

*Марина ВОРТМАН¹, Дар'я АБДУЛІНА², Жанна КОПТЄВА², Ганна КОПТЄВА²,
Валентина ЛЕМЕШКО¹, Валерій ШЕВЧЕНКО¹*

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ І ЗДАТНІСТЬ ДО БІОДЕГРАДАЦІЇ ГУАНІДИНВІСНОГО ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДНОГО ГІДРОГЕЛЮ

¹*Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України
Харківське шосе, 48, Київ, 02160, Україна. E-mail: vmar1962@i.ua*
²*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна.*

*Marina VORTMAN¹, Daria ABDULINA², Zhanna KOPTEVA², Anna KOPTEVA²,
Valentyna LEMESHKO¹, Valery SHEVCHENKO¹*

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND BIODEGRADABILITY OF GUANIDINE- CONTAINING POLYETHYLENE OXIDE HYDROGEL

¹*Institute of Macromolecular Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine Kharkovske
Highway, 48, Kyiv, 02160, Ukraine. E-mail: vmar1962@i.ua*
²*D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine
Zabolotny St., 154, Kyiv, 03143, Ukraine.*

ABSTRACT

In this work the method of obtaining the guanidine-containing polyethylene oxide hydrogel were developed. Antimicrobial properties and biodegradation due to identified by us bacteria previously isolated from damaged protective coatings of gas pipelines were determined. To accomplish this aim, a guanidine-containing oligomer with a finite guanidine moiety was synthesized by reaction between a bifunctional aromatic oligoepoxide and guanidine at a molar components ratio 1: 2. Synthesis of polyethylene oxide hydrogel was carried out by reacting of oligoxyethylene glycol MW 6000 with toluylene diisocyanate and guanidine-containing oligomer at room temperature, the latter acts as a crosslinker, ion-containing and antimicrobial agent. The synthesized hydrogel had shown antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Biodegradation of hydrogels under the action of different bacterial strains and enzymes they synthesize had been studied. The presence in the environment of the studied materials lead to the reduction of catalase and lipase activity of bacteria in 1.4 - 2.5 times compare to control ones.

KEY WORDS: *guanidine-containing polyethylene oxide hydrogel, hydrocarbon-oxidizing bacteria, enzymatic activity, IR spectra.*

ВСТУП

Поліетиленоксидні гідрогелі знайшли широке застосування в різних галузях науки і техніки завдяки нетоксичності, високому ступеню набрякання, а також здатності до біорозкладання [1-5]. Один із способів отримання таких гідрогелів заснований на реакції уретанотворення в присутності зшиваючого агента. Особливе значення приділяється конструюванню рН-чутливих гідрогелів, яке здійснюється введенням регульованої кількості іонних груп співполімеризацією акрилових похідних олігооксиетиленгліколей з акриловими мономерами, що містять такі групи, або введенням іонвмісних добавок в процесі реакції уретанотворення [6-8]. Особливий інтерес представляє одержання гідрогелів з використанням похідних високоосновної сполуки гуанідин, який має антимікробну активність.

Серед гуанідинвмісних полімерів, які привернули увагу своїм практичним використанням стосовно біоцидних властивостей, найбільшого поширення набув полігексаметиленгуанідиний хлорид, який отримують поліконденсацією гексаметилендіаміну і гуанідиний хлориду [9-11]. Висока реакційна здатність гуанідинового фрагменту стимулювала

дослідження в напрямку хімічної модифікації полігексаметиленгуанідиній хлориду з метою надання йому додаткових функціональних можливостей: його похідні з метиленовими, акрилатними групами використовуються для отримання рН чутливих гідрогелів [11].

Метою даної роботи було отримання гуанідинвмісного поліетиленоксидного гідрогелю, визначення його антимікробних властивостей і біорозкладання під дією бактерій, виділених та ідентифікованих з пошкоджених захисних покриттів газопроводів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Діановий епоксидний олігомер 3,5% із вмістом 0,6%, гідроксильних груп зневоднювали нагріванням у вакуумі протягом 2-6 h при 80-90 °C та остаточному тиску 2 mm Hg. Солянокислий гуанідин (ГД) (фірма «Aldrich», ступінь чистоти 99,9%), етанол-ректифікат медичний (96%), олігооксиетиленгліколь (ОЕГ) ММ 6000 (фірма «Aldrich», ступінь чистоти 99,9%) та толуїлендіізоціанат (ТДІ) – суміш ізомерів 2,4 та 2,6 (фірма «Aldrich», ступінь чистоти 99,9%) використовували без додаткової очистки. Диметилформамід (ДМФА) очищали перегонкою.

Гуанідинвмісний олігомер (ГО) отримували за температури 50 °C протягом 2 h по реакції 0,1 mol епоксидного олігомеру в 70% розчині етанолу при перемішуванні з спиртовим розчином 0,2 M гуанідину, отриманого безпосередньо перед реакцією. Вихід кінцевого продукту становив 95%.

Отримання поліетиленоксидного гідрогелю проводили шляхом розплавлення олігооксиетиленгліколю ММ 6000 та змішуванні його з гуанідинвмісним олігомером за температури 85 °C до гомогенізації суміші за мольного співвідношення вихідних компонентів ОЕГ:ГО:1,5:(1-1,5), потім змішуванням одержаної суміші з ТДІ за мольного співвідношення вихідних компонентів 1,5:(1-1,5):2, формування гідрогелю проводили за 25 °C протягом 1 h на підложці, отверднення – за температури 80 °C протягом 4 h. Отримано два типи гідрогелю, які відрізняються мольним вмістом гуанідинвмісного олігомеру: гідргель 1- співвідношення вихідних компонентів ОЕГ:ГО:ТДІ (1,5:1:2) та гідргель 2-ОЕГ:ГО:ТДІ (1,5:1,5:2). Ступінь зшивки отриманого гідрогелю визначали за вмістом гель-фракції в апараті Сокслета в ацетоні, яка складала 93-95%.

Об'єктом дослідження був процес мікробної деструкції гуанідинвмісного поліетиленоксидного гідрогелю. Тест-культурами слугували штами вуглеводень-окиснювальних бактерій *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138, що були виділені та ідентифіковані нами раніше з пошкоджених захисних покриттів газопроводів [14,17]. Штами бактерій зберігаються у колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Бактерицидну активність до бактерій визначали диско-дифузійним методом. Використовували гідргель в конденсованому стані, його наносили на стандартні паперові диски діаметром 6 mm на поверхню агару, інкульованого відповідною тест-культурою бактерій. Інкубацію проводили протягом 18 h за температури 37 °C. Антимікробну активність виражали в mm за діаметрами зон затримки росту мікроорганізмів. Для вивчення стійкості гуанідинвмісного поліетиленоксидного гідрогелю до мікробної деструкції бактерії вирощували в рідкому середовищі Таусона з додаванням 20 ml на 100 ml середовища м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) як джерела азоту та вуглецю, за температури 28±2 °C. Зразки досліджуваних матеріалів розміром 20x20x2 mm зважували на електронних вагах (ANG-200, AXIS), стерилізували 72%-им етиловим спиртом (тривалість 30 min) та УФ-променями довжиною хвилі 256 nm (15 min) і занурювали у стерильне середовище Таусона, інкульоване одним з вищевказаних штамів бактерій у кількості 10⁶ cells/ml. Контрольними були варіанти з поживним середовищем Таусона з додаванням матеріалів без внесення бактерій. Тривалість експерименту складала 60 days. Деструкцію зразків визначали гравіметрично за втратою їхньої маси. Для цього через зазначений час експозиції досліджувані зразки виймали з культуральної рідини, висушували на повітрі, потім зважували і визначали втрату маси контрольних та дослідних зразків.

Кількість бактерій у культуральній рідині визначали методом десятикратних граничних розведень [19].

Для визначення впливу матеріалів на ферментативну активність бактерій культуральні рідини бактерій центрифугували 20 min при 2,0 g на центрифугу Eppendorf з ротором 5810R (Німеччина).

Ферментативну активність визначали у супернатанті спектрофотометрично на приладі КФК-3 (Росія) ліполітичну активність за реакцією з *n*-нітрофеніл пальмітатом [13], каталазну активність – з використанням 0,03%-ого пероксиду водню, який утворював з 4%-м розчином молібден ортофосфату стійкий забарвлений комплекс [18]. Білок у культуральній рідині визначали загальноприйнятим методом Лоурі. Питому активність досліджених ферментів розраховували за формулами, вказаними в роботах [13, 18] і виражали в $U \cdot mg^{-1}$ білку.

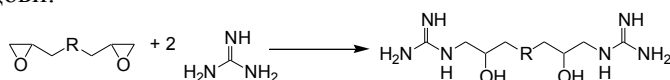
ІЧ-спектри досліджуваних матеріалів з Фур'є перетворенням отримували на спектрофотометрі "TENSOR 37" в спектральній області $6000-400 \text{ cm}^{-1}$ в таблетках KBr. Обробку результатів проводили з використанням пакета програм MS Excel 2010 і OriginPro 2016 (ver. b 9.3.226. www.originlab.com). 1H ЯМР спектри знімали на приладі "Varian VXR-400 MHz" в $CDCl_3$.

Молекулярну масу досліджували методом рідинної хроматографії на приладі «DuPont» LC 8800 Sizeexclusion з бімодальними колонками Zorbax PSM. Вимірювання проводили при температурі $35 \text{ }^\circ\text{C}$, швидкість потоку елюенту (хлороформ) складала $0,3 \text{ ml/min}$.

Ступінь набрякання одержаних поліетиленоксидних гідрогелів у воді для ін'єкцій за рН 4,0, 7,0 та 9,8 за кімнатної температури до постійних значень досліджували ваговим методом на торсійних вагах. Ступінь набрякання зразків вираховували за формулою: $\alpha = (m - m_0)/m_0$, де m_0 – маса зразка до набрякання, m – маса набряклого зразка.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для отримання поліетиленоксидного гідрогелю було синтезовано гуанідинвмісний олігомер лінійної будови.



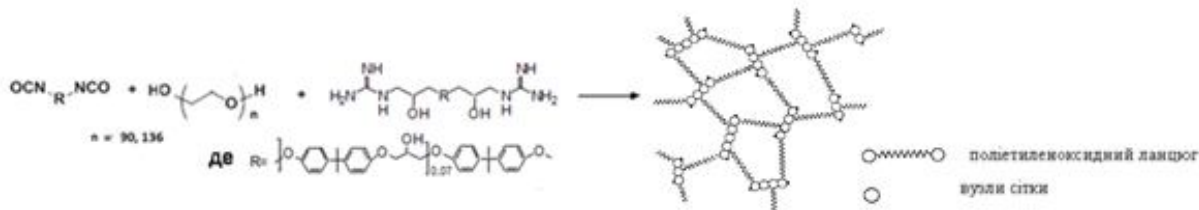
Будову отриманого олігомеру підтверджено методами ІЧ- та 1H ЯМР спектроскопії.

ІЧ (KBr): $(3200-3550) \text{ cm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (νNH , OH), 3156 cm^{-1} (δNH), 2949 (νCH), 2896 cm^{-1} ($\nu_s CH_2$), 2868 cm^{-1} (νCH_2), 1648 cm^{-1} ($\nu C=N$), $(1450-1650) \text{ cm}^{-1}$ (νC_6H_5), $(1100-1300) \text{ cm}^{-1}$ ($\nu C-O-C$).

В 1H ЯМР($CDCl_3$) спектрі гуанідинвмісного олігомера присутні сигнали протонів при 1.72 ppm (τ , 3H, $-CH_3(a)$), 2.73 ppm $-NH$ ($NH-CH_2(c)$), 2.58 ppm $-CH_2$ ($CH_2CHON(b)$), 3.58 ppm $-OH$ ($CH-OH(d)$), 3.96 ppm $-CH$ ($CH-OH(e)$), 6.8 ppm і 7.2 ppm $-CH$ (f) бензольного кільця, 8.4 ppm і 8.6 ppm $-NH$ (NH_2 групи(f)).

Методом гель проникної хроматографії (ГПХ) визначено молекулярну масу олігомери, що становить 485 g/mol , яка близька до теоретично розрахованої. Значення коефіцієнту полідисперсності синтезованого олігомеру дорівнює 1,06 та свідчить про досить вузький молекулярно-масовий розподіл.

Схему синтезу поліетиленоксидного гідрогелю можна представити наступним чином:



Будова отриманого гідрогелю підтверджується даними ІЧ-спектроскопії.

ІЧ (KBr) (νNH , OH), 3156 cm^{-1} (δNH), 2949 (νCH), 2896 cm^{-1} ($\nu_s CH_2$), 2868 cm^{-1} (νCH_2), 1648 cm^{-1} ($\nu C=N$), $(1450-1650) \text{ cm}^{-1}$ (νC_6H_5), $(1100-1300) \text{ cm}^{-1}$ ($\nu C-O-C$).

Відмінність ІЧ-спектрів гідрогелів 1 та 2 полягає в різному співвідношенні інтенсивності смуг поглинання валентних коливань $C-N$ зв'язків до валентних коливань OH та NH груп. В ІЧ-спектрів гідрогелю 2 спостерігається різке зростання смуги поглинання NH груп, оскільки молярний вміст ГО в гідрогелі 2 більше, ніж в гідрогелі 1.

Ступінь набрякання поліетиленоксидного гідрогелю становить 8.05-11,1, він є високо набухаючим та залежить від рН середовища, найбільша ступінь набрякання спостерігається в кислому середовищі.

Синтезований гідрогель проявляв антимікробну активність відносно тест-культур бактерій, діаметр зони пригнічення росту *P. pseudoalcaligenes* 109 складав 15 mm , *R. Erythropolis* 102 – 20 mm ,

B. subtilis 138 – 24 mm. На рідкому середовищі Таусона (з додаванням МПБ), інокульованому штамми бактерій і без гідрогелів (контроль), спостерігали збільшення чисельності вуглеводеньокиснювальних бактерій до 10^9 cells /ml за 60 days експерименту. У дослідних варіантах за присутності зразків гідрогелів спостерігали зменшення на 2-3 порядки кількості бактерій, відносно початкового титру.

Культури бактерій за присутності досліджуваних гідрогелів мали різну ферментативну активність в залежності від виду матеріалу (рис. 1, 2).

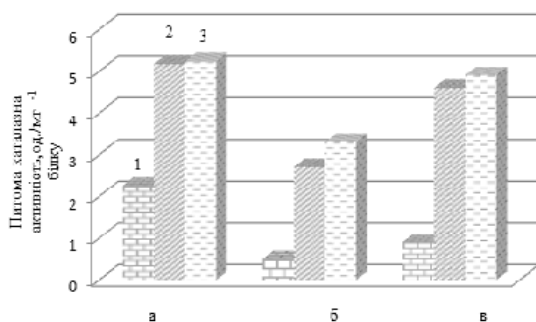


Рис. 1. Каталазна активність вуглеводеньокиснювальних бактерій за присутності гуанідинвмісних гідрогелів.

Примітка: а) без внесення матеріалу.

1 – *P. Pseudoalcaligenes* 109,

2 – *R. Erythropolis* 102, 3 – *B. subtilis* 138;

б) гідрогель 1, в) гідрогель 2.

Fig. 1. Specific catalase activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the presence of guanidine containing hydrogels. Notes: a) control (without hydrogels); 1–*P. Pseudoalcaligenes* 109, 2–*R. erythropolis* 102, 3–*B. subtilis* 138; b) hydrogel 1, c) hydrogel 2.

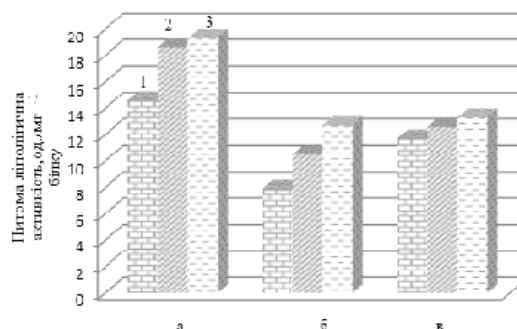


Рис. 2. Ліполітична активність вуглеводеньокиснювальних бактерій за присутності гуанідинвмісних гідрогелів.

Примітка: а) контроль (без внесення матеріалу).

1–*P. Pseudoalcaligenes* 109,

2 –*R. erythropolis* 102, 3 –*B. subtilis* 138.

б) гідрогель 1, в) гідрогель 2.

Fig.2. Specific lipase activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the presence of guanidine containing hydrogels. Notes: a) control (withouthydrogels); 1–*p. pseudoalcaligenes* 109, 2 –*R. erythropolis* 102, 3 –*B. subtilis* 138; b) hydrogel 1, c) hydrogel 2.

Каталазна активність у контролі (інокульоване бактеріями поживне середовище без внесення гідрогелів) була вищою, ніж за їх присутності. Найбільшу питому каталазну активність виявлено у *B. subtilis* 138 і *R. erythropolis* 102- $5,3 \pm 0,5$ та $5,2 \pm 0,4$ U/mg⁻¹ білку, відповідно, але за присутності досліджуваних гідрогелів активність зменшувалась в 1,1–1,9 рази. У *P. pseudoalcaligenes* 109 за присутності гідрогелів 1 і 2 вона значно знижувалась у 2,4–5,0 рази, відповідно. (рис. 1). У середовищі Таусона без внесення матеріалів високу ліполітичну, як і каталазну активність виявлено у *B. subtilis* 138 ($19,25 \pm 2,1$ U/mg⁻¹ білку) і *R. erythropolis* 102 ($18,6 \pm 1,9$ U/mg⁻¹ білку), порівняно з іншими культурами бактерій (рис. 2). За присутності досліджуваних матеріалів вона зменшувалась у 1,4–1,8 рази. Питому ліпазну активність *P. Pseudoalcaligenes* 109 при внесенні у середовище гуанідинвмісних гідрогелів знижувалась у 1,3–1,9 відносно контролю. За присутності гідрогелю 1 ліпазна активність тест-культур бактерій була меншою ($7,8 \pm 1,4$ – $12,7 \pm 2,3$ U/mg⁻¹ білку), у порівнянні з гідрогелем 2.

З даних літератури відомо, що одним з показників інтенсивності процесів окиснення органічної речовини є зміни активності каталази [12, 15]. Для активних бактерій-деструкторів характерно збільшення їх чисельності і зниження каталазної активності за контакту з нафтопродуктами [15]. Згідно з даними деяких авторів, вуглеводеньокиснювальні бактерії активізують ліполітичну активність ґрунтів, при цьому паралельно з активацією ліполізу спостерігається збільшення чисельності вуглеводеньокиснювальних бактерій і зменшення кількості нафтородуктів [16].

Важливим аспектом проблеми біопошкоджень різних матеріалів є утилізація відходів останніх після закінчення термінів їх використання. Показником деградації матеріалів є втрата маси зразків внаслідок дії бактерій. Через 60 days експерименту найбільша втрата маси зразків гідрогелю 1 спостерігалась під впливом *B. subtilis* 138 – $0,35 \pm 0,1$ g (85,4%) (рис. 3). У варіанті досліду з гідрогелем 2 втрата маси зразків за впливу бактерій складала $0,12 \pm 0,01$ – $0,2 \pm 0,05$ g

(59,5-88,4%, від початкової маси). У контролі (середовище Таусона + МПБ + матеріал) втрата маси гідрогелю 1 становила $0,06 \pm 0,01$ g (17%).

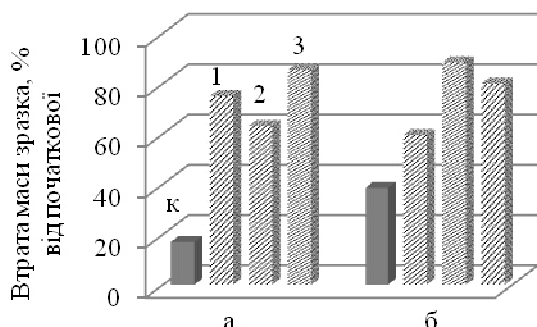


Рис. 3. Зміна маси зразків гуанідинвмісного поліетилен оксидного гідрогелю за присутності вуглеводеньокиснювальних бактерій (%). Примітка:

К- контроль без бактерій;

1–*P. Pseudoalcaligenes* 109,

2–*R. Erythropolis* 102, 3–*B. subtilis* 138.

а) гідрогель 1, б) гідрогель 2.

Fig.3.The weight changes of guanidine containing polyethyleneoxide hydrogel samples in the presence of the hydrocarbonoxidizing

bacteria (%). Notes: K-control (without bacteria);

1–*P. Pseudoalcaligenes* 109,

2–*R. erythropolis* 102, 3–*B.subtilis* 138;

a) hydrogel 1, b) hydrogel 2.

Деградація матеріалів гуанідинвмісних гідрогелів під впливом гетеротрофних бактерій підтверджується даними ІЧ-спектроскопії. Як і у контрольних гідрогелів, так і в ІЧ-спектрах гідрогелів за впливу тест-культур бактерій були наявні смуги поглинання (ν NH, OH), 3156 cm^{-1} (δ NH), 2949 cm^{-1} (ν CH), 2896 cm^{-1} (ν_s CH₂), 2868 cm^{-1} (ν CH₂), 1648 cm^{-1} (ν C=N), (1450 - 1650) cm^{-1} (ν C₆H₅), (1100 - 1300) cm^{-1} (ν C-O-C) (рис. 4).

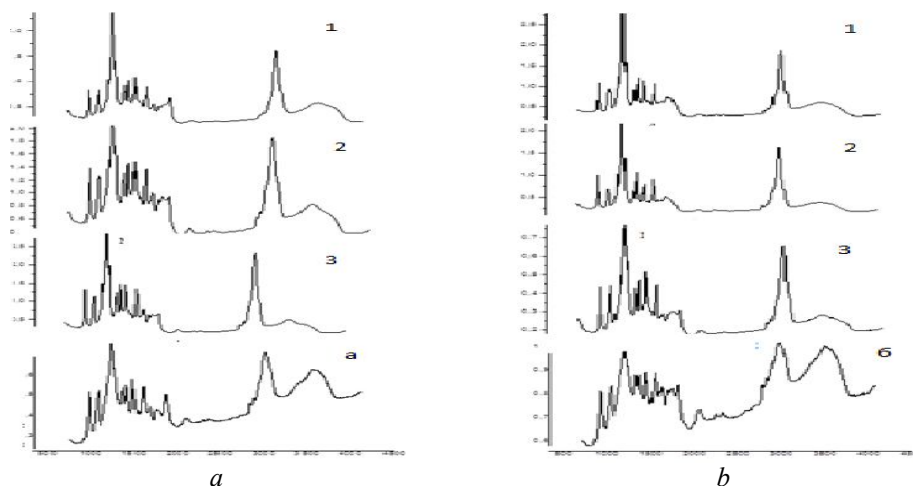


Рис.4. ІЧ спектри зразків поліетиленоксидних гідрогелів за впливу вуглеводеньокислювальних бактерій.

Примітка: а) гідрогель 1, б) гідрогель 2; 1 – контроль, 2 – *B.subtilis* 138, 3 – *R.erythropolis* 102.

Fig.4. IR-spectrum of guanidinecontaining polyethyleneoxide hydrogels after the influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria.

Notes: a) hydrogel 1, b) hydrogel 2; 1 – control, 2 – *B.subtilis* 138, 3 – *R.erythropolis* 102.

Відмінність полягала в тому, що для гідрогелів 1 та 2 за впливу *R. erythropolis* 102 та *Bacillus subtilis* 138 через 60 days зменшувалась смуга поглинання 3500 cm^{-1} , яка відповідає за валентні коливання OH та NH груп (рис. 4). Оскільки зшивання поліетилен оксидних гідрогелів відбувається за рахунок утворення амідних зв'язків, які стійкі до гідролізу та біорозкладання, можна допустити, що наявність значної кількості вторинних аміногруп в зшиваючому агенті є каталізатором біорозкладання гідрогелів, особливо за впливу штаму *R. erythropolis* 102.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено метод отримання гуанідинвмісних поліетилен оксидних гідрогелів, в якому лінійний гуанідинвмісний олігомер виконує одночасно роль зшиваючого, іонівмісного та антимікробного агенту.

2. Синтезований гуанідинвмісний поліетилен оксидний гідрогель проявляв антимікробну активність щодо вуглеводеньокислювальних бактерій-деструкторів захисних матеріалів *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. Erythropolis* 102 та *B. Subtilis* 138.

3. Внесення в середовище Таусона досліджуваних матеріалів, як додаткових джерел вуглецю та енергії, сприяло зниженню каталазної та ліпазної активностей бактерій як індикатора деструкції гуанідинвмісних гідрогелів.

4. Під впливом досліджуваних бактерій відбувається деструкція гідрогелів, що проявляється у зменшенні маси досліджуваних зразків.

5. Методом ІЧ-спектроскопії показано, що на деградацію гуанідинвмісних гідрогелів впливає наявність значної кількості вторинних аміногруп в зшиваючому агенті, які можуть слугувати каталізатором біорозкладання гідрогелів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gnanou Y., Hild H., Rempp P. Hydrophilic polyurethane networks based on polyethylene oxide. Synthesis, characterization and properties. Potential Applications and Biomaterials // American Chemical Society. – 1984. – Vol. 17. – P. 945-952.
2. Graham N, Zultifar M. Interaction of Polyethylene glycol urethane networks // Polymer. – 1989. – Vol. 30. – P. 2130-2135.
3. Biodegradable poly (ethylene glycol) hydrogels based on a self-elimination degradation mechanism / M. Deshmukh, Y. Singh, S. Gunaseelan et al. // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31(26). – P. 6675–6684.
4. Silviya P., Jennie Z., Leach B. Hydrolytically degradable poly (ethylene glycol) hydrogel scaffolds with tunable degradation and mechanical properties // Biomacromolecules. – 2010. – Vol. 11. – P. 1348–1357.
5. Degradable poly (ethylene glycol)-based hydrogels: Synthesis, physico-chemical properties and in vitro characterization / V. Saez-Martinez, B. Olalde, D. Martinez-Redondo, et al. // J. Bioactive Compatible Polymers: Biomedical Applications. – 2014. – Vol. 29. – P. 270.
6. Preparation of biodegradable polyethylene glycol dimethacrylate hydrogels / G. Burke, Z. Cao, M. Devine, et al. // Polymers. – 2019. – Vol. 11. – P. 1339.
7. Jain E., Sheth S., Polito K. et al. Storage stability of biodegradable polyethylene glycol microspheres // Materials Research Express. – 2017. – Vol. 4(10). – 123 p.
8. Synthesis and characterization of biodegradable elastic hydrogels based on poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone) blocks / S.J. Im, Y.M. Choi, E. Subramanyam et al. // Macromolecular Research. – 2007. Vol. 15(4). – P. 363-369.
9. Zhang C. Yin Z, Luo Q. Poly (hexamethylene guanidine)-based hydrogels with long lasting antimicrobial activity and low toxicity // J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. – 2017. – Vol. 55(12). – P. 2027–2035.
10. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины -дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. Москва: Лакокрасочная промышленность, 2009. – 300 с.
11. Ochirov O.S., Mogonov D.M., Stel'makh S.A. Polymerichydrogels based on polyhexamethylen eguanidine hydrochloride and formaldehyde // J. Appl.Chem. – 2015. – Vol. 88(2). – P. 331-334.
12. Влияние полимерных и резинотехнических материалов на углеводородокисляющие бактерии / Д.Р. Абдулина, Ж.П. Коптева, А.Е. Коптева, М.Я. Вортман // Микробиология и биотехнология. – 2019. – Vol. 46(2). – P. 51-64.
13. Апробация количественного метода определения липолитической активности с использованием хромогенного субстрата / В.Л. Айзенберг, В.И. Карпель, С.А. Сырчин и др. // Микробиол. журн. – 1995. – Vol. 57(5). – P. 84–89.
14. Андреюк К.И., Козлова І.П., Коптева Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуріш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. Київ: Наукова думка, 2005. – 258 с.
15. Гоголева О.А. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий. Автореф. дис.канд. биол. наук. Оренбург, 2012. – 18 с.
16. Влияние нефти и нефтепродуктов на активность липазы серой лесной почвы / Н.А. Киреева, Е.М. Тарасенко, А.А. Шамаева и др. Почвоведение. – 2006. – Vol. 8. – P. 1005–1011.
17. Влияние липолитической и каталазной активности гетеротрофных бактерий на физико-механические свойства покрытия / Ж.П. Коптева, В.В. Занина, М.А. Борецкая и др. // Полиген 980-25. Микробиол. журн. – 2013. – Vol. 75(1). – P. 41–47.
18. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майоров и др. // Лабораторное дело. – 1988. – Vol. 1. – P. 16–18.
19. Практикум по микробиологии. под ред. А.И. Нетрусова. Москва: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.