

РАЗРАБОТКА СПОСОБА МОДИФИКАЦИИ МИКРОФИЛЬТРАЦИОННЫХ ПОЛИАМИДНЫХ МЕМБРАН В ЦЕЛЯХ ПРИДАНИЯ ИМ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ

**А.В. Тарасов, Ю.А. Федотов, С.А. Лепешин,
Ю.Т. Панов, В.А. Тверской, А.В. Васютинская**

*ООО Научно-производственное предприятие «Технофильтр»;
ФГБОУ ВПО «Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича
Столетовых», г. Владимир; ФГБОУ ВПО «Московский
государственный университет тонких химических технологий
имени М. В. Ломоносова», г. Москва*

Рецензент д-р биол. наук, профессор М.А. Мазиров

Ключевые слова и фразы: бактерицидность; полиамидная мембрана; полигексаметиленгуанидин; модификация; серебро; хитозан.

Аннотация: Приведены результаты исследования объемно и поверхностно модифицированных полиамидных мембран. В качестве биоцидных агентов использовались препараты серебра и веществ, содержащих четвертичные аммониевые группы. Установлено, что метод объемной модификации не позволяет достичь бактерицидного эффекта. Поверхностная модификация препаратами серебра и полигексаметиленгуанидином обеспечивает получение бактериостатических мембран.

Тарасов Александр Валентинович – директор ООО НПП «Технофильтр», г. Владимир; Федотов Юрий Александрович – кандидат химических наук, доцент кафедры «Полимерные материалы», ФГБОУ ВПО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых», г. Владимир; Лепешин Сергей Александрович – и. о. начальника отдела мембран ООО НПП «Технофильтр», г. Владимир; Панов Юрий Терентьевич – доктор технических наук, профессор, декан факультета химии и экологии, ФГБОУ ВПО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых», г. Владимир; Тверской Владимир Аркадьевич – доктор химических наук, профессор кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений имени С.С. Медведева, ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова», г. Москва; Васютинская Анастасия Вячеславовна – аспирант кафедры «Полимерные материалы», e-mail: 23.avgust90@mail.ru, ФГБОУ ВПО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых», г. Владимир.

Введение

Проблема обеспечения населения доброкачественной питьевой водой, пригодной для хозяйственно-питьевого использования и безопасной в эпидемиологическом отношении, является одной из приоритетных задач в системе водоснабжения страны.

С середины прошлого века задачи получения питьевой воды, безопасной в токсикологическом и эпидемиологическом отношении, часто стали решаться с применением мембранных процессов. Однако одной из важнейших проблем, сдерживающих развитие мембранных технологий, является снижение производительности и уменьшение ресурса работы мембранных фильтров вследствие образования на их поверхности различных осадков. При этом бактериальные загрязнения вызывают больше проблем, чем коллоидные или кристаллические. Это связано с тем, что задержанные мембраной микроорганизмы в благоприятных условиях, продолжая размножаться, через некоторое время образуют колонии, превращающиеся в биопленки, которые способны прорасти сквозь поры мембраны. Вследствие этого бактерии попадают в фильтрат, заражая его, а мембрана теряет свои стерилизующие свойства. Это явление может происходить как в процессе фильтрации (динамическом режиме), так и в статическом состоянии, то есть когда нет фильтруемого потока, но фильтр находится во влажном состоянии [4]. Явлению прорастания микроорганизмов через мембрану дано достаточно логичное объяснение, заключающееся в том, что бактериальная клетка при размножении делится на две части и в таком уменьшенном состоянии может проникнуть через мембрану, которая является не проницаемой для нее в исходном виде [3].

Для предотвращения зарастания мембран биологическими веществами пользователи мембранных фильтров вынуждены применять сильные дезинфицирующие средства, которые вызывают деструкцию полимерной мембраны и коррозию оборудования [1, с. 332]. Альтернативным способом борьбы с биологическими загрязнениями могло бы быть использование в фильтрах бактерицидных мембран, однако, сведения промышленных производствах такой продукции отсутствуют [2, с. 56].

Проведение эксперимента

В статье использовались два подхода к технологии модификации:

- введение порошка серебра и серебросодержащих добавок в формовочную массу (то есть объемная модификация);
- обработка антибактериальными средствами поверхности мембраны (поверхностная модификация).

Приведены результаты исследований бактерицидных свойств полиамидных микрофильтрационных мембран, модифицированных различными способами и некоторыми биоцидами. В качестве исходной использовали полиамидную микрофильтрационную мембрану марки ММК-0,2, выпускаемую ООО НПП «Технофильтр» (г. Владимир). Объемная модификация мембраны препаратами серебра, хитозаном полигексаметиленгуанидин гидрохлоридом осуществлялась путем введения модифицирующего агента в формовочный раствор на стадии его приготовления.

Поверхностную модификацию проводили на специальной установке с намазывающими и отжимными вальками, установленными в ванне с модифицирующим раствором.

Для модификации использовались:

– препарат наноструктурных частиц серебра марки «Сильвернано-1», изготовленный в ООО НПК «Наномет», г. Москва;

– концентрат антимикробной добавки на основе солей серебра («Биоформ TRMB0080211-1»), разработанный и изготовленный фирмой «International Plastic Guide», г. Санкт-Петербург.

Обработку мембраны с нанесенным полигексаметиленгуанидин гидрохлоридом (ПГМГ) для перевода ее в основную форму проводили 5%-м раствором NaOH с последующей промывкой дистиллированной водой.

Оценка бактерицидных свойств мембран проводилась по способности задерживать рост условно-патогенной микрофлоры, представителем которой выбрана культура *Escherichia coli* (*E. coli*), полученная в ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Испытания проводились с использованием фильтрационной установки, включающей прибор вакуумного фильтрования ПВФ 35/47 НБ, соединенный с колбой Бунзена. Рабочий раствор тест-культуры в количестве 50 см³ фильтровали через каждую испытуемую мембрану и контрольные образцы мембран. После окончания фильтрования и осушения фильтра отключали вакуум, фильтр осторожно поднимали за край фламбированным пинцетом и переносили его, не переворачивая, на питательную среду (мясопептонный бульон), разлитую в чашки Петри, избегая образования пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с отфильтрованными на ней бактериями должна быть обращена вверх. Фильтрат высеивали на чашку Петри с питательной средой из расчета по 0,1 см³ на чашку (при трех повторях). Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение времени испытания. Учет результатов оценки бактерицидных свойств мембранных фильтров начинали проводить через 24 ч после посева и продолжали все время испытаний.

Подсчитывали все выросшие на фильтрах колонии. Подсчет производился только на тех чашках, на которых выросло не более 300 изолированных колоний. Подсчитанное число колоний на каждой чашке суммировали и делили на три. Результат выражали числом колоний образующих единиц (КОЕ) на площади исследуемого образца и заносили в протокол. Если из-за большого роста подсчет колоний на фильтрах невозможен, то в протоколе отмечали: «сплошной рост».

Результаты, полученные после инкубирования мембранных фильтров, интерпретировали следующим образом:

– если рост тест-культуры на испытуемой мембране после фильтрации и инкубирования при 37 °С в течение 5 суток полностью отсутствовал, то данный фильтр считался бактерицидным;

– бактериостатическими считали мембраны, на которых через 5 суток после инкубации в чашках Петри с мясопептонным агаром при 37 °С число колоний тестовой культуры не превышало 10.

Общую концентрацию микробных клеток в суспензиях бактерий определяли визуально по отраслевому стандарту мутности. Число живых микробных клеток определяли посредством титрования исследуемых культур на плотных питательных средах и выражали в КОЕ. Последовательные десятикратные разведения каждой пробы (0,5 см³ исходной бактериальной суспензии смешивали с 4,5 см³ стерильного физиологического раствора) в объеме 0,1 см³ высевали на три чашки Петри. Через 48 ч инкубации при 37 °С число выросших на чашках колоний подсчитывали на счетчике колоний, эквивалентных числовому значению живых бактерий в исходной суспензии.

Сначала проводилось определение максимальных концентраций *E. coli*, не вызывающих роста на модифицированных мембранах (табл. 1).

Результаты испытаний показали, что мембранные фильтры, поверхностно-модифицированные препаратами серебра, способны сдерживать рост значительных концентраций бактерий. Так, максимальная концентрация *E. coli*, не вызывающая роста бактерий, для мембранных фильтров составила: для фильтра № 2 – 1,5 млн микробных клеток (*далее* – м.к.) или в пересчете на площадь фильтра 90,3 тыс. м.к./см²; № 4 – 2,5 млн м.к. или 210,8 тыс. м.к./см².

Для дальнейших исследований выбрана концентрация заражаемых бактерий 10⁴ КОЕ/см³.

Таблица 1

Влияние концентрации *E. coli* на рост бактерий на поверхности модифицированных мембран

№ образца	Модификация	Число КОЕ в 250 мл	Число колоний на фильтре через 24 ч
2	Поверхностная, наносеребро, C = 600 мг/л	448 500	Нет роста
		862 500	
		1 500 000	
		2 500 000	5
		5 000 000	15
		8 625 000	24
		10 000 000	50
3	Объемная, наносеребро, 1 % от полиамида	448 500	Нет роста
		862 500	20
4	Поверхностная, 0,8 % «Биоформ»	448 500	Нет роста
		862 500	
		1 725 000	
		2 500 000	1
		3 450 000	
		5 000 000	
		10 000 000	
		34	

Оценка бактерицидных свойств мембран

Полиамидные мембраны, подвергшиеся различным видам модификации минеральными веществами (препаратами и нанопрепаратами серебра), органическими полимерными соединениями (хитозан и ПГМГ), а также химически модифицированные мембраны испытывались на бактерицидные свойства.

Для оценки бактерицидных и бактериостатических свойств через мембраны фильтровали пробы воды объемом 50 см³ с концентрацией микробных клеток 10⁴ КОЕ/см³ *E. coli*. Максимальное время наблюдения составляло 14 суток, развитие, рост и количество микроорганизмов учитывали визуально путем подсчета числа выросших на мембране колоний тест-культуры. Исследовалась возможность химической модификации мембран из полиамида (ПА) с целью иммобилизации в их структуре веществ, обладающих биоцидными свойствами. Так как поликапроамид имеет два типа функциональных групп, то посредством их может быть проведено химическое присоединение тех или иных соединений. Это – амидная группа и пентаметиленовая цепочка. Замещение или присоединение по амидной группе гораздо более трудоемко. Некоторый интерес представляет амидолиз амидной связи с образованием более активных карбоксилатной и аминогруппы.

Проводился щелочной гидролиз 1 N раствором щелочи монолитных пленок из поликапроамида. Изменения оценивались по ИК-спектрам многократного нарушенного полного внутреннего отражения. В ИК-спектрах пленок после обработки щелочью появлялись полосы лишь очень низкой интенсивности, относящиеся к колебаниям карбоксилатной и аминогрупп, и их интенсивность не возрастала во времени. Причиной малой эффективности такого метода химической обработки поликапроамида может быть не только его относительная устойчивость к воздействию растворов щелочей, но также деструкция и вымывание из полимера низкомолекулярных фрагментов.

Пентаметиленовая группа инертна к воздействию большинства химических реагентов. Эффективным способом химической модификации соединений, содержащих полиметиленовые цепочки, является прививочная полимеризация, инициируемая ионизирующим излучением (радиационная прививочная полимеризация). Процесс заключается в облучении полимера источником излучения высокой энергии с последующей прививочной полимеризацией соответствующего функционального мономера. В настоящей работе облучение мембраны из поликапроамида проводили на источнике γ -излучения ⁶⁰Со. В качестве функционального мономера использовали акриловую кислоту. В результате такой радиационно-химической модификации на поверхности мембраны продуцируются цепи полиакриловой кислоты, ковалентно связанные с макромолекулами поликапроамида.

Полиакриловая кислота (ПАК) – слабый биоцид. Однако карбоксильные группы, имеющиеся в ее структуре, могут выполнять функцию «якорных групп», посредством которых возможна иммобилизация тех или иных функциональных групп, в том числе биоцидных.

В качестве соединений биоцидов применялись, во-первых, поверхностно-активные вещества и полимеры, содержащие четвертичные аммониевые группы, и, во-вторых, нитрат серебра.

В соединениях первого типа биоцидными свойствами обладают четвертичные аммониевые группы. Во втором случае – это ионы серебра. Для связывания этих соединений с полиакриловой кислотой последнюю в обоих случаях переводили в H^+ -форму нейтрализацией карбоксильных групп 1,5 N раствором гидроксида натрия.

В опытах с использованием поли-N,14,K,1M-диметилдиаллиламмоний-хлорида (ДМДААХ) мембрану вымачивали в течение 5 суток в 2,5%-м растворе этого соединения.

Полученные результаты, представленные в табл. 2, показывают, что:

– мембраны, поверхностно модифицированные наночастицами серебра и препаратом «Биоформ», обладают бактериостатическими свойствами, то есть после фильтрования суспензии тест-культуры, содержащей 10^4 КОЕ *E. coli*, сдерживают ее рост в пределах 7–10 колоний в течение 14 суток;

– мембраны, поверхностно модифицированные ПГМГ с концентрацией 2–5 %, проявили бактериостатический эффект.

Таблица 2

Оценка бактерицидных свойств модифицированных мембран (тест-культура *E. coli*, концентрация 10^4 КОЕ/см³)

Модификация	Рост на поверхности фильтра, КОЕ, за время наблюдения, сутки				
	1	2	5	10	14
Исходная ММК-0,2	Сплошной				
Поверхностная, наносеребро, 600 мг/л	Отсутствует	3,3±0,9	4,3±1,2	9,3±1,4	10,3±2,4
Поверхностная, «Биоформ», 0,8%-й раствор		8,7±1,5	10,3±1,3	10,7 ± 1,3	
Объемная, «Биоформ», 0,5 % от ПА	0,5±0,2	10,5±0,5	Сплошной		
Поверхностная, Биоформ / хитозан, 0,4%-й / 0,2%-й растворы	Отсутствует	0,5±0,3			
Объемная, ПГМГ, 5 % от ПА	Сплошной				
Объемная, ПГМГ, 10 % от ПА	15,5±6,0	17,0±2,7	20,3±12,6	Сплошной	
Поверхностная, ПГМГ, 2%-й раствор	8,0±2,2	10,3±2,4			
Поверхностная, ПГМГ, 5%-й раствор	Отсутствует	0,5±0,3	0,7±0,4		
Химическая прививка, ПАК + 0,5 % AgNO ₃		6,0±2,3	10,0±2,0	12,0±1,8	
Химическая прививка, ПАК + ДМДААХ	15,0±2,9	43,0±2,6	43,0±3,2		

Заключение

Проведенные исследования позволили установить, что метод объемной модификации не позволяет обеспечить достижение бактерицидного или бактериостатического эффектов.

Мембраны, поверхностно модифицированные препаратами серебра, способны сдерживать рост значительных концентраций бактерий. Максимальная концентрация *E. coli* для мембранного фильтра составила, млн м.к.: № 2 – 1,5; № 3 – 2,5.

Наилучшими антимикробными свойствами обладали две мембраны:

– поверхностно-модифицированная раствором смеси хитозана и препаратом «Биоформ»;

– поверхностно-модифицированная 5%-м раствором ПГМГ.

Модифицированные мембраны, сохраняющие бактериостатические свойства в течение 14 суток, могут быть рекомендованы для производства на их основе индивидуальных фильтров, входящих в экипировку служащих МО, МВД и работников МЧС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, договор № 13.G25.31.0022.

Список литературы

1. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах / Е.М. Егорова [и др.] // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, Химия. – 2001. – Т. 42, № 5. – С. 332–338.

2. Исследование антимикробных свойств мембран, модифицированных хитозаном / В.В. Коновалов [и др.] // Мембраны. – 2006. – № 4 (32). – С. 56–61.

3. Simonetti, J.A. // J. Environ Sci. – 1984. – Vol. 27 (6). – P. 27.

4. Wallhäusser, K.H. // Die Pharmazeutische Industrie. – 1983. – Vol. 45 (5). – P. 527.

Development of Modification Method of Polyamide Microfiltration Membranes to Give them Bactericidal Properties

**A.V. Tarasov, Yu.A. Fedotov, S.A. Lepeshin,
Yu.T. Panov, V.A. Tverskoy, A.V. Vasutinskaya**

*ООО (LLC) Scientific Production Enterprise “Technofilter”;
Vladimir State University named after Alexander and Grigoriy
Stoletovs, Vladimir; Moscow State University of Fine Chemical
Technologies named after M.V. Lomonosov, Moscow*

Key words and phrases: argentic; bactericidal activity; chitosan; modification; polyamide membrane; polyhexamethylene guanidine.

Abstract: Bulk and surface-modified polyamide membranes were studied. Argentic specimen and those containing multimaster ammonium groups were used as biocidal agents. Consideration of evaluation results of bactericidal properties of membrane filters started 24 hours after planting and continued during all the tests. It was established that the bulk modification method does not allow achieving the bactericidal effect. The surface modification by argentic specimen and polyhexamethylen guanide enables to obtain bacteriostatic membranes. The two membranes possessed the best antimicrobial characteristics:

– surface membrane modified with chitosan mixture solution and «Bioform» specimen;

– surface membrane modified with 5 % PHMG solution.

Modified membranes, preserving bacteriostatic properties within 14 days, can be recommended for production of individual filters, which are used in the apparel of the Defense Ministry, the Ministry of Internal Affairs and the Ministry of Emergency Situations.

© А.В. Тарасов, Ю.А. Федотов, С.А. Лепешин,
Ю.Т. Панов, В.А. Тверской, А.В. Васютинская, 2013