

МІКРОБНА ДЕСТРУКЦІЯ ГУАНІДИНОВМІСНИХ ПОЛІМЕРІВ

Ж. П. КОПТЄВА¹, М. Я. ВОРТМАН², Г. О. ІУТИНСЬКА¹, Г. Є. КОПТЄВА¹,
Д. Р. АБДУЛІНА¹, В. М. ЛЕМЕШКО², А. В. ТЕРЕБІЛЕНКО³,
А. М. ПИЛИПЕНКО², В. В. ШЕВЧЕНКО²

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;

² Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, Київ;

³ Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

Вивчено деструкцію гуанідиновмісних полімерів, а також хімічні і фізико-механічні властивості синтезованих матеріалів за впливу вуглеводеньокиснювальних бактерій (ВОБ). За допомогою сканувальної електронної мікроскопії на їх поверхні виявлено формування біоплівки ВОБ. Встановлено, що такі полімери пригнічують каталазу і ліполітичну активність у 1,3–3 рази проти контрольного середовища і їх деструкція незначна (4,4...6,53%). Міцність на розрив та відносне видовження матеріалів практично не змінюються за 180 days експерименту, що узгоджується з результатами ІЧ-мікроскопії. Метод термогравіметричного аналізу засвідчив, що початкова температура розкладу досліджуваних матеріалів не знижувалась, тобто їх властивості після впливу ВОБ не змінились. Припускали, що під впливом бактерій на поверхні полімерів, можливо, відбувалась незначна біодеструкція. Отже, випробуваний матеріал на основі поліуретану є перспективним для захисту різних конструкцій від біопшкоджень.

Ключові слова: гуанідиновмісні полімери, біодеструкція, вуглеводеньокиснювальні бактерії, ферменти, ІЧ-мікроскопія, термогравіметрія, міцність до розриву, відносне видовження.

The fracture of guanidine-containing polymers and the chemical and physicochemical properties of the synthesized materials under the influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria (HOB) were studied. Scanning electron microscopy revealed the formation of a HOB biofilm on the surface of the studied materials. Such polymers inhibited catalase and lipolytic activity in 1.3–3 times compared to the environment under control. According to the obtained data, the fracture of guanidinium polymers was insignificant (4.4...6.53%). The physicochemical properties of the materials – tensile strength and relative elongation practically did not change during 180 days of the experiment. These results are consistent with the results of IR microscopy. The method of thermogravimetric analysis showed that for the two studied materials the initial temperature of decomposition did not decrease and their properties after exposure to the HOB did not change. It is can be assumed that under the influence of bacteria on the surfaces of these polymers, minor surface biodegradation may have occurred. Therefore, the tested polyurethane-based material is promising for protecting various structures against biodamage.

Keywords: guanidine-containing polymers, biodegradation, hydrocarbon-oxidizing bacteria, enzymes, IR microscopy, thermogravimetry, tensile strength, relative elongation.

Вступ. Полімери часто використовують через їх унікальні механічні та термічні властивості, а також хімічний склад. Крім того, вони – потенційні джерела вуглецю та енергії для гетеротрофних мікроорганізмів, що викликають біопшкодження матеріалів з подальшим їх руйнуванням [1–3]. Пошук нових перспективних матеріалів, стійких до впливу мікроорганізмів, залишається своєчасним і актуальним. Встановили, що різні за хімічним складом захисні матеріали (нафто-

бітумні, поліетиленові, полівінілхлоридні, поліуретанові) стимулюють життєдіяльність бактерій – збудників корозії. Один зі способів підвищити мікробіологічну міцність покриттів – модифікація біоцидними речовинами, які пригнічують розвиток агресивних мікроорганізмів [1, 2, 4]. Тут привертають увагу гуанідинієві олігомери та полімери. Механізм біоцидної дії полігуанідинів і четвертинних амонієвих сполук подібний і має мембрано-токсичний характер. Гуанідинієві полімери менш токсичні, ніж гуанідин, і належать до третього класу небезпеки.

Нижче подано результати дослідження поліетергуанідинуретану та поліетергуанідину сітчастої будови. У літературі є інформація про біодеградацію поліуретанів та полігуанідинакрилатів і відсутня про поліетергуанідинів [5, 6]. Тому важливо вивчити здатність мікроорганізмів використовувати гуанідиновмісні полімери як джерело вуглецю та впливати на їх біодеградацію. Досліджували їх біодеградацію під дією гетеротрофних бактерій – деструкторів традиційних покриттів, вивчали деструкцію гуанідиновмісних полімерів, а також визначали хімічні і фізико-механічні властивості синтезованих матеріалів за впливу вуглеводеньокиснювальних бактерій (ВОб).

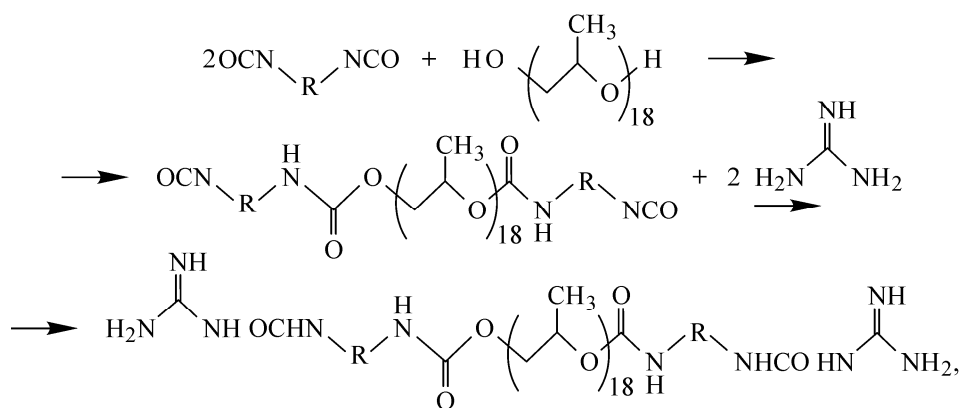
Матеріали і методи досліджень. Вивчали мікробну деструкцію поліетергуанідину та поліетергуанідинуретану. Як тест-культури використовували штами ВОб *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138, які виділили з пошкоджених покриттів газогонів. Їх вплив на випробовувані матеріали досліджували за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$ у рідкому середовищі Таусона [7]. Деструкцію зразків визначали за відомою методикою [8].

Ензиматичні дослідження. Ліполітичну активність визначали спектрофотометрично, використовуючи прилад КФК-3 (Росія), каталазну активність, – застосовуючи 0,03%-ий пероксид водню [9, 10], білок у надосадовій рідині – методом Лоурі. Формування біоплівки на поверхні матеріалів вивчали методом сканувальної електронної мікроскопії з допомогою мікроскопа SEM JSM 6060LA в Інституті ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України.

Зміни хімічного складу матеріалів вивчали методом ІЧ-спектроскопії. Спектри реєстрували методом порушеного повного внутрішнього відображення на приставці ATR у спектральній ділянці розміром $400\text{--}4500\text{ cm}^{-1}$, використовуючи прилад “TENSOR-37” (Bruker Optik, Німеччина); ^1H ЯМР спектри знімали на приставці “Varian VXR-400 MHz” у хлориді кадмію. Зміни маси зразків залежно від температури вивчали на термогравіметричному аналізаторі Q50 (“TA Instruments”, США) в інтервалі температур від кімнатної до 700°C зі швидкістю нагрівання $20^\circ\text{C}/\text{min}$ у повітрі. Міцність до розриву та відносне видовження матеріалів визначали за відомими методами [6].

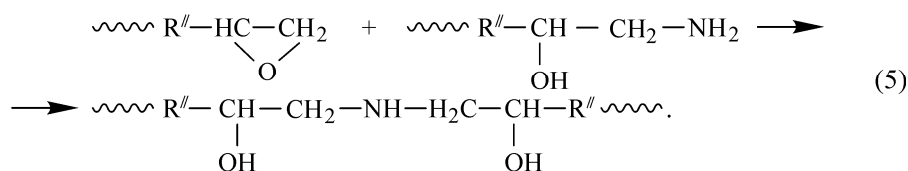
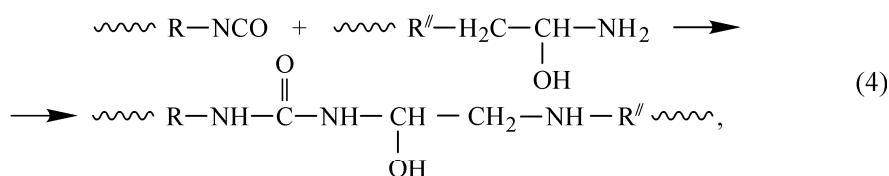
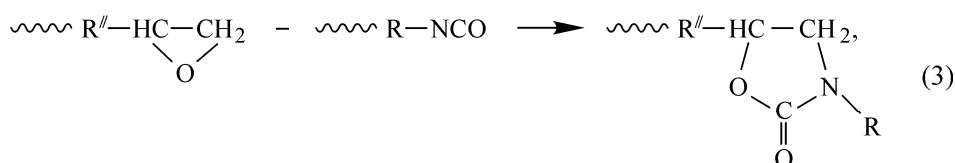
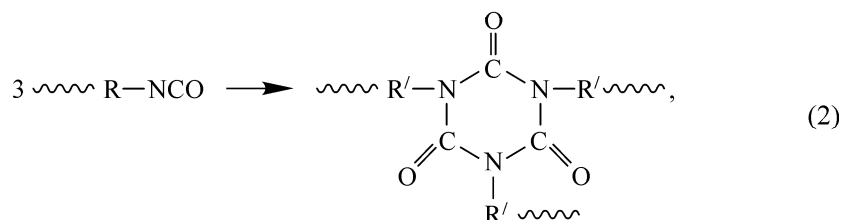
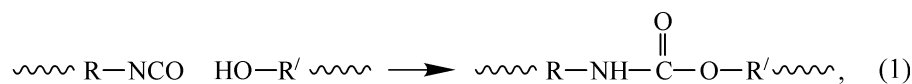
Синтез гуанідиновмісних сітчастих поліетерів та поліетеруретанів. Як вихідні сполуки використовували олігоепоксид Epucote 828 (Німеччина) із 25% епоксидних груп та ДЕГ-1 (ММ 300).

Отримали сітчастий композит під час тверднення композиції, яка містить біта трифункціональний поліетер, олігоепоксид, ізоціанатний аддукт та розчинник (матеріал 1). Вживали поліетери поліоксіпропілентріол (ММ 500) та поліоксіпропілендіол (ММ 1000), олігоепоксид Epucote 828, як ізоціанатний компонент – аддукт толуїлендіізоціанату та триметилпропану із 29...30% ізоціанатних груп, як гуанідиновий складник – олігомер блочної будови за масового співвідношення компонентів 1:3:1,8:6:2, як розчинник – етилацетат, бутилацетат, циклогексанон, ксилол і метилетилкетон за масового співвідношення 1:1:2:0,5, відповідно. Олігомер синтезували за кімнатної температури, постійно додаючи розчин ізоціанатного форполімеру у розчин гуанідину в диметилформаміді за мольного співвідношення компонентів 1:2. Концентрація розчину становила 50%. Схему будови блочного олігомера для отримання матеріалу 1 можна подати так:



де R = 2,4-, 2,6-C₆H₃(CH₃).

Будову олігомера оцінювали методом ІЧ-спектроскопії. На залежностях, отриманих ним, відсутні смуги поглинання ізоціанатних груп за частоти 2270 см⁻¹ та з'явилася смуга поглинання сечовинної групи за частоти 1680 см⁻¹. Під час отримання матеріалу 1 можливі такі реакції: уретаноутворення, тримеризації, формування оксизолідону, уретансечовини та олігоетера:



Щоб одержати матеріал 2, спочатку синтезували гуанідиновмісний олігомер. У реактор завантажували 30 г олігоепоксиду ДЕГ-1 (ММ 300) (0,1 mol), який розчиняли в 80%-му етанолі, поступово додаючи спиртовий розчин 10,9 г гуанідину (0,2 mol) у 10,9 г етанолу. Реакція тривала 2...3 h при 50...60°C. Її завершення контролювали методом ІЧ-спектроскопії за зникненням смуг поглинання епоксидних груп за частоти 920 см⁻¹, молекулярна маса отриманого продукту 580 g/mol. Схе-

Таблиця 1. Кількість ВОБ у середовищі Таусона за присутності гуанідиновмісних полімерів

Варіант досліджу		Кількість бактерій
Контрольне середовище Таусона	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 109	$5,0 \cdot 10^8$
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 102	$1,5 \cdot 10^9$
	<i>Bacillus subtilis</i> 138	$3,6 \cdot 10^7$
Середовище Таусона + матеріал 1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 109	$1,0 \cdot 10^6$
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 102	$1,0 \cdot 10^6$
	<i>Bacillus subtilis</i> 138	$2,0 \cdot 10^3$
Середовище Таусона + матеріал 2	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 109	$1,0 \cdot 10^6$
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 102	$1,0 \cdot 10^6$
	<i>Bacillus subtilis</i> 138	$2,0 \cdot 10^3$

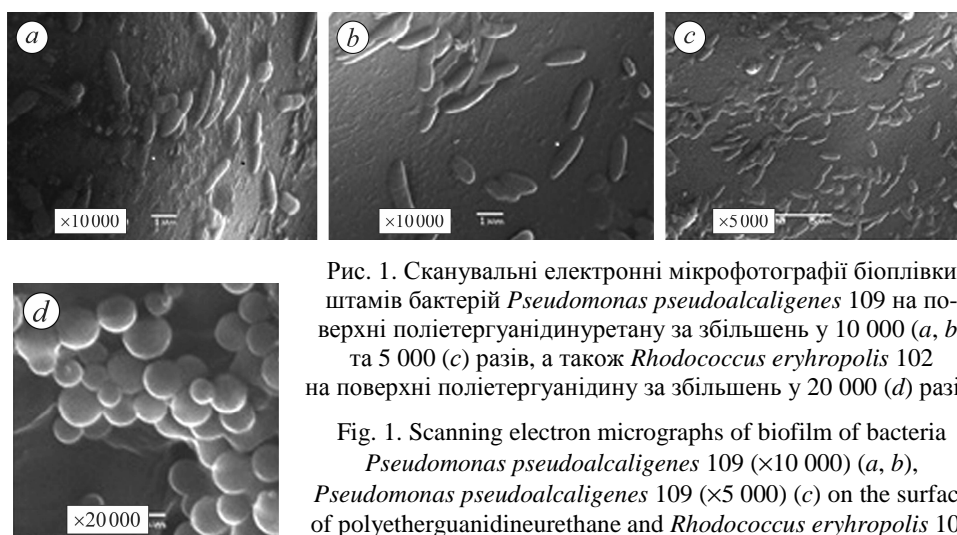


Рис. 1. Сканувальні електронні мікрофотографії біоплівки штамів бактерій *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109 на поверхні поліетергуанідинуретану за збільшень у 10 000 (a, b) та 5 000 (c) разів, а також *Rhodococcus erythropolis* 102 на поверхні поліетергуанідину за збільшень у 20 000 (d) разів.

Fig. 1. Scanning electron micrographs of biofilm of bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109 ($\times 10\,000$) (a, b), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109 ($\times 5\,000$) (c) on the surface of polyetherguanidineurethane and *Rhodococcus erythropolis* 102 ($\times 20\,000$) (d) on the surface of polyetherguanidine.

Показником деградації матеріалу є втрата маси зразків під дією ВОБ, за якою розраховували відсоток деструкції (D). Найбільшої деструкції зазнав поліетергуанідин (рис. 3) (5,67... 6,53%). У контрольному варіанті (без бактерій) вона становила 5,78%, у присутності поліетергуанідинуретану – 4,33...4,95%, а в контрольному варіанті – 4%. Отже, уретановий складник зменшує відсоток деструкції нового матеріалу в 1,3–1,5 раза.

Зміну структури матеріалів після впливу ВОБ визначали методами ІЧ-спектроскопії. На рис. 4 подані ІЧ-спектри зразків поліетергуанідинів після 180 days експозиції. І в спектрах контрольних зразків, і в спектрах матеріалів за впливу тест-культур бактерій присутні смуги поглинання за частот 3156 cm^{-1} ; 2949 ; 2896 ; 2868 ; 1648 та $1100\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ сполук (NH, OH), (CH₃), (CH), (CH₂), (C=N), (C–O–C), відповідно. Склад досліджуваних матеріалів в агресивному середовищі хімічно не змінився, тобто бактерії не вплинули на смуги поглинання. Виявили, що міцність до розриву та відносне видовження гуанідиновмісних полімерів після впливу ВОБ практично не змінились (табл. 2).

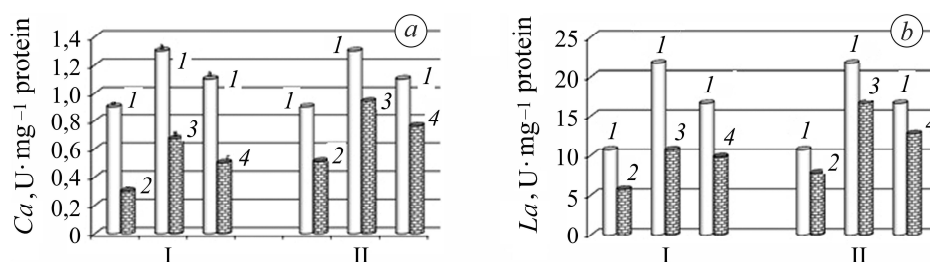


Рис. 2. Каталазна (Ca) (a) та ліпазна (La) (b) активність вуглеводеньокиснювальних бактерій у присутності полімерних матеріалів: I – поліетергуанідинуретан; II – поліетергуанідин; 1 – контрольне середовище; 2–4 – штами бактерій *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102 та *Bacillus subtilis* 138.

Fig. 2. Catalase (Ca) (a) and lipolytic (La) (b) activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the presence of polymeric materials: I – polyetherguanidinurethane; II – polyetherguanidine; 1 – control environment; 2–4 – *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, and *Bacillus subtilis* 138.

Таблиця 2. Фізико-механічні властивості полімерних матеріалів після дії ВОБ

Варіанти досліду	Поліетергуанідинуретан		Поліетергуанідин	
	міцність до розриву, МПа	відносне видовження, %	міцність до розриву, МПа	відносне видовження, %
Контрольне середовище	20,7 ± 0,2	266,0 ± 0,7	19,1 ± 0,5	54,4 ± 1,2
Штам <i>P. pseudoalcaligenes</i> 109	23,0 ± 0,1	268,8 ± 0,7	15,6 ± 0,3	43,2 ± 1,7
<i>R. erythropolis</i> 102	20,6 ± 0,1	265,7 ± 0,8	16,2 ± 0,3	43,8 ± 1,5
<i>B. subtilis</i> 138	21,3 ± 0,1	266,0 ± 0,7	16,0 ± 0,3	45,6 ± 1,5

Рис. 3. Деструкція полімерних матеріалів за впливу вуглеводеньокиснювальних бактерій: I – поліетергуанідинуретан; II – поліетергуанідин; 1 – контрольне середовище; 2–4 – штами бактерій *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102 та *Bacillus subtilis* 138.

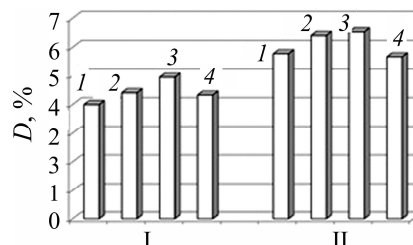


Fig. 3. Degradation of polymeric materials under the influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria: I – polyetherguanidine urethane, II – polyetherguanidine; 1 – control environment, 2–4 – *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102 and *Bacillus subtilis* 138.

Однак ці характеристики поліетергуанідину зменшились у 1,2–1,3 раза. Падіння відносного видовження свідчить, що під впливом бактерій цей матеріал стає жорсткішим і може легко втрачати міцність. Навпаки, тест-культури гетеротрофних бактерій не змінювали його. Отже, синтезовані полімерні матеріали не втратили фізико-механічних властивостей після впливу ВОБ. Одержані результати корелюють з даними ІЧ-спектроскопії.

Зміни структури матеріалів після впливу ВОБ визначали також методом термогравіметричного аналізу (ТГА) (рис. 5). Виявили, що початкова температура деструкції для матеріалів 1 та 2 не знижувалась.

Матеріал 1 розкладався у чотири стадії, а матеріал 2 – у дві (чотири та два піки, відповідно, на термограмах). Початкова температура розкладання першого після впливу ВОБ перевищувала 290°C, при 330...370°C розкладалися уретанові та гуанідинові групи.

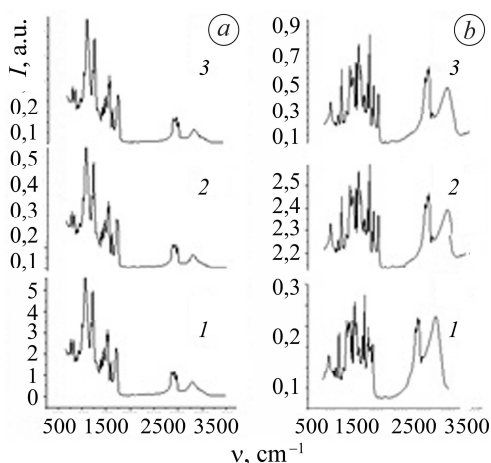


Рис. 4. ІЧ-спектри зразків гуанідино-вмісних полімерів за впливу вуглеводень-окиснювальних бактерій: *a* – поліетергуанідинуретан; *b* – поліетергуанідин; 1 – вихідний; 2 – контрольне середовище; 3 – штам бактерій *Rhodococcus erythropolis* 102.

Fig. 4. IR-spectra of samples of hunidine-containing polymers under the influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria: *a* – polyetherguanidine urethane; *b* – polyetherguanidine; 1 – original; 2 – control environment; 3 – *Rhodococcus erythropolis* 102.

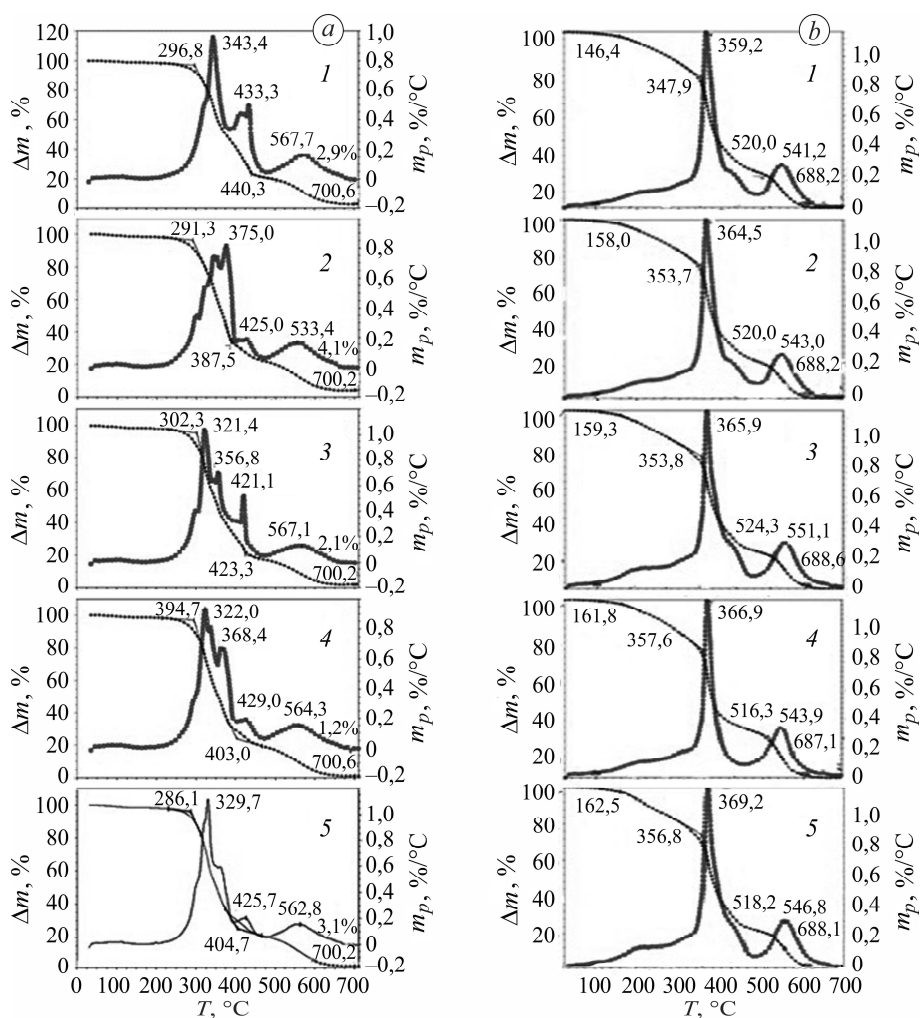


Рис. 5. Термограми зразків матеріалів 1 (*a*) та 2 (*b*) упродовж 180 days експозиції під впливом ВОБ: 1 – вихідний матеріал; 2–4 – штами бактерій *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102 та *Bacillus subtilis* 138; 5 – контрольне середовище.

Fig. 5. Thermograms of samples of material 1 (*a*) and 2 (*b*) after exposure to HOB for 180 days of exposure: 1 – original material; 2–4 – *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102 and *Bacillus subtilis* 138; 5 – control environment.

При 520...550°C відбувались глибинні процеси, пов'язані з розпушуванням та окисненням вуглеводневого скелета полімеру. Початкова температура розкладання матеріалу 2 становила ~ 160°C, а гуанідинові групи розкладалися при 360...370°C. При 540...550°C також протікали аналогічно глибинні процеси. Оскільки для цих матеріалів початкова температура розкладу не знижувалась, а в деяких випадках і підвищувалась, то можна вважати, що новосинтезовані полімери не втратили властивостей після впливу ВОБ.

Обговорення результатів. Виявили, що ВОБ здатні рости за присутності гуанідиновмісних полімерів і використовували їх як єдине джерело карбону, які при цьому пригнічували цей процес. Досліджувані раніше полімери (поліетилен 980-25, поліуретан, полівінілхлорид) стимулювали розвиток гетеротрофних бактерій, кількість яких у відповідних середовищах збільшувалась на 2–4 порядки проти контрольного [1, 10].

З допомогою електронної сканувальної мікроскопії виявили, що ВОБ прилипають до поверхні гуанідинієвих полімерів. Крім того, сформована на поверхні біоплівка також вказує на те, що в екстремальних умовах (в середовищі без органічних речовин) бактерії прикріплюються до неї як до єдиного джерела вуглецю. Вони метаболічно активні і здатні пошкоджувати захисні матеріали – потенційне джерело енергії і живлення [1, 2, 14]. Біоплівки також захищають мікробну сукупність від стресів довкілля та сприяють їх виживанню [1,11, 12].

Одним з механізмів біодеградації полімерів є участь у ньому ферментів [12]. У наших дослідах гуанідинієві полімери пригнічували каталазу і ліполітичну активність у 1,3–3 рази проти контрольних варіантів. Причиною біопошкодження захисних матеріалів є синтез корозійно-активними бактеріями гідролази, зокрема ліпази, яка руйнує етерні зв'язки, що може призвести до розриву полімерних ланцюгів і послаблення міцності матеріалу [7, 10]. Біодеградація – складний гетерогенний процес, що викликає розкладання полімерів. Мікроорганізми безпосередньо задіяні у ньому [13]. За отриманими результатами, деструкція гуанідинієвих полімерів незначна (від 4,4 до 6,53%). Найбільшої деструкції зазнав поліетергуанідин, але з введенням уретанового складника вона послабилась.

Згідно з отриманими даними, міцність на розрив та відносне видовження практично не змінилися за 180 days експерименту, що узгоджується з результатами ІЧ-мікроскопії. Склад матеріалів в середовищі з агресивними бактеріями хімічно не змінився. Аналогічні результати отримали під час випробувань поліетергуанідиакрилатів [10]. Методом ТГА виявили, що початкова температура розкладу матеріалів 1 і 2 не знижувалась, а в деяких випадках навіть підвищувалась. Тому можна вважати, що новосинтезовані полімерні матеріали не втратили властивостей після впливу ВОБ.

ВИСНОВКИ

Гуанідиновмісні полімери, внесені в середовище Таусона як джерело карбону, зменшували кількість ВОБ на 2–4 порядки проти контрольного. Ферментативна їх активність у присутності цих полімерів знижувалась, каталазна та ліпазна активність за наявності в середовищі гуанідинового полімера з уретановим складником у 1,4–1,7 рази менша, ніж за наявності поліетергуанідину. Найбільшої мікробної деструкції зазнав поліетергуанідин (5,7...6,5%). З введенням уретанового складника вона знизилась у 1,5 рази. За результатами ІЧ-спектроскопії бактерії не змінюють хімічний склад полімерів, окиснювальні процеси і руйнування ланцюгів не відбуваються. Міцність на розрив і відносне видовження поліетергуанідинів суттєво не змінюються після впливу ВОБ.

1. *Мікробна корозія підземних споруд* / К. І. Андреюк, І. П. Козлова, Ж. П. Коптева, А. І. Піляшенко-Новохатний, В. В. Заніна, Л. М. Пуріш. – К.: Наук. думка, 2005. – 260 с.

2. *Mohan K. S. and Srivastava T.* Microbial deterioration and degradation of polymeric materials // *J. Biochem Techn.* – 2010. – **2**, № 4. – P. 210–215.
3. *Gu Ji-Guang and Gu Ji-Dong.* Methods currently used in testing microbiological degradation and deterioration of a wide range of polymeric materials with various degree of degradability. A review // *J. of Polymers and the Environment.* – 2005. – **13**, № 1. – P. 65–74. DOI:10.1007/s10924-004-1230-7
4. *Larkin M. J., Kulakov L. A., and Allen C. C.* Biodegradation and Rhodococcus – masters of catabolic versatility // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2005. – **16**, № 3. – P. 282–290. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.04.007
5. *Fungicidal and bactericidal activity of the alkyl-substituted guanidine-containing oligomers / M. Ya. Vortman, Yu. B. Pysmenna, A. I. Chuenko, D. R. Abdulina, Zh. P. Kopteva, A. E. Kopteva, A. V. Rudenko, V. V. Tretyak, V. N. Lemeshko, and V. V. Shevchenko // Mikrobiol. Zhurnal.* – 2020. – **82**, № 6. – P. 54–63. DOI: 10.15407/microbiol82.06.054
6. *Коптева Ж. П., Заніна В. В.* Мікробні біоплівки на захисних покриттях підземних металевих споруд // *Мікробіол. журн.* – 2008. – **70**, № 4. – С. 71–85.
7. *Microbial destruction of polymeric materials: polyethylene foam, ethylene vinylacetate, and rubber / D. R. Abdulina, Zh. P. Kopteva, A. E. Kopteva, and M. Ya. Vortman // Materials Science.* – 2022. – **57**, № 4. – P. 562–571. <https://doi.org/10.1007/s11003-022-00579-w>
8. *Divjalakshmi S. and Subhashini A.* Screening and isolation of polyethylene degrading bacteria from various soil environments // *J. of Environmental Sci. Toxicology and Food Techn.* – 2016. – **10**. – P. 1–7.
9. *Biodegradation and antimicrobial activity of guanidine-containing polyethylene oxide hydrogel / G. O. Iutynska, N. Ya. Vortman, D. R. Abdulina, Zh. P. Kopteva, A. Ye. Kopteva, A. V. Rudenko, V. V. Tretyak, V. N. Lemeshko, and V. V. Shevchenko // Biotechnologia Acta.* – 2020. – **13**, № 4. – P. 60–70. DOI:10.15407/biotech13.04.060
10. *Microbial degradation of polyetereguanidinacrylates / M. Ya. Vortman, Zh. P. Kopteva, A. E. Kopteva D. R. Abdulina, G. O. Iutynska, V. N. Lemeshko, and V. V. Shevchenko // Functional Mater.* – 2022. – **29**, № 1. – P. 107–117.
11. *Belifore C., Curia M. V., and Farius M. E.* Characterization of Rhodococcus sp. A5_{wh} isolated from a high altitude Andean lake to unravel the survival strategy under lithium stress // *Rev. Argent. Microbiol.* – 2018. – **50**, № 3. – P. 311–322. DOI: 10.1016/j.ram.2017.07.005
12. *Lugauskas A., Levinskaite L. and Peculyte D.* Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials // *Int. Biodeterior and Biodegrad.* – 2003. – **52**, № 4. – P. 233–242. DOI:10.1016/S0964-8305(03)00110-0
13. *Kyrikov J. and Briassoulis E. D.* Biodegradation of agricultural plastic films: A critical review // *J. Polymer and the Environment.* – 2007. – **15**. – P. 125–150. DOI:10.1007/s10924-007-0053-8
14. *Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness / F. Ahimou, M. J. Semmens, G. Haugstad, and P. J. Novak // Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – **73**. – P. 2905–2910. DOI: 10.1128/AEM.02420-06

Одержано 10.04.2023