

УДК 577.356

П. Н. Пилипенко, А. М. Выродова

Московский физико-технический институт (государственный университет)

Биологическая активность воды после мембранной фильтрации

Обнаружено увеличение интенсивности биолюминесценции светящегося штамма бактерии *E. Coli* в растворе фосфатно-солевого буфера после его предварительной фильтрации через мембрану из эфиров целлюлозы. Величина эффекта возрастает с уменьшением размера пор мембраны. Показано, что эффект связан с экстрагированием из мембран биологически активных веществ. Высказано предположение об их строении. Предложены возможные пути для экспрессного тестирования качества мембран с помощью флуоресцентного и биолюминесцентного методов анализа.

Ключевые слова: мембранная фильтрация, биологическая активность, люминесценция бактерий, экспрессное тестирование.

P. N. Pilipenko, A. M. Vyrodova

Moscow Institute of Physics and Technology (State University)

Biological activity of the water after membrane filtration

It is discovered that the bioluminescence intensity of *E. Coli*'s bacterial luminescent a cellulose ester membrane. The magnitude of the effect increases with decreasing the membrane pore size. It is shown that the effect is associated with the extraction of biologically active substances from membranes. An assumption of their structure is made. Possible ways of membrane quality expresses testing using fluorescent and bioluminescent assay methods are suggested.

Key words: membrane filtration, biological activity, bacteria luminescence, expresses testing.

1. Введение

Мембранная фильтрация — это наиболее распространенная технология очистки водных растворов, применяемая в лабораторных и промышленных процессах. Для широкого круга пользователей основной интерес представляют свойства мембран задерживать нежелательные примеси, содержащиеся в исходных растворах. Именно это, как правило, указывают их производители. Наряду с этим, практически все мембраны способны выделять в фильтруемый раствор вещества, применяемые при их производстве и хранении. Причем скорости экстрагирования таких веществ из мембраны, а также их химические и биологические свойства могут сильно различаться. Например, известно [1], что мембраны на основе эфиров целлюлозы содержат ионы металлов, хлориды и фосфаты, имеющие большую скорость экстрагирования. В то же время большинство мембран содержат целый ряд органических соединений, используемых как смачивающие агенты: глицерин, полиоксипропиленовые эфиры (Твин 80), полиоксиэтилен-*n*-(*трет*-октил) фенолы (Тритон X-100) и др. Их экстрагирование может быть более продолжительным и требовать значительных объемов воды или фильтруемого раствора.

Следует отметить, что такие характеристики мембран, как содержание экстрагируемых веществ и их токсичность, очень редко указываются фирмами производителями. Для промышленных процессов наличие таких примесей может быть не принципиальным, тогда как для лабораторных биологических экспериментов это может иметь существенные последствия. Стандартными методами контроля биологической активности мембранных

примесей являются различные виды биотестирования воды или готовых физиологических растворов после длительного контакта с мембраной. В качестве объектов биотестирования используются различные микроорганизмы или лабораторные животные. Такие работы требуют существенных материальных затрат, времени и специальных условий, часто невыполнимых для многих лабораторий.

Целью данной работы являлось изучение физико-химических и биологических свойств водных растворов после мембранной фильтрации, выявление корреляций между этими свойствами, а также анализ возможных путей создания экспрессных методик для определения качества мембран, используемых в биологических экспериментах.

2. Материалы и методы

В работе использовали мембраны фирмы Millipore (GSWP02500) диаметром 25 мм из смешанных эфиров целлюлозы размерами пор 0,22; 0,45; 5 мкм. Фильтрацию проводили с помощью медицинского шприца объемом 25 мл и металлической насадки-держателя для мембраны. Перед каждым экспериментом используемая мембрана промывалась 3 раза небольшими порциями деионизованной воды объемом 20 мл.

Использовали фосфатно-солевой буфер (PBS) (Биолот, Россия), активированный уголь (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Курск, Россия) и деионизованную воду с сопротивлением 18.2 МОм·см, полученную от установки Milli-Q UF PLUS фирмы Millipore.

В работе использовался биолюминесцентный метод контроля состояния водной суспензии бактерий, который иногда применяется для оперативного определения качества водной пробы и токсичности испытуемых элементов и соединений [3, 4]. Использовали светящийся штамм бактерий *E. Coli* (препарат «Эколом», поставляемый фирмой ООО НТЦ «Аргумент»). Данный штамм бактерии непрерывно люминесцирует в области 465–495 нм. Свечение бактерий является побочной реакцией общего электронно-транспортного процесса в дыхательной цепи. Спонтанная люминесценция бактерий возникает при катализируемом люциферазой окислении комплекса «восстановленный флавиномононуклеотид-альдегид» и характеризует общий уровень метаболизма суспензии бактерий. Интенсивность биолюминесценции суспензии бактерий определяли с помощью люминометра «Биотокс-7» (АНО «Инженерный Центр-Экология»). Спектральные измерения проводили на спектрофлуориметре CM 2203 (SOLAR, Республика Беларусь) в кварцевых кюветах объемом 4 мл.

3. Приготовление суспензии бактерий

В пластиковую пробирку с крышкой объемом 50 мл помещали 10 мг препарата «Эколом» (лиофилизированные бактерии *E. coli* с компонентами питательной среды), добавляли 20 мл раствора фосфатно-солевого буфера, имеющего температуру 10 °С, выдерживали 30 минут при температуре 10 °С, а затем в течение 1 часа при комнатной температуре. В экспериментах добавляли 100 мкл такой суспензии к 1 мл исследуемой воды и измеряли интенсивность биолюминесценции этого образца.

4. Результаты и обсуждения

На рис. 1 представлены результаты измерений спектров флуоресценции деионизованной воды после фильтрации через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм и дополнительной фильтрации через аналогичную мембрану, покрытую слоем частиц активированного угля массой около 0.1 г и размером 50–100 мкм. Выбор длины волны возбуждения 230 нм был обусловлен тем, что это соответствует характерному максимуму поглощения для ароматических соединений. Появление характерных спектров у воды после фильтрации указывает на то, что происходит экстрагирование вещества, содержащего ароматические группы. Последовательное уменьшение интенсивности флуоресценции после дополнительных

фильтраций через мембрану с активированным углем также указывает на наличие гидрофобных ароматических групп. Известно [1], что из перечисленных выше веществ, используемых в качестве смачивателей мембран, ароматические фенольные группы содержит только Тритон X-100. В пользу этого предположения указывает представленный на рис. 1 спектр флуоресценции водного раствора Тритона X-100. Отметим, что при такой же последовательности фильтраций раствора PBS наблюдается аналогичная картина изменений его спектра флуоресценции.

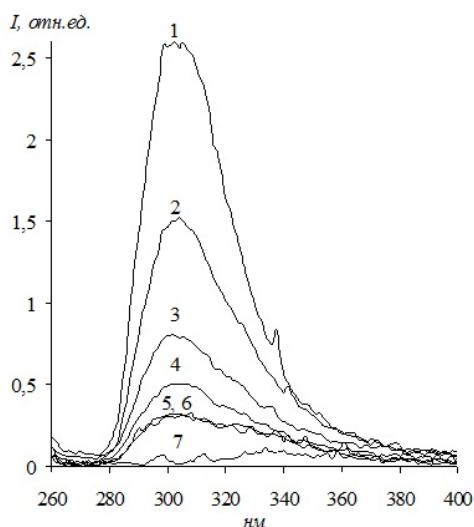


Рис. 1. Спектры флуоресценции деионизованной воды при длине волны возбуждения 230 нм: 1 — 1 нМ раствор тритона X-100 в деионизованной воде, 2 — деионизованная вода после 10 фильтраций через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм, 3, 4, 5, 6 — после 1, 2, 3, 4 дополнительных фильтраций через мембрану с активированным углем, 7 — исходная деионизованная вода

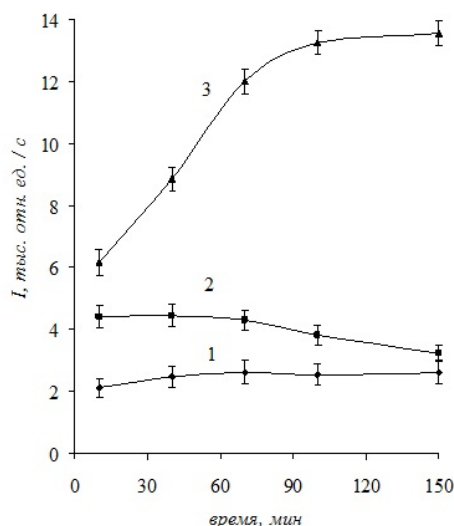


Рис. 2. Зависимость интенсивности люминесценции суспензии бактерий *E. Coli* от времени регистрации: 1 — в исходном растворе PBS (контроль), 2 — после 30 фильтраций через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм, 3 — после 20 дополнительных фильтраций через аналогичную мембрану, покрытую частицами активированного угля

Результаты биотестирования растворов PBS после 30-ти фильтраций через аналогичную мембрану, а также 20-ти дополнительных фильтраций через мембрану с активированным углем приведены на рис. 2. Полученные данные указывают на то, что из мембраны

выделяется, по крайней мере, ещё одно соединение, которое и является активатором люминесценции используемого штамма кишечной палочки. Из смачивателей мембран, указанных в [1], таким свойством, вероятно, может обладать вещество Твин-80, которое используется для стимуляции скрытого роста туберкулезной палочки [2]. Тритон X-100, который представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество, вероятно, является токсичным и ингибирует свечение бактерий либо образует в растворе молекулярный комплекс с молекулами Твин-80, делая их биологически неактивными.

Полученные далее данные также говорят в пользу того, что в ходе фильтрации происходит экстрагирование из мембраны вещества – активатора биолюминесценции – и позволяют оценить динамику его экстрагирования из мембраны. На рис. 3 и 4 представлены зависимости биологической активности растворов фосфатно-солевого буфера (PBS) от числа фильтраций через мембрану с размером пор 0.22 мкм и от размера пор мембраны после десяти фильтраций. Измерения интенсивности биолюминесценции суспензий проводили через 40 мин после добавления исходной суспензии бактерий к соответствующим образцам растворов.

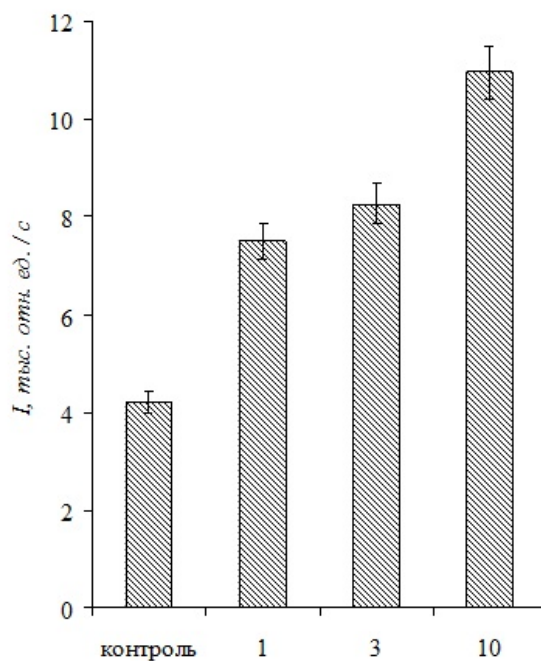


Рис. 3. Зависимость интенсивности биолюминесценции бактерий *E. Coli* от количества фильтраций PBS с размером пор 0.22 мкм

На рис. 5 представлены спектры флуоресценции 10-ти растворов PBS последовательно профильтрованных по 5 раз через одну и ту же мембрану с размером пор 0.45 мкм.

Биотестирование с помощью люминесцентных бактерий 10-го раствора PBS практически не обнаружило у него биологической активности.

Таким образом, полученные данные говорят об эффективности использования флуоресцентных и биолюминесцентных методов для экспрессного тестирования качества мембранных материалов. Обнаруженные изменения физико-химических и биологических свойств водной среды после мембранной фильтрации могут представлять определённый интерес для интерпретации биологических экспериментов с использованием синтетических мембран. Более детальное изучение изменений химического состава водных растворов после мембранной фильтрации, а также их биологическая активность по отношению к другим организмам представляет, на наш взгляд, большой научный и прикладной интерес и требует дальнейших исследований.

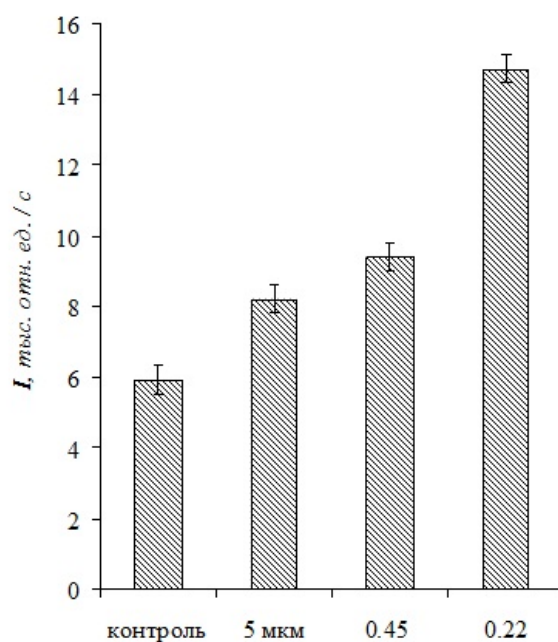


Рис. 4. Зависимость интенсивности билюминесценции бактерий *E. Coli* от размера пор мембраны после 10-ти фильтраций PBS

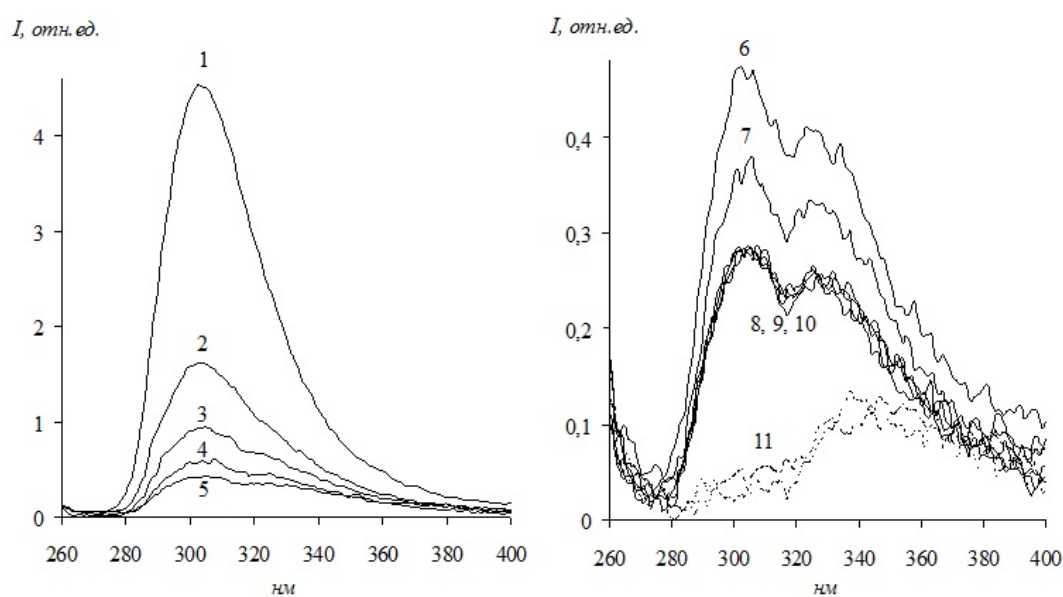


Рис. 5. Спектры флуоресценции 10-ти растворов PBS объемом 20 мл, последовательно профильтрованных 5 раз через мембрану с размером пор 0.45 мкм (кривые 1–10). Спектры флуоресценции исходного раствора, кривые — 11. Длина волны возбуждения 230 нм

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НПВШ Гос. Рег. №4.5460.2011.

Литература

1. Брок Т. Мембранная фильтрация. М.: Мир, 1987.
2. Досон Р. [и др.] Справочник биохимика. М.: Мир, 1991.

3. *Стом Д.И., Гиль Т.А., Балаян А.Э.* Бактериальная биолюминесценция и биотестирование. — Иркутск.: Изд-во Иркутского Университета, 1993.
4. *Акимов С.А., Трухан Э.М.* Многомерный биолюминесцентный сенсор качества воды // Сенсорные системы. 2002. Т. 16, № 3. С. 245–250.

References

1. *1. Brock T.* Membrane filtration. М.: Mir, 1987.
2. *Dawson R. [et al.]* Directory biochemist. М.: Mir, 1991.
3. *Stom D.I., Gil T.A., Balayan A.E.* Bacterial bioluminescence and biotesting. - Irkutsk.: Publishing House of the University of Irkutsk, 1993.
4. *Akimov S.A., Truhan E.M.* Multivariate bioluminescent sensor water quality. Sensory systems. 2002. V. 16, N 3. P. 245–250.

Поступила в редакцию 03.10.2013.