

УДК 678.5:576.858

ПРИМЕНЕНИЕ МЕМБРАН С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ПОВЕРХНОСТНЫМ ЗАРЯДОМ ДЛЯ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВОДЫ

© 2012 А.В. Тарасов², Ю.А. Федотов², С.А. Лепешин², Ю.Т. Панов¹,
К.В. Окулов¹, А.И. Вдовина¹

¹ Владимирский государственный университет имени А.Г. и Н.Г. Столетовых

² ООО НПП «Технофильтр»

Поступила в редакцию 25.04.2012

ООО НПП «Технофильтр» разработал способ концентрирования вирусов из воды с использованием микрофильтрационных полиамидных мембран, обладающих положительным поверхностным зарядом, отвечающий современным требованиям проведения вирусологического контроля воды. В НИИ ЭЧ и ГОС им. Сытина РАМН проведены исследования процесса концентрирования вирусов из вод различного происхождения с положительно заряженной микрофильтрационной мембраны марки ММПА⁺-0.2 и установлена их высокая эффективность.

Ключевые слова: вирусное загрязнение воды, методы определения, методы очистки, полиамидные микрофильтрационные мембраны

Полиамидные микрофильтрационные мембраны производства НПП «Технофильтр» (г. Владимир) более 15 лет используются в разнообразных процессах осветляющей, тонкой и стерилизующей фильтрации различных водных сред. Мембраны микропористые полиамидные представляют собой пористые пленки, изготовленные из полиамида-6 и смесей с полиамидом-66 по запатентованной технологии [1, 2]. Полиамидные мембраны имеют крупнопористое строение, причем стенками ячеек являются тонкие микропористые перегородки. Такое строение предопределяет непрерывность структуры мембран и обеспечивает прочность и эластичность в сухом и смоченном виде, что приводит к удобству и простоте в работе с ними. Мембраны не теряют своей прочности и эластичности при многократных сгибаниях, что обеспечивает возможность бездефектного изготовления гофрированных патронных фильтрующих элементов. В связи с высокой гидрофильностью мембранообразующего полимера, полиамидные мембраны быстро смачиваются водой и различными водными растворами. Они устойчивы в водных

средах со значениями рН от 2-13, а также во многих органических растворителях.

Результаты и их обсуждение. Длительное время разделительные возможности мембран объясняли исключительно ситовым эффектом. Позднее, после внедрения в практику фильтрации мембран изготавливаемых из новых полимеров, было установлено, что эффективность задержания различных загрязняющих веществ обеспечивается не только за счет ситового механизма, но также вследствие их адсорбции, которая в свою очередь обеспечивается электростатическими или Ван-дер-ваальсовыми силами взаимодействия. Мембраны, обладающие поверхностным электрическим зарядом (дзета-потенциалом), получили название «заряженные мембраны». Поверхностные свойства мембран оказывают значительное, а иногда решающее влияние на их эксплуатационные свойства. Величина и знак зарядов поверхности мембран и задерживаемых частиц (коллоидов, высокомолекулярных соединений, ионов и т.д.), содержащихся в фильтруемой смеси, определяют интенсивность электростатического взаимодействия между ними, инициирующего процесс адсорбции, результатом которого может быть с одной стороны повышение эффективности задержания, а с другой стороны закупорка пор и падение производительности мембраны. Для уменьшения величины адсорбции необходимо, чтобы мембрана и фильтруемые частицы приобретали в растворе одноименный заряд и наоборот. Вследствие ограниченного набора полимеров, применяемых для

Тарасов Александр Валентинович, кандидат химических наук, директор. E-mail: OM.TF@mail.ru

Федотов Юрий Александрович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник. E-mail: OM.TF@mail.ru

Лепешин Сергей Александрович аспирант

Панов Юрий Терентьевич, доктор технических наук, профессор кафедры полимерных материалов. E-mail: tpr_vlgu@mail.ru

Окулов Кирилл Валерьевич, аспирант

Вдовина Анастасия Игоревна, аспирантка

получения мембран, это условие может быть удовлетворено за счет модификации поверхности мембран или объемной модификации.

Известно, что алифатические полиамиды, используемые для получения мембран, в отличие от других мембранообразующих полимеров (ацетат целлюлозы, фторопласт, акрилонитрил и т.д.) имеют изоэлектрическую точку, в которой положительные и отрицательные заряды компенсируют друг друга. Для полигексаметилендиамина (ПА-66) и поликапролактама (ПА-6) изоэлектрическая точка находится в диапазоне рН от 7,6-8,6 в зависимости от соотношения концевых amino- и карбоксильных групп. При рН выше изоэлектрической точки мембрана заряжена отрицательно, а ниже – положительно. В НПП «Технофильтр» разработаны мембраны, характеризующиеся положительным зарядом в более широкой области рН. Это достигнуто за счет объемной модификации путем введения в мембрану полимеров, содержащих аминогруппы.

В последнее время задача повышения эффективности удаления различных отрицательно заряженных частиц из водных растворов связывается с использованием фильтров, изготовленных из материалов, обладающих поверхностным положительным зарядом. Такие фильтры, совмещая процессы адсорбции и фильтрации, позволяют удалять загрязнения с размерами до десятков нанометров. Пористые электроположительные фильтры способны адсорбировать вирусы, эндотоксины, размер которых во много раз меньше среднего размера пор фильтра, обеспечивая при этом высокие скорости потока воды. Кроме удаления загрязнений, электроположительные фильтрующие материалы применяются для сбора микроорганизмов и других микрочастиц из воды и их анализа.

С введением в действие СанПин 2.1.4.559-96 «Вода питьевая», а также СанПин 2.1.5.980-2000 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод» возникла потребность в разработке новой нормативной базы, предусматривающей контроль качества воды различного вида водопользования не только по показателям бактериального, но и вирусного загрязнения, в частности по колифагам, а также энтеровирусам. Для наиболее полного контроля питьевой воды необходимо наличие эффективного методического обеспечения, дающего возможность быстрой и точной количественной оценки реального вирусного загрязнения питьевой воды. Размер патогенных микроорганизмов (бактерий и вирусов) составляет от 0,03 до нескольких микрометров, что в несколько раз меньше размера пор мембраны, что предполагает использование мембран с небольшим

размером пор, например, обратноосмотических или нанофильтрационных. Но с другой стороны, в связи с низкой концентрацией вирусов в воде важным первичным этапом вирусологического исследования является их концентрирование из больших объемов воды (10-100 л и более до 10-50 мл) [3]. На наш взгляд, микрофильтрационные мембраны с положительным дзета-потенциалом являются оптимальным выходом из данной ситуации. Основное преимущество микрофильтрационных мембран перед нано- или обратноосмотическими, является высокая скорость фильтрации, что позволит проводить экспресс анализ, а также простое и недорогое лабораторное оснащение.

В НИИ ЭЧ и ГОС им. Сырина РАМН были проведены исследования процесса концентрирования вирусов из вод различного происхождения с применением мембранного модуля МФМ-0142 производства НПП «Технофильтр» [4] и специально разработанной мембраны для вирусологического анализа марки ММПА⁺. Для фильтрации значительных объемов исследуемой воды нами предлагается схема с использованием перистальтического насоса (рис. 1). Исследуемая вода из расходной емкости (1) (рис. 1) перистальтическим насосом (6) подается в мембранный модуль (2). Фильтрат после модуля поступает на слив, а концентрат остается на мембране. Результаты исследований показали, что сорбция фага MS-2 и вируса полиомиелита 1 (штамм *LS2ab*) на мембранах типа ММК-0,2 достигала 96-98%, а на мембранах ММПА⁺-0,2 – 99-100%. Эффективность исследованного метода колебалась от 73,3-90,0%, при этом длительность фильтрации 10 литров исследуемой воды составляла 45-90 мин.

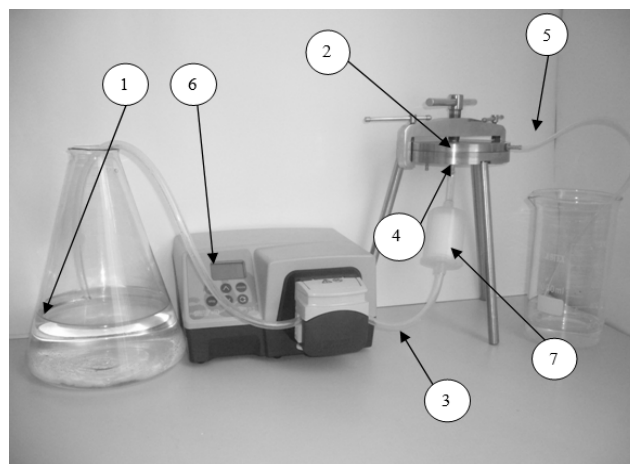


Рис. 1. Схема установки концентрирования вирусов с использованием перистальтического насоса:

1 – расходная емкость; 2 – мембранный модуль; 3 – шланг; 4,5 – узлы стыковки; 6 – перистальтический насос; 7 – предфильтр

При концентрировании вирусов применяется тупиковый режим фильтрации, при котором поток жидкости в напорной части между тарелкой и мембраной движется по спиральному каналу, проходит через мембрану, где задерживаются частицы, имеющие отрицательный заряд, такие как вирусы и пирогенны, а также все частицы больше среднего размера пор мембраны. В случае исследования сильно загрязненной жидкости во всасывающую или нагнетательную линию необходимо вмонтировать предфильтр капсульного типа (4, рис. 1), разработанный в ООО НПП «Технофильтр», в котором используются материалы, не сорбирующие вирусы. Также допускается использование дискового предфильтра, устанавливаемого прямо на мембрану в фильтрующем модуле. Использование этого варианта фильтрации позволяет увеличить объем фильтруемой жидкости с 10 до 50 и более литров. Согласно [5], требуемый объем пробы планового и производственного вирусологического анализа 10 и 50 литров. Фильтровальный модуль МФМ-0142 в исполнении с предфильтром позволяет решить данную задачу.

Используемый ранее способ элюции предусматривал изъятие мембраны из модуля и механический смыв вирусов с мембраны струей элюента из пипетки, что представляло определенную опасность инфицирования работающего персонала. Исключение риска инфицирования возможно было только при выполнении данной процедуры в условиях ламинарного бокса, что сопряжено с существенными сложностями и значительными финансовыми затратами. В новом варианте фильтрационного модуля элюция вирусов с мембраны осуществляется без извлечения мембраны, то есть в закрытом режиме. Элюцию вирусов с мембраны (рис. 2) осуществляют путем продавливания через нее элюента (3% бифэкстракта на трисбуфере с pH 9,1-9,5) в три приема по 20 мл двумя одноразовыми шприцами. Шприцы, один из которых содержит элюент, присоединяются к стыковочным устройствам на линии входа воды (2) и на линии выхода фильтрата (4). Узел стыковки (3) заглушен. В каждый прием элюент продавливается через мембрану с помощью этих шприцов не менее 8-10 раз. Основными достоинствами фильтрующего модуля являются:

- возможность совмещения процессов концентрирования и элюции в одном аппарате;
- высокая эффективность концентрирования и элюции, достигаемая за счет оригинальной

конструкции, обеспечивающей массоперенос жидкости над мембраной и через неё;

- возможность осуществления щадящих условий концентрирования и десорбции вирусов, т.к. фильтрация проводится при средах близких к нейтральным без использования каких-либо реагентов;

- снижение количества элюанта до 60 мл;

- обеспечение безопасности обслуживающего персонала (элюция проводится с помощью шприцев без разборки аппарата);

- простота и удобство при эксплуатации.

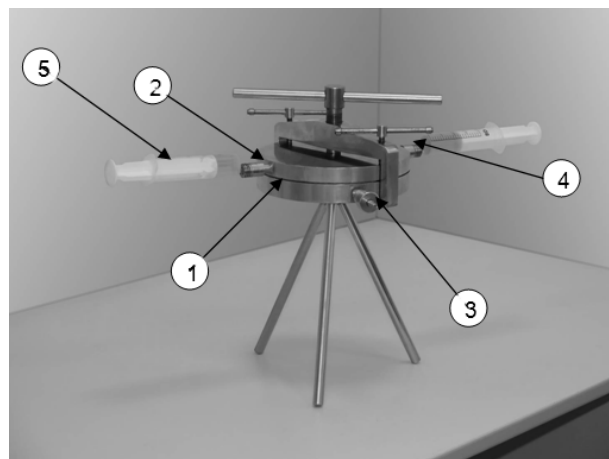


Рис. 2. Элюция вирусов без разборки модуля: 1 – МФМ; 2, 3, 4 – узлы стыковки; 5 – шприц с элюентом

Многочисленные эксперименты по изучению эффективности выделения вирусов проводили с использованием искусственно зараженной водопроводной воды и нативной воды из поверхностных источников. Воду заражали РНК-содержащим колифагом (MS-2) или вакцинным штаммом полиовируса 1 типа (LSc 2ab). На наличие колифагов и полиовируса исследовали исходную воду и элюат. Полученные результаты представлены в таблицах 1-2.

Таблица 1. Эффективность выделения колифагов с использованием модуля МФМ 0142

Концентрация колифага в БОЕ ^{х)}		Эффективность, %
исходная вода (10 л)	элюат (60 мл)	
2000	1800	90,0
6200	5135,1	82,8
7500	6240	83,2
9900	8420	85,1
40600	30392,7	74,9
320000	300000	93,7

Примечание: ^{х)} БОЕ – бляшкообразующая единица колифага

Таблица 2. Эффективность выделения вирусов с использованием модуля МФМ 0142

Концентрация полиовируса в ТЦД ₅₀ ^{х)}		Эффективность, %
исходная вода (10 л)	элюат (60 мл)	
$3,84 \times 10^3$	$3,08 \times 10^3$	80,3
$1,25 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	80,0
$1,25 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	96,0
$1,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	83,3
$2,25 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	75,6
$2,25 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	88,9

Примечание: ^{х)} ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза вируса

Представленные в таблицах 1 и 2 данные показали высокую эффективность выделения как колифага, так и полиовируса при использовании разработанного способа элюции. При этом эффективность выделения фагов колебалась в пределах 74,9-90,0%, а полиовируса – 75,6-96%. Также установлено, что эффективность индикации изученных вирусов практически не зависит от исходной концентрации как колифага, так и полиовируса в пределах изученных уровней загрязнения питьевой воды.

Высокая эффективность мембран ММПА⁺-0.2 была подтверждена и при испытаниях, проведенных в 2006 г. в Краснодарском крае при фильтрации речной воды (р. Туапсе, р. Псеузапсе, р. Аше), воды из подземных источников (скважины санаториев Юг и Шапсучский чай), а также сточных вод этих санаториев. В 2007 г. в Нижегородском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной мембраны ММПА⁺-0.2 были использованы в процессе концентрирования вирусов гепатита А, одного из трудно культивируемых вирусов. Были использованы искусственно приготовленные суспензии ВГА в дистиллированной воде взятые в разведении от 1×10^{-4} до 1×10^{-8} ПУЛ. Установлено, что использование мембран ММПА⁺-0.2 обеспечивает повышение чувствительности метода контролирования ВГА на 2 порядка по сравнению с ранее из-

вестными методами. При этом достигается надежное удержание вируса даже при концентрациях ниже пороговой чувствительности ОТ ПЦР. Было показано, что концентрирование вирусов на мембране ММПА⁺-0.2 можно проводить при нейтральном рН в отличие от нитроцеллюлозных мембран фирмы «Сарториус», для которых достаточный уровень выделения достигается при рН ниже 4,0. Поскольку элюирование собранных вирусов не всегда удобно проводить сразу же после концентрирования важно, чтобы условия проведения процесса и сам материал фильтра не оказывали влияния на жизнеспособность вируса (экстремальные значения рН могут инактивировать некоторые вирусы). Этим требованиям в наибольшей мере соответствует мембрана ММПА⁺.

Для получения надежных результатов, свидетельствующих о наличии или отсутствии вирусов в воде, необходимо исследование всего объема элюата, в данном случае 60 мл, т.к. содержание вирусов даже после концентрирования, как правило, может не превышать единичных вирионов в 1 мл этого объема элюата. С целью уменьшения объема получаемого элюата и повышения эффективности анализа проводится этап вторичного концентрирования путем осаждения вирусов полиэтиленгликолем в соответствии с рекомендациями, изложенными в «Инструкции по использованию полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления энтеровирусного загрязнения [6]. Введение этапа вторичного концентрирования вирусов при помощи ПЭГ 6000 позволяет уменьшить объем первичного элюата в 10 раз, который в полном объеме может быть использован для выделения вирусов на различных культурах клеток и для определения РНК и ДНК в ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Полученные результаты показали (табл. 3), что эффективность выделения полиовируса и колифага, с использованием этапа вторичного концентрирования, была высокой и колебалась в пределах 80,3-100%.

Таблица 3. Эффективность этапа вторичного концентрирования колифага и полиовируса из элюата

Концентрация фага в БОЕ в объеме:		Эффективность, %	Концентрация полиовируса в ТЦД ₅₀ в объеме:		Эффективность, %
60 мл	6 мл		60 мл	6 мл	
780	626	80,3	$2,0 \times 10^2$	$1,75 \times 10^2$	87,5
852	694	81,5	$3,5 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	88,8
852	710	83,3	$3,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	100

Выводы:

1. Установлена высокая эффективность использования заряженной полиамидной мембраны в процессах концентрирования вирусов из вод различного происхождения.

2. Предложена схема проведения контроля вирусов с использованием заряженных мембран и микрофильтрационного модуля МФМ-0142, позволяющая увеличить чувствительность метода, без внесения изменений в существующее оборудование для определения вирусов в воде.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (договор №13.G25.31.0022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Леоненкова, Е.Г.* Способ получения микрофильтрационных мембран / *Е.Г. Леоненкова, А.В. Тарасов, Ю.А. Кири, Ю.А. Федотов.* – Патент Российской Федерации №2161530, 2000 г.
2. *Тарасов, А.В.* Способ получения микрофильтрационной положительно заряженной мембраны / *А.В. Тарасов, Ю.А. Федотов.* – Патент Российской Федерации № 2286842 С1, 2006 г.
3. *Брок, Т.* Мембранная фильтрация / Пер. с англ. под ред. *Б.В. Мчедливили.* – М.: Мир, 1987. 335 с.
4. *Ильин, М.И.* Мембранный фильтрующий модуль / *М.И. Ильин, Ю.А. Федотов, Ю.И. Яманов, А.В. Тарасов.* – Патент Российской Федерации № 2194566, 2002 г.
5. МУК 4.2.2029-05. Санитарно-вирусологический контроль водных объектов. – М., 2006. 10 с.
6. *Ребриков, Д.В.* ПЦР «в реальном времени». предисл. *Остермана Л.А.* и *акад. РАН и РАСХН Свердлова Е.Д.*; 2-е изд., испр. и доп. *Лаборатория знаний / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов* и др. – М.: БИНОМ, 2009. 223 с.

APPLICATION OF MEMBRANES WITH POSITIVE SURFACE CHARGE FOR SANITARY AND VIROLOGIC WATER CONTROL

© 2012 A.V. Tarasov², Yu.A. Fedotov², S.A. Lepeshin², Yu.T. Panov¹,
K.V. Okulov¹, A.I. Vdovina¹

¹ Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletov

² JSC “NPP Tekhnofiltr”

JSC NPP “Tekhnofiltr” was developed the method of concentrating the viruses from water with use of microfiltrational polyamide membranes possessing positive surface charge, meeting the modern requirements of carrying out virologic water control. Researches the process of concentrating viruses are carried out to Scientific Research Institute named after Sysin from waters of various origin from positively charged microfiltrational membrane of MMPA +0.2 type and their high performance is established.

Key words: virus pollution of water, definition methods, cleaning methods, polyamide microfiltrational membranes

Alexander Tarasov, Candidate of Chemistry, Director. E-mail: OM.TF@mail.ru

Yuriy Fedotov, Candidate of Chemistry, Senior Research Fellow. E-mail: OM.TF@mail.ru

Ergey Lepeshin, Post-graduate Student

Yuriy Panov, Doctor of Technical Sciences, Professor at the Polymeric Materials Department. E-mail: tpp_vlgu@mail.ru

Kirill Okulov, Post-graduate Student

Anastasiya Vdovina, Post-graduate Student