).

Мочевинной  $\text{CO}(\text{NO}_2)_2$  называется амид угольной кислоты. Представляет собой бесцветные кристаллы, не имеющие запаха. Технический продукт выглядит как белые или желтые кристаллы. Азота в чистой мочеvine содержится около 46,2% (Досон.Р. и др., 1991).

Аммиачная селитра ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , другие названия – нитрат аммония, азотнокислый аммоний, аммонийная соль азотной кислоты). Имеет вид белых с розовым оттенком гранул. Основное действующее вещество – азот. Его содержится в составе удобрения от 26% (низкие сорта), до 36% (высшие сорта). Является универсальным и быстродействующим удобрением (Минеев В.Г., 2004).

Если сравнивать мочевины и нитрат аммония, выявляются такие свойства:

- подкисляющее влияние на почву у мочевины более слабое, чем у аммиачной селитры;
- при большой концентрации мочевины вблизи высеваемых семян резкое понижение всхожести, нитрат аммония же влияет положительно;

- при очень низком значении азота в почве для мочевины дополнительно необходимо внесении органических удобрений, аммиачная селитра данных действий не требует (Смирнов П.М., Муравин Э., 1984).

В то же время, традиционные методы внесения удобрений не могут в полной мере обеспечить оптимальную их концентрацию на протяжении всего периода роста растений. Интенсивность протекающих в растениях биохимических и ростовых процессов, а, следовательно, и нуждаемость в элементах питания различны на отдельных этапах онтогенеза (Волошин Е.И., 2007).

Определение потребности сельскохозяйственных культур в элементах питания в отдельные фазы их роста и развития имеет большое практическое значение при установлении оптимального срока и способа внесения удобрений.

Наряду с избирательностью, растениям характерна неравномерность потребления элементов питания в течение вегетации. Несмотря на существенные различия динамики потребления питательных веществ у разных видов растений, все они имеют общие закономерности питания: потребление питательных веществ тесно коррелирует с нарастанием сухой массы. Наиболее высокие требования к обеспеченности элементами питания растения предъявляют на ранних этапах развития. В этот период даже небольшой дефицит элементов питания в почве может лимитировать процессы роста и развития растений из-за слабого потребления элементов питания неразвитой корневой системой. У всех сельскохозяйственных культур содержание элементов питания максимально на ранних стадиях развития и по мере созревания постепенно снижается в 2-4 раза. Динамика потребления элементов питания в значительной мере обуславливается биологическими, сортовыми особенностями сельскохозяйственных культур, фазой их развития и погодными условиями (Клевке В. Л., и др, 1956).

В момент внесения удобрения создается его наибольшая (пиковая) концентрация в почве, которая затем снижается за счет потребления удобрения растениями и его вымывания из почвы с дождевыми водами. Последнее особенно характерно для азотных удобрений, вследствие высокой подвижности минеральных соединений азота в почве по сравнению с другими питательными веществами. Одним из способов преодоления данной проблемы является связывание удобрений с веществами-носителями, которые могут обеспечить замедленный выход внесенного удобрения в почву, и тем самым обеспечить его относительно стабильные концентрации на протяжении необходимого времени (Горбатов и др., 2008).

На данный момент в мире применяют различные методы депонирования удобрений в матрикс из биоразрушаемых полимеров и с помощью покрытия гранул удобрений различными полимерами, создавая конструкцию со структурой ядро-оболочка (Зарубин В.Г., 2005).

В работе (Woudneh, M.B. et al 2007) исследовали способность к биодegradации 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 биодegradации 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 биодegradации образцов. Данный эксперимент доказал возможное применение данных полимерных матриксов в качестве матрикса для бактериальных удобрений.

В исследовательской работе (Sudesh, K. et al, 2000.) приведена оценка выхода удобрения – Нитроаммофоска 6-20-30 депонированного в

полимерный матрикс. В качестве матрикса были использованы полимеры полисульфон, этилцеллюлоза и полиакрилонитрил. Изделия с включением препарата готовили следующим образом: гранулы удобрения постепенно опускали в полимерный раствор, где происходило покрытие удобрения тонким полимерным слоем, а затем их опускали в осадительную ванну, где продолжался процесс формирования полимерного покрытия. Выявлено, что структура полимерного покрытия контролирует диффузию элементов из внутренней части гранул удобрений. По данным исследования было подтверждено, что использование таких полимерных покрытий снижает растворимость и скорость выхода веществ удобрения. Было выяснено, что с понижением пористости покрытия происходит уменьшение скорости выхода питательных веществ из гранул. Самый низкий выход удобрения наблюдался в случае покрытия гранул полисульфоном, так как пористость покрытий была минимальная. В случае с покрытием из этилцеллюлозы наблюдалось что скорость выхода удобрения была максимальной. Следовательно выход активных веществ удобрения может контролироваться с помощью использования различных типов полимерных покрытий гранулированных удобрений.

В работе ( Abe, H, Doi Y.,1996.) на примере удобрения железного купороса, покрытого полимером этилен винилацетатом, исследована динамика выхода препарата в почвенную среду. Из удобрений были изготовлены микрокапсулы, которые затем погружали в полимер и высушивали при комнатной температуре. Данную обработку проводили до тех пор, пока полимерное покрытие данной системы в процентном соотношении не достигало 10% от общей массы. Выход ионов железа в почву проходил медленно и через 168 часов составил 90%. Скорость выхода ионов железа из микрокапсул намного уменьшился благодаря полимерному покрытию. За 48 часов выход активного вещества из полимерных конструкций составил 58%, когда как из микрокапсул без полимерного покрытия за тот же период времени выход составил-80%.

Так же изучены были такие работы как, дозированное внесения удобрений в почву, инкапсулирования удобрений в матрикс ПГА, покрытие биополимером гранул мочевины (Milene M. E. et al., 2013). Депонирования удобрений в матрикс из биоразрушаемых полиэфиры – полисульфона, поливинилхлорида, полистирола, этилцеллюлозы или полиакрилонитрила (Tomaszewska, 2006; Jarosiewicz, Tomaszewska, 2003; Han et al., 2009). Постепенное высвобождение минеральных удобрений, покрытых СО-полиэфирной пленкой (Gabriela NEATA. et al., 2012) и др.

Данные примеры, о применении различных методов включения удобрения в полимерный матрикс свидетельствуют о том, что использование новых форм удобрений пролонгированного действия, приводит к снижению их концентрации в природных экосистемах, а так же, что биоразрушаемые полимерные материалы, перспективны для депонирования удобрений.

## **1.2. Полигидроксиалканоаты – природные полиэфиры нового поколения**

Полигидроксиалканоаты и являются биоразрушаемыми полимерными материалами. ПГА обладают термопластичностью, пьезоэлектрическим эффектом, антиоксидантными свойствами, оптической активностью, и, что самое главное, они характеризуются биосовместимостью и биоразрушаемостью. (Волова и др., 2013). Полигидроксиалканоаты чрезвычайно различаются между собой по структуре и свойствам (температуре плавления, гибкости, кристалличности, и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата. Более того, возможности получения на основе ПГА композитов с различными природными и синтетическими материалами, позволяющие направленно изменять их структуру, состав и, следовательно, базовые свойства материала – механическую прочность, пластичность, температурные и другие характеристики, еще более усиливает

привлекательность ПГА и расширяет возможные сферы применения (Войнова О.Н., и др., 2009.).

Свойство термопластичности и изменения прочности, придает им линейная структура молекул ПГА (возрастание по направлению растяжения). Материал размягчается и приобретает текучесть при нагревании, т.е. молекулярные цепи в ПГА легко сдвигаются относительно друг друга. Данное технологическое свойство имеет большую коммерческую ценность, так как позволяет с использованием различных методов (прессования, экструзии и др.) получать из ПГА разнообразные изделия и материалы (Бояндин А.Н.и др. ,2012). Следует отметить, что при переработке и прессовании широко используемых в настоящее время многих синтетических пластиков необходимы различные добавки (стабилизаторы, наполнители, красители и пр.). Этого можно избежать при переработке полигидроксиалканоатов, которые хорошо формуются из растворов и порошков. Гомогенный полигидроксибутират по механическим свойствам сходен с полипропиленом и полистерином, однако обладает лучшими газобарьерными свойствами (например, по отношению к кислороду) и большей устойчивостью к ультрафиолету, характеризуется также хорошей водостойкостью и теплоустойчивостью, при этом его проницаемость для водяного пара втрое ниже по сравнению с полипропиленом (Волова Т. Г. и др.,2003) .

Биосинтез полигидроксиалканоатов — сложный многоступенчатый процесс, различные стадии которого катализируют специфические ферменты. Наиболее подробно этот процесс изучен на примере полигидроксибутирата (ПГБ), у различных микроорганизмов, пути синтеза практически одинаковы (*Arctobacter*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*.) ( Волова Т.Г.,и др, 2007).

Меняя условия культивирования и, используя различные штаммы микроорганизмов, можно получить ПГА разного состава и комплексы

сополимеров. При этом у многокомпонентных ПГА могут существенно меняться физико-химические свойства (Amass W. et al., 1998).

ПГА растворяются во многих синтетических и органических растворителях, однако наиболее часто применяется для этих целей является хлороформ (Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., 2011).

Из ПГА возможно получение гибких пленок различной толщины, в том числе нетканых материалов, полупроницаемых мембран, различных полых форм (бутыли, контейнеры, коробки и пр.) нитей, а также гелей и клеев. Все свойства, характерные для ПГА, делает их перспективными для применения в различных сферах, – пищевой и косметической промышленности, медицине, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и фармакологии и других сферах (Волков А.В., 2005). Масштабы применения полигидроксиалканоатов в настоящее время сдерживаются достаточно высокой стоимостью. Однако возрастающие требования к охране окружающей среды, с одной стороны, и имеющиеся перспективы снижения стоимости биополимеров за счет повышения эффективности производства, с другой, делают полигидроксиалканоаты одним из перспективных материалов XXI века. (Антонова Л.В и др., 2013)

### **1.2.1 Полигидроксибутират, его свойства**

В настоящее время известно свыше 100 различных полигидроксиалканоатов, Самый популярный, получаемый и исследуемый ПГА – это гомогенный полигидроксибутират (ПГБ).

Поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ) является продуктом биохимического ферментативного синтеза, который осуществляется в результате деятельности некоторых видов бактерий в питательной среде, объединенной азотом (глюкоза, сахароза, меласса, этанол, метанол, газовая смесь диоксида углерода и водорода и т.д.) (Чапут К. и др., 1995).

Полигидроксibuтират представляет собой бесцветное полукристаллическое гидрофобное вещество. Молекулярная масса ПГБ может составлять от нескольких сотен до миллионов Da (Шкуренко С.И и др., 2013). Эта величина зависит от типа используемого продуцента, метода экстракции полимера из биомассы и применяемых при этом растворителей, а также от условий его выращивания. Молекулярная масса полимера является очень важным параметром, так как определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. Поэтому данному параметру уделяется существенное внимание (Волова. Т. Г. и др., 2003.).

Биоферментативный синтез ПГБ - очень сложный процесс, поэтому выход конечного продукта, а также его структура и свойства во многом зависят от используемого катализатора, температуры полимеризации, питательной среды, а также способов выделения и очистки полимера ( Войнова О.Н. и др., 2009).

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, 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 биodeградации пленок, внесенных в почву, требуется всего несколько недель. Конечным продуктом биodeградации в почве является двуокись углерода ( Волова Т.Г. и др. ,1990)

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, что особенно важно при стерилизации изделий из биополимера (Шишацкая Е.И. и др., 2001).

ПГБ растворяется в ограниченном круге органических растворителей - хлороформ, метиленхлорид, пропиленкарбонат, этиленкарбонат и немногие более экзотические вещества. В определенных условиях может осуществляться биохимический синтез сополимеров ПГБ, что способствует снижению процесса кристаллизации по сравнению с гомополимером. ПГБ совместим с некоторыми синтетическими полимерами (поливинилхлорид, поливинилацетат, нейлон) и целлюлозой (Philip S. et al., 2007).

Главным свойством ПГБ является способность полимера к биоразложению. Деградация бывает гидролитической и ферментативной.

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. Поэтому изделия, изготовленные из ПГБ, являются экологически чистыми и не требуют специальной их утилизации после использования (Шамолина И.И., 1997).

В мировой практике в настоящее время ПГБ нашел свое применение в медицине в качестве рассасывающихся шовных нитей, повязок, тампонов, пластин и стержней в ортопедии. В виде пленочного материала может использоваться для упаковки и хранения пищевых изделий, для пролонгированного действия лекарственных препаратов, стимуляторов роста растений, минеральных удобрений, для чего из ПГБ изготавливаются капсулы (Kim D.Y., Rhee Y.H., 2010).

Использование биополимера в качестве пленочного материала имеет ряд преимуществ в сравнении с широко применяемыми в настоящее время синтетическими полимерами (Глухих В. В. 2012). К ним следует отнести

способность ПГБ к биодеструкции в естественных условиях. Совместимость биополимера с рядом синтетических полимеров является перспективной в плане создания новых композиционных материалов. Перспективным также считается использование ПГБ в качестве тары для хранения многих жидких и сыпучих веществ, в частности, одноразовых бутылок, флаконов. Создание из этого полимера ирригационных установок, теплиц позволит экономить трудовые затраты, необходимые для их демонтажа и утилизации. На предприятиях пищевой промышленности возможно использование ПГБ для анаэробной очистки сточных вод (Штильман М.И., 2010). Одним из важнейших преимуществ производства биополимеров взамен синтетических является возможность использования в качестве сырья постоянно воспроизводимых в природе продуктов, таких как сахар и отходы его производства, в отличие от нефти и угля, имеющих ограниченный запас в природе. Кроме того, привлекательна возможность захоронения в почве или морской воде изделий из ПГБ после их использования, где обеспечивается их полная биodeградация, что исключает загрязнение окружающей среды (Ершова О.В. и др., 2014).

Сам процесс биосинтеза также практически не дает побочных продуктов, которые не могли бы быть так или иначе использованы, т.е. производство ПГБ является безотходным. Низкая энергоемкость биосинтеза также уникальна и заслуживает внимания в условиях энергетического кризиса. Экологический аспект этих разработок настолько важен, что ПГБ наряду с некоторыми другими биополимерами за рубежом относят к стратегическим материалам (Прудникова С.В. и др., 2012). Организация НАТО выделяет немалые инвестиции для развития этого направления; приводятся обширные и глубокие исследования в этой области в Европе, США и Японии. Целесообразность использования ПГБ определяется и тем, что по своим свойствам он практически не отличается от синтетических термопластов и потому может перерабатываться на стандартном промышленном

оборудовании химических заводов, где осуществляется формирование нитей, пленок и отливка пластмассовых изделий (Бонарцева Г.А и др.,2003).

Постепенное (на протяжении месяцев) разложение ПГБ в окружающей среде с образованием безвредных продуктов делает данный полимер перспективным в качестве носителя удобрений с целью обеспечения постепенного их выхода в заданные сроки.

### **1.2.2.Поликапролактон, его свойства**

Поли-ε-капролактон — это полимер, относящийся к алифатическим сложным полиэфирам линейно-разветвленной структуры, производится из нефтехимических продуктов. (Антонова Л.В., и др. 2012).

Поликапролактон (ПКЛ) является полиэфиром с высокой степенью окристаллизованности и представляет собой полупрозрачный полимер. Способность ПКЛ образовывать эластичные и прочные нити, пленки и волокна связана с характерным линейным цепным строением молекул и большими размерами что, в свою очередь, позволяет создавать конструкции механически прочные и пластичные одновременно (Пискунов А.С., 2004.).

ПКЛ имеет низкую температуру плавления  $57^{\circ}\text{C}$  и температуру стеклования  $-62^{\circ}\text{C}$ . Предел прочности ПКЛ – 0,4 ГПа,  $400 \text{ Н/мм}^2$ . Поликапролактон хорошо растворим в дихлорметане, хлороформе (трихлорметане), ацетоне и этаноле ( Masahiro Funabashi, 2007.).

ПКЛ используется как в чистом виде, так и в виде смесей, где он хорошо совмещается с полиэтиленоксидом, поливинилметиловым эфиром, простыми эфирами целлюлозы и ограничено совмещается с полистиролом и полибутиленсукцинатом. Кроме того, химическим путем можно получить блоксополимеры с полиэтиленгликолем, с гексаметилентерефталатом, изобутиленом, с полиэтилентерефталатом, полиэтиленисукцинатом и т. д., а также тройные блоксополимеры, например, полистирол-полиэтиленоксид-поликапролактон ( Boli Ni et al., 2010.).

Совместное использование полимеров в виде смесей, дает возможность получения материалов, обладающих новым комплексом свойств (например, изменяется скорость биodeградации, физико-механических свойств, и т.д.) ( Шишацкая Е.И и др., 2002).

Токсикологические свойства поликапролактона и биodeградация. Разложение ПКЛ происходит в два этапа. Сперва молекулярная масса поликапролактона постепенно уменьшается. ПКЛ начинает расщепляться на фрагменты, по мере уменьшения молекулярной массы, 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 капроевая кислота. Причем чем ниже молекулярный вес поликапролактона, тем короче сроки деградации ( Nottelet B., et al., 2008).

Собственно капроевая кислота — это жирная кислота с водной растворимостью 9,72 мг/мл, присутствующая в различных животных жирах и нефти ( Sanchez-Verdejo et al,2008.). Производные средних триглицеридов, к которым относится капроевая кислота, широко используют для парентерального питания, в пищевых продуктах, косметической и лекарственной индустрии (Антонова Л.В. и др. ,2013).

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

Полевая почва (Красноярский край, пос. Минино) – 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 опыте была использована пшеница мягкая яровая (*Triticum aestivum*) сорт – «Алтайская 70». Пшеница - род травянистых растений, семейства Злаки (лат. *Graminea*), или Мятликовые (лат. *Poaceae*). Сорт пшеницы – «Алтайская 70» выведен двукратным индивидуальным отбором из гибрида Алтайская 98 и Алтайская 325. Среднеранний сорт – вегетационный период от всходов до восковой спелости 74-79 дней. Сорт устойчив к пыльной головне, полеганию, осыпанию и прорастанию на корню и в валках. Мучнистой росой поражается слабо. Относится к сортам интенсивного типа.

В качестве удобрений использовали нитрат аммония (аммиачную селитру) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> производства ЗАО «Чудовоагрохимсервис» (Россия).

В качестве химических реактивов были использованы:

- Калий хлористый (KCl) производства ООО ПКФ «ТД Реахим» (Россия) ТУ 6-09-2567-83
- Сегнетова соль (Калий натрий виннокислый C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub> \*4H<sub>2</sub>O) ХЧ производства ЗАО «Купавнареактив» ТУ 6-09-2677-89
- Реактив Несслера ЧДА (K<sub>2</sub>HgI<sub>4</sub>xNaOH) производства ООО ПКФ «ТД Реахим» (Россия) ГОСТ 6-09-2089-77
- Хлороформ ХЧ ЗАО «Экос-1» (Россия)

В качестве носителя удобрений для обеспечения их пролонгированного выхода в почвенную среду использовали поли-3-гидроксибутират (  $M_w=920$  кДа,  $PDI=2.52$ ) . ПГБ был получен микробным биосинтезом с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* В-10646 (штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов).

Поли-ε-капролактон (ПКЛ  $M_w=169$  кДа,  $PDI=1.86$ ) произведен компанией *Sigma-Aldrich* (США).

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

[Изъято 6 страниц]

Почва и ирригационная вода анализировалась на содержание растворенных форм аммонийного азота в конце каждой недели эксперимента, по методикам приведенные в п.2.5 и п. 2.6.

Биодеградацию полимера оценивали по убыли массы образцов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007.

## **2.4.Методика определение азота в водной среде**

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 45 мл, и добавляли к нему по 2 мл реактив 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.

## **2.5.Методика определения азота в почве**

Из стакана с почвой вынимали таблетированную форму, почва хорошо перемешивали, далее отбирали 10 г почвы и помещали в колбу на 250 мл и заливали ее 100 мл 2% раствора KCl. Колбы встряхивали в течение 1 часа.

Содержимое колбы фильтровали через воронку, с вложенным в нее складчатым фильтром ( $d=14$  см). Одновременно фильтровали контрольную пробу на чистоту реактивов и фильтров. Для этого пропускали через контрольный фильтр 100 мл 2% KCl.

В зависимости от содержания N-NH<sub>4</sub> брали 5-4 мл вытяжки и помещали в мерную колбу на 50 мл, разбавляем дистиллированной водой примерно до 40 мл. После этого прибавляли 2 мл сегнетовой соли (50% раствор) и хорошо перемешивали. Во все испытываемые колбы прибавляли по 2 мл реактива Несслера (из бюретки), доводили содержимое колб водой до метки и снова - тщательно перемешивали. В растворе сразу же начинала развиваться окраска, которая должна быть чисто желтой и светлого оттенка.

За 15-20 мин. до просмотра включают в сеть фотоэлектроколориметр и оставляют стоять прибор это время с закрытыми шторками.

Через 2-3 мин. раствор (последовательно) колориметрируют на фотоколориметре с синим светофильтром (область длин волн 400-425 нм), в кюветах длиной 3 см относительно дистиллированной воды. Количество (мг/мл) азота в растворе определяли по калибровочному графику.

## **2.6.Методика определения азота в ирригационной воде.**

[Изъято 2 абзаца]

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

### **3.1. Выход аммиачной селитры из пленочных образцов в водный раствор (Эксперимент 1)**

### **3.2. Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в водный раствор (Эксперимент №2)**

### **3.3. Выход аммиачной селитры из таблетированных образцов в почвенную среду (Эксперимент 3)**

[Изъято 7 страниц]

Таким образом, полученные данные показали возможность управления скоростью оттока аммиачной селитры из препаратов путем подбора полимерных систем при их изготовлении.

### **3.4. Выход аммиачной селитры таблетированных образцов в почву и ирригационную воду (Эксперимент 4)**

С 4-ой недели эксперимента отмечено незначительное преимущество растений из экспериментальной группы с непокрытыми формами.

Наибольший эффект был отмечен начиная с 8-ой недели и до конца эксперимент, когда растения в группе с таблетированными формами, покрытыми дополнительной полимерной пленкой, лидировали, по общей биомассе( как по корневой так и надземной части). (таблица №9).

[Изъято 6 страниц]

## **ВЫВОДЫ.**

[Изъято 1 страница]



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Abe, H. Enzymatic and environmental degradation of racemic poly(3-hydroxybutyric acid)s with different stereoregularities / H. Abe, Y. Doi // *Macromol.* – 1996. – V. 29. – P. 8683- 8688.]
2. Amass W., Amass A., Tighe B. A Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies // *Polymer Int.* – 1998. – V. 47. – P. 89,144.
3. BOLI NI, MINGZHU LIU, Multifunctional Slow-Release Organic-Inorganic Compound Fertilizer / *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 12373–12378
4. Gabriela Neata, Mona Popa, Amalia Mitelut, Silvana Guidea, Bela Pukanski. Bio-based composite use in fertilization of petunia and carnation culture. 2012.
5. Han X., Chena S., Hu X. Controlled-release fertilizer encapsulated by starch/polyvinyl alcohol coating. In: *The Third Membrane Science and Technology Conference of Visegrad Countries (PERMEA)*. 2009
6. Jarosiewicz A., Tomaszewska M. Controlled release NPK fertilizer encapsulated by polymeric membranes. *J. Agric Food Chem.* 2003
7. Kim D. Y., Rhee Y. H, Biodegradation of microbial and synthetic polyesters, 2010
8. Masahiro Funabashi, Biodegradation of Polycaprolactone Powders Proposed As Reference Test Materials for International Standard of Biodegradation Evaluation Method / *J Polym Environ* 2007, 15, 7–17
9. Milene M. E. Costa, Elaine C. M. Cabral-Albuquerque, Tito L. M. Alves, Jose Carlos Pinto and Rosana L. Fialho. Use of Polyhydroxybutyrate and Ethyl Cellulose for Coating of Urea Granules. 2013

10. Nottelet B., Pektok E., Mandracchia D. et al. Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ε-caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts // J. of Biomedical Materials Research. 2008. Part A. P. 865—875.)
11. Philip S., Keshavarz T., Roy I., J. Chem. Technol. Biotechnol. 2007.
12. Sanchez-Verdejo, M.T. Environmentally friendly slow release formulations of alachlor based on clay-phosphatidylcholine / M.T. Sanchez-Verdejo, T. Undabeytia, S. Nir, C. Maqueda, E. Morillo // Environmental Science Tech. – 2008. – V.42. – P.5779-5784.)
13. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. – 2000. – V. 25. – P. 1503–1555.]
14. Tomaszewska M., Jarosiewicz A. Encapsulation of mineral fertilizer by polysulfone using a spraying method. Desalination. 2006
15. 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.]
16. Антонова Л.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С. Возможности использования полиоксиалканоатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии: науч. стат.: СО РАМН, г. Кемерово. – 2013
17. Бонарцева Г.А., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Фурина Е.К. Получение и перспективы применения полиоксиалканоатов -экологически чистых биоразлагаемых термопластичных биополимеров// Материалы 2го Московского

международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития", 10-14 ноября 2003, Москва, ч.1.

18. Бояндин А.Н., Прудникова С.В., Филипенко М.Л., Храпов Е.А., Васильев А.Д., Волова Т.Г. Биодegradация полигидроксиалканоатов почвенными микробиоценозами различной структуры и выявление микроорганизмов-деструкторов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 1. – Стр. 35-44. (Бояндин А.Н. и др. 2012)
19. Войнова О.Н., Калачева Г.С. и др., Микробные полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов / Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 4. – Стр. 427-431.
20. Волков А. В. Синтетические материалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005. № 2. С. 43—45. (Волков А.В. 2005)
21. Волова Т. Г. Полиоксибутират – термопластичный биодegradируемый полимер (получение, свойства, применение) / Т. Г. Волова, Г. С. Калачева – Красноярск: ИБФ, 1990 – 47с. (Волова Т.Г., 1990)
22. Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины: науч. пособие: Новосибирск, издательство СО РАН, 2003.
23. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Кожевникова И.В., Штайнбюхель (2007) Биосинтез многокомпонентных полигидроксиалканоатов бактериями *wautersia eutropha*. Красноярск, с. 797-804. (Волова Т.Г., и др, 2007)
24. Волова, Т.Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. / Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. /Красноярск: Красноярский писатель, 2011 (Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. 2011)
25. Волова, Т.Г. Физико-Химические свойства полигидроксиалканоатов 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. (Волова и др. 2013)
26. Волошин Е.И. Биологические источники минерального питания растений: учеб.пособие/ Е.И. Волошин; Краснояр.Гос. Аграр. Ун-т.- Красноярск, 2011 – 114с.
- 27.Волошин Е.И. Применение местных удобрений и мелиоратов в земледелии Красноярского края: учеб. пособие/ Е.И. Волошин; Краснояр.Гос. Аграр. Ун-т.- Красноярск, 2007 – 112с. (Волошин Е.И. 2007)
- 28.Горбатов В.С. Экологическая оценка пестицидов: источники и формы информации / В.С. Горбатов, Ю.М. Матвеев, Т.В. Коннонова // Агро XXI – 2008. – № 1-3. – С. 7-9. (Горбатов и др.2008)
- 29.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 (Ершова О.В. и др. 2014)
- 30.Ефимов В.Н., Донских И.Н., Царенко В.П. Система удобрений/Под ред. В.Н. Ефимова – М.: КолосС, 2003-320с.
- 31.Клевке В. Л., Поляков Н. Н., Арсеньева Л.Технология азотных удобрений 1956. (Клевке В. Л., и др. 1956)
32. Кулешов М.Н. Содержание и динамика доступных форм азота в черноземе типичном Левобережья Лесостепи Украины / М.Н. Кулешов, Т.А. Филоненко // Вісник ХНАУ ім. В.В. Докучаєва – 2003. – № 2. – С. 8-15. (Кулешов М.Н. 2003)
- 33.Штильман М.И., Полимеры медико-биологического назначения /Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2010, том 52, №9,с. 1551-1569 ( Штильман М.И. 2010)
34. Методика определения азота - ГСО 7259-96

35. Минеев В.Г. Агрохимия: Учебник – 2-е изд., перераб. и доп.- М.: Изд-во МГУ, изд-во КолосС, 2004 – 720с., л. ил. (Минеев В.Г. 2004)
36. Муравин Э.А., Обуховская Л.В., Ромодина Л.В. Практикум по агрохимии – М.: КолосС, 2005 – 288 с.: ил.(Муравин Э.А. и др. 2005)
37. Муравин Э.А., Титова В.И. Агрохимия – М.: КолосС, 2010 – 463с.:ил. (Муравин Э.А., 2010)
38. Войнова О.Н., Калачева Г.С и др., Микробные полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов / Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 4. – Стр. 427-431. ( Войнова О.Н. и др.2009)
39. Пискунов А.С. Методы агрохимических исследований – М.: КолосС, 2004 – 312с. (Пискунов А.С. 2004)
40. Глухих В. В., Шкуро А. Е., Гуда Т. А., Стоянов О. В. Получение, свойства и применение биоразлагаемых древесно-полимерных композитов (обзор) // Вестн. КТУ. – 2012. – Т. 15, № 9. – С. 80 – 82 (Глухих В. В. 2012)
41. Порохин А.А., Завьялова З.В, Шварцман Г.М, Чикова Г.И, Зимницкая Л.И. Использование удобрений в промышленности. М-1972
42. Зарубин В.Г. Практикум по агрохимическому анализу почв.: Учеб. пособие – 3-е издание, перераб. и доп. – СПб.: Изд-во С-Петербур. Ун-та, 2005 – 88с. (Зарубин В.Г. 2005)
43. Прянишников Д.Н. Агрохимия. (Учебник). М.; Л.: Сельхозиздат, 1934.
44. Рудой Н.Г. Агрохимия почв Средней Сибири: учеб. пособие.- Красноярск: Изд-во Крас ГАУ, 2003 -167с. (Рудой Н.Г. 2003)
- 45.. Прудникова С.В, Цыремпилов В.Ц., Долговременные системы доставки удобрений на основе полигидроксиалканоатов / Journal of Siberian Federal University. Biology 3 (2012 5) 322-328 (Прудникова С.В. и др. 2012)
46. Шкуренко С.И, Монахова Е.В. и др., Полимеры из природного возобновляемого сырья /Пластические массы, №11, 2013, 36-41 (Шкуренко С.И и др, 2013)

47. Смирнов П.М., Муравин Э. Агрохимия. 1984. - 2-е изд., перераб.
48. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. / -М.: Мир, 1991. - 544 с., ил. ISBN 5-03-001032-7. (Досон Р. и др., 1991)
49. Тасекеев М.С., Еремеева Л.М. Производство биополимеров как один из путей решения проблем экологии и АПК. 2009.
50. Капуцкий Ф.Н., Тикавый В.Ф, Химия - Минск: Выш. школа, 1979. - С. 384. (Капуцкий Ф.Н., Тикавый В.Ф, 1979)
51. Цыремпилов В.Ц. Конструирование новых форм доставки удобрений. 2012
52. Чапут К., Яхиа Х., Ландри Л. и др. Полигидроксibuтират бактериального происхождения, как поверхность для культивирования фибробластов связок позвоночника пациента // 1995. Т. 3, № 1—2. С. 21—30. (Чапут К. и др. 1995)
53. Шамолина, И.И. Перспективы использования микробного сырья при получении волокнистых и пленочных материалов / И.И. Шамолина // - Химические волокна. - 1997. - № 1. - с. 3-10. (Шамолина И.И., 1997)
54. Шишацкая Е.И., Волова Т.Г., Пузырь А.П. и др. Биодegradация полиоксиалканоатов в биологических средах // Перспективные материалы. 2002. № 2. С. 57—62
55. Шишацкая Е.И., Еремеев А.В., и др. Исследование свойств биодергадируемых полимеров (полиоксиалканоатов) в культуре животных клеток // 2001. № 3. С. 40—47. (Шишацкая Е.И. и др. 2001)

[Изъято 8 страниц]