

03;10;12

О некоторых возможностях стерилизации при помощи трековых мембран

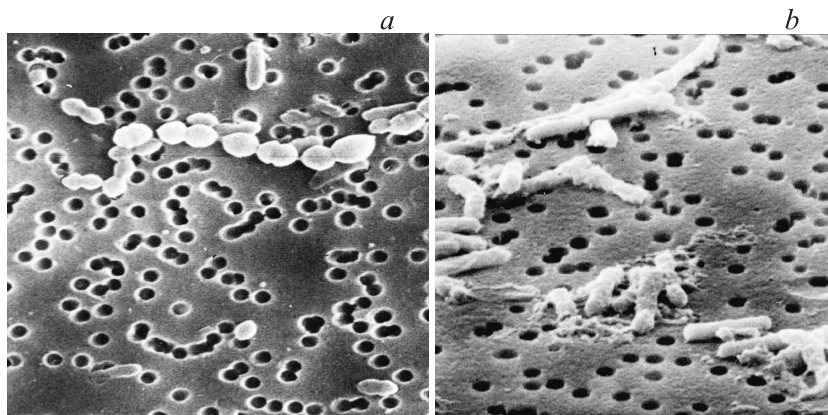
© М.Ф. Кудояров, Б.И. Вишнеvский, О.А. Маничева,
Е.Н. Мякотина, С.А. Мухин, М.Я. Патрова, Ю.В. Ведмецкий

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург
СПб НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург
ЗАО „НПФ ТреМ“, Санкт-Петербург
ООО „Гидрокомплект“, Шлиссельбург, Ленинградская область
E-mail: mkud@cycla.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 13 марта 2011 г.

Исследованы возможности трековых мембран в выделении из жидких сред по размерному признаку микобактерий туберкулеза. На ускорительном комплексе ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН был получен набор образцов трековых мембран с различными диаметрами пор. Все образцы исследовались на способность отделения 13 штаммов микобактерий туберкулеза. Результаты показали высокую стерилизующую способность трековых мембран с порами от 180 до 300 нм, а также подтвердили утверждение об относительной „жесткости“ микобактерий данного типа.

Возможности трековых мембран как уникального фильтрующего материала со 100%-й селективностью в задачах строгого размерного разделения жидких сред хорошо известны. Исходный материал трековых мембран (ТМ) — полиэтилентерефталат (лавсан) не токсичен, биосовместим, достаточно прочен и обладает рядом других привлекательных свойств, в частности нейтрален для бактерий. Полученные из такого материала трековые мембраны с одинаковыми порами любого диаметра в диапазоне от десятков до тысяч нанометров успешно применяются на практике. В медицинском применении — это процедура лечебного плазмафереза крови с помощью ТМ, в которой кровь надежно разделяется на плазму и крупноклеточные элементы (эритроцитную массу) [1]. В фильтрах питьевой воды различных конструкций трековая мембрана также задерживает крупноклеточные патогенные микроорганизмы (бактерии), а также механические частицы, органические грязи и другие примеси за счет как размерного фактора, так и активных



ЭСМ-изображение поверхности трековой мембраны с диаметром пор около $0.4\ \mu\text{m}$ и задержанные бактерии стафилококка (*a*) и кишечной палочки (*b*) соответственно.

свойств поверхности мембраны [2]. В то же время солевой баланс воды после мембранного фильтра практически не меняется, что делает данный способ очистки воды весьма привлекательным. В названных выше практических задачах за счет размерного эффекта из фильтрата удаляются различные клеточные структуры соответствующих размеров. Это крупноклеточные элементы крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты и другие, имеющие размеры порядка единиц микрон), а также некоторые патогенные бактерии, такие как бактерии кишечной палочки, стафилококка, холерный вибрион, штамм чумы, палочка Коклюша и другие биологически опасные объекты, размеры которых по классификации лежат в диапазоне $0.1\text{--}15\ \mu\text{m}$. На рисунке, *a* и *b*, приведенном в работе [3], представлены фотографии поверхности трековых мембран с задержанными бактериями стафилококка и кишечной палочки.

Важно заметить, что эффективность решения задачи разделения биологических объектов в первую очередь определяется физическими свойствами самих объектов. Так, например, в случае выделения из плазмы крови эритроцитов, имеющих форму диска размером $7 \times 2\ \mu\text{m}$ [4], номинальный диаметр пор трековой мембраны, надежно задерживающей крупноклеточные элементы, должен составлять около $0.4\ \mu\text{m}$, что обусловлено способностью эритроцитов значительно изменять форму

(деформироваться) под внешним воздействием. Объяснение механизма прохождения таких объектов через поры, например в работе [5], предполагает зависимость процесса от нескольких факторов, в первую очередь от способности объектов к предельному изменению формы без разрушения структуры (или „жесткости“ объекта) и трансмембранного давления. С другой стороны, эффективность процедуры разделения должна зависеть и от свойств самой мембраны — формы пор, гидрофильно-гидрофобного баланса поверхности и др. Вся совокупность указанных факторов, часть которых мало изучена, дает основания для проведения исследований по выделению конкретных интересующих объектов из различных сред с помощью ТМ и оптимизации условий процесса разделения.

Одним из актуальных объектов, представляющих значительный практический интерес, являются микобактерии туберкулеза (МБТ), входящие в род микобактерий, *Mycobacterium tuberculosis complex*, состоящий из *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis-BCG*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*. Основные возбудители туберкулеза у человека — *Mycobacterium tuberculosis* (человеческий вид) и *Mycobacterium bovis* (бычий вид). Кроме микобактерий туберкулезного комплекса имеется еще несколько десятков видов нетуберкулезных микобактерий, условно патогенных и сапрофитов. Основной видовой признак микобактерий туберкулеза — патогенность. Они весьма устойчивы ко многим факторам окружающей среды. Форма — слегка изогнутая или прямая палочка с размерами $1-10\ \mu\text{m} \times 0.2-0.6\ \mu\text{m}$ [6]. МБТ — достаточно „жесткие“ бактерии по сравнению с другими клеточными структурами. О возможности мембранного выделения МБТ упоминалось в одной из ранних работ [2] по мембранному разделению сред. Целью данной работы являлась оценка возможности применения трековых мембран при выделении МБТ из жидких сред.

Образцы трековых мембран были получены по технологии [7], состоящей в облучении полимерной пленки полэтилентерефталата (ПЭТФ) толщиной $12\ \mu\text{m}$ ионами аргона с энергией $53\ \text{MeV}$, ускоренными на циклотроне ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН. Отличие процедуры ионного облучения [7] от технологий, применяемых в других российских центрах, состояло в том, что при пространственно-временном формировании облучающего потока ионов, ускоренных на циклотроне, применялось высокочастотное электрическое сканирование с частотой в единицы МГц. Такой способ формирования позволяет получить оптимальные

Таблица 1. Параметры контрольных образцов трековых мембран

Номинальный диаметр, μm	Измерения по „методу пузырька“, μm	Плотность пор, cm^{-2}
0.16	0.15 ± 0.01	$3.5 \cdot 10^8$
0.2	0.20 ± 0.02	$2.2 \cdot 10^8$
0.3	0.3 ± 0.02	$8.4 \cdot 10^7$

распределения плотности ионов в сечении облучающего потока. Последующие сенсбилизация треков и химическое травление позволяют получить мембраны с требуемым диаметром пор. Для рассматриваемой задачи был получен набор мембран с номинальными диаметрами пор 0.16, 0.2 и 0.3 μm . Распределение осей пор в плоскости, перпендикулярной длине рулона мембраны, составляло $\pm 30^\circ$. Плотность пор измерялась с помощью оптико-электронного комплекса (оптический микроскоп Микомед + ПЗС-матрица) с общим увеличением около 6000. Диаметры пор определялись методом „продавливания пузырька“ [8], позволяющим определить средний эффективный диаметр пор мембраны. Плотности пор контрольных образцов подбирались для соответствующих диаметров такими, чтобы имелась максимальная селективность разделения, т.е. чтобы были исключены объемные наложения пор. Характеристики образцов ТМ приведены в табл. 1.

При исследовании стерилизующей эффективности мембранных фильтров в общей сложности использовалось 13 штаммов микобактерий: 4 музейных штамма (*M.tuberculosis* H37Rv, H37Ra, Erdman и *M.bovis*) и 9 штаммов, выделенных из патологического материала больных туберкулезом.

Готовили суспензии трехнедельных культур МБТ, выращенных на плотной яичной среде Левенштейна–Йенсена. Полную лопатку культуры помещали в сухую стерильную пробирку со стеклянными бусами и тщательно перемешивали с помощью миксера „Вортекс“. Добавляли в пробирку 3 ml физиологического раствора и повторно помещали в „Вортекс“ на 10–15 s, до образования суспензии, которую доводили до плотности 1 единица по стандарту McFarland с помощью денситометра DENCILAMETER. Приготовленные суспензии культур МБТ с плотно-

Таблица 2. Эффективность мембранных фильтров

Культуры микобактерий	Суммарное число			
	контроль		фильтр 0.2 μm	фильтр 0.3 μm
	без центрифугирования	центрифугирование		
Музейная H37Ra	17		—	—
Музейная H37Rv	13		—	—
Музейная Erdman	17		1	—
Музейная M.bovis	37		—	2
Штамм № 8041	5		—	—
Штамм № 8234	21		—	—
Штамм № 8455	7		—	—
Штамм № 8644	6		—	—
Штамм № 4702	38		—	—
Штамм № 3980	174		—	1
Штамм № 1249	4	28	1	1
Штамм № 2482	15	44	—	—
Штамм № 2463	17	27	—	—

Примечание: — роста микобактерий нет.

стями 10^3 cell ml делили на две части — контрольную и фильтрованную через трековые мембраны с соответствующими диаметрами пор. При этом контрольная часть в свою очередь формировалась из двух составляющих — с центрифугированием взвеси клеток микобактерий трех клинических изоляторов для увеличения концентрации клеток в 2 раза и без центрифугирования. Фильтрованная часть суспензий культур полностью подвергалась центрифугированию. Фильтрация проводилась при рабочем давлении около 0.05 МПа. Посевы помещались в термостат на температуру 37°C . Рост колоний МБТ регистрировали на 3, 6 и 10-й неделе инкубации.

Результаты исследования эффективности мембранных фильтров приведены в табл. 2. В таблице указаны количества наблюдаемых колоний микобактерий для соответствующих культур и условий получения суспензий. В таблице отсутствуют данные по работе с мембранами диаметром 0.16 μm по той причине, что рост бактерий всех культур на всех образцах через 10 недель отсутствовал. Очистка проб с помощью

мембран с диаметром пор $0.2\ \mu\text{m}$ дала рост одной колонии музейного штамма Erdman. Учитывая, что при работе с мембранами диаметром $0.3\ \mu\text{m}$ эта культура роста колоний не показала, результат по этой культуре для диаметра пор $0.2\ \mu\text{m}$ свидетельствует о технической ошибке эксперимента, связанной с неплотной закладкой мембраны в фильтрующую ячейку. С учетом технической ошибки при работе с мембранами диаметром $0.2\ \mu\text{m}$ получен рост 1 колонии из 12 исследованных культур. При работе с диаметром пор $0.3\ \mu\text{m}$ обнаружен рост 2 колоний музейного штамма *M.bovis*, крайне редко встречающегося в Российской Федерации и являющегося самым малоразмерным из всех видов микобактерий туберкулезного комплекса. Из двух клинических штаммов наблюдается рост по одной колонии в каждом случае. Таким образом, можно сделать вывод о том, что все исследованные образцы мембран обладают высокой стерилизующей способностью (активностью) в отношении микобактерий туберкулеза. Кроме того, близкие по значениям размеры микобактерий туберкулеза и критические диаметры пор трековых мембран, задерживающих микобактерии, подтверждают данные о сравнительной „жесткости“ МБТ.

Список литературы

- [1] *Басин Б.Я., Зеликсон Б.М., Гуревич К.Я.* и др. Мембранное устройство и способ его изготовления // Патент РФ 2021823. 1994. Бюлл. Изобр. № 20.
- [2] *Брок Т.* Мембранная фильтрация. М.: Мир, 1987.
- [3] *Возняковский А.П., Кудояров М.Ф., Басин Б.Я.* // Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. N 9–10. С. 90–95.
- [4] Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. проф. В.В. Меньшикова. Методы гематологических исследований. М.: Медицина, 1987. С. 106–149.
- [5] *Воинов В.А., Зеликсон Б.М., Мчедlishvili Б.В., Саркисов И.Ю., Басин Б.Я., Либов И.В., Карчевский К.С., Вавенко Е.П.* О некоторых особенностях гемодинамики в мембранном плазмаферезе ПФМ. Научно-технические ведомости СПбГТУ. 1998. № 2–3(12–13). С. 124–128.
- [6] *Борисов Л.Б.* Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: МИА, 2005.
- [7] *Карпухина Л.Г., Кудояров М.Ф., Матюков А.В., Патрова М.Я.* // Российская конференция „Мембраны-2001“. Тез. докл. 2001. С. 5.
- [8] *Дытнерский Ю.И.* Обратный осмос и ультрафильтрация. М.: Химия, 1978.