

Т.А. Змеева¹, В.В. Малышев¹, В.Б. Сбойчаков¹,
В.Я. Апчел¹, С.Г. Марданлы², Е.Е. Каталевский³

Совершенствование контроля качества воды с использованием мембранных технологий и специфических методов детекции

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Закрытое акционерное общество «ЭКОлаб», Электрогорск, Московская область

³Закрытое акционерное общество «ВЛАДИСАРТ», Владимир

Резюме. Рассматриваются вопросы современного состояния в области использования мембранных технологий в санитарном контроле качества воды, оценки основных преимуществ мембран для микрофильтрации и ультрафильтрации, а также перспективы использования новых мембран на основе инновационных материалов. Особое внимание уделено усовершенствованию методики мембранной фильтрации проб воды для концентрирования кишечных бактериальных и вирусных патогенов из водных объектов окружающей среды (поверхностные водоемы, сточные воды и другие), а также оценены возможности современных лабораторных методик, включая экспрессные, для детекции их маркеров. Широкое внедрение мембранных технологий в пробоподготовку и детекцию бактериальных и вирусных патогенов ведет к повышению информативности и сокращению времени исследований, что имеет важное эпидемиологическое значение. Указанные инновационные подходы, безусловно, расширяют лабораторные возможности при контроле качества воды в полевых условиях, при наводнениях, стихийных бедствиях, катастрофах и других ситуациях. Результаты проведенных экспериментальных исследований дают основание рекомендовать в практику санитарно-микробиологического контроля качества воды фильтрующие мембраны из определенных материалов с конкретным диаметром пор. Для подсчета *Escherichia coli* бактериологическим посевом на плотной питательной среде с помощью мембранной фильтрации рекомендуется использовать фильтрационные мембраны из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,45 мкм. Применение инновационных фильтрующих материалов для пробоподготовки и детекции ротавирусов в воде позволяет получать оптимальную для обнаружения более простыми экспресс-методами концентрацию ротавирусов, маркеры которых определяются в реакции агглютинации латекса и иммунохроматографического анализа. Это позволяет рассматривать возможность использования всего лабораторного комплекса контроля качества воды в экстремальных и полевых условиях.

Ключевые слова: кишечные инфекции, ротавирусы, контроль качества воды, фильтрующие мембраны, метод мембранной фильтрации, иммуноферментный анализ, полимерная реакция, реакция агглютинации латекса.

Введение. Одной из важнейших задач стоящих перед санитарной микробиологией, является разработка и совершенствование микробиологических методик исследования объектов внешней среды. Исследования, связанные с экологией и здоровьем населения, важны в связи с возрастающими рисками биологического загрязнения объектов среды.

Вода является одним из факторов передачи возбудителей кишечных инфекций бактериальной, вирусной и паразитарной этиологии. По данным Роспотребнадзора, в 2010 г. в Российской Федерации было зарегистрировано 44 вспышки водного характера с числом пострадавших 2095 человек [2]; в 2013 г. в России по сравнению с 2012 г. отмечался рост заболеваемости вирусным гепатитом А – на 5,7%, брюшным тифом – в 2,5 раза, а также энтеровирусными инфекциями – в 3,3 раза, в том числе энтеровирусным менингитом – в 3,4 раза. В 2014 г. в структуре инфекционной заболеваемости острые кишечные инфекции занимали рейтинговые позиции и составили 548,9 на 100 тыс. населения; в 2015 г. отмечен рост острых кишечных вирусных инфекций, при этом доминировала ротавирусная инфекция (84,5%) [3, 4, 6, 9].

Достоверность и эффективность санитарно-микробиологических исследований напрямую зависит

от пробоподготовки [10]. Среди различных методик пробоподготовки методика мембранной фильтрации воды рассматривается как один из унифицированных и перспективных для концентрирования контаминантов воды бактериальной и вирусной природы [1, 9, 14]. Для концентрирования бактерий и вирусов в санитарных исследованиях в основном используются пористые фильтрующие мембраны (ФМ) в виде дисков. Среди огромного количества постоянно синтезируемых материалов, используемых для изготовления фильтрующих мембран, только несколько гидрофильных синтетических органических полимеров используются в целях санитарного контроля качества воды. На сегодняшний день для концентрирования бактерий из воды на российском рынке представлены мембраны из следующих материалов: ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, регенерированной целлюлозы, полиамида, смеси эфиров целлюлозы и др. [8].

Приоритетность использования фильтрующих мембран в России связана с историей развития мембранных технологий. Первое производство мембранных фильтров было начато в 1922 г. в Германии из нитрата целлюлозы. Затем с 1927 г. организовано первое в мире коммерческое изготовление при участии разработчика

мембранных фильтров австрийского, немецкого химика Зигмонди Рихарда Адольфа, лауреата Нобелевской премии по химии в 1925 г., «За установление гетерогенной природы коллоидных растворов и за разработанные в этой связи методы, имеющие фундаментальное значение в современной коллоидной химии». Отечественное производство мембранных фильтров из ацетата целлюлозы было изначально предназначено для сгущения фитопланктона, и начато в 1931–1932 г. экспериментальной фабрикой ультрафильтров Министерства коммунального хозяйства Российской Советской Федеративной Социалистической Республики (г. Мытищи). С этого времени в России широко используются фильтрующие мембраны из ацетата целлюлозы. Так, для подсчета *Escherichia coli* (*E. coli*) в 1932 г. специалистами Рублевской водопроводной станции Москвы были внедрены в практику мембранные фильтры [7].

С появлением высокомолекулярного соединения полиамида в 60-е г. XX в. модификации полиамида с различными коммерческими названиями широко используются в мембранной фильтрации («капрон», «ПА-6», «ПА-66» и др.) [5]. Полиамидные мембраны нашли широкое применение для концентрирования вирусов из воды [9, 12]. В последнее время изучаются свойства положительно заряженных ФМ для концентрирования вирусов [14, 16].

Различные механизмы фильтрации водных проб через пористые ФМ определяют выбор режима фильтрации. Ситовой механизм применим для извлечения бактерий, когда частицы задерживаются порами мембран, меньшими по размеру, чем бактерии. Средний диаметр пор для извлечения бактерий более 100 нм, что соответствует микрофильтрационным технологиям. При размерах вирусов менее 100 нм, ситовой механизм реализуется в режиме ультрафильтрации [12].

Однако экспериментальная оценка мембран для ультрафильтрации, в том числе и амидо-имидных мембран, показала, что методика ультрафильтрации обладает высокой эффективностью при концентрировании вирусов из воды, но не позволяет проводить фильтрование больших объемов воды (10 л и больше) из-за быстрого забивания пор [9]. Опыт применения различных пористых микрофильтрационных мембран показал их эффективность в отношении удержания вирусов из водных проб [9, 16]. Установлено, что механизм сорбции вирусов на фильтрующих мембранах с размером пор 0,2 мкм (больше размера вирусных частиц) обусловлен слабыми взаимодействиями типа вандерваальсовых сил, гидрофобных взаимодействий и водородных связей; электростатическими силами. Поскольку вирусы при нейтральных pH заряжены отрицательно, то они адсорбируются на положительно заряженных фильтрующих мембранах, несущих в нейтральной области pH положительный заряд [15]. При этом ультрафильтрационные мембраны успешно применяются при концентрировании микроорганизмов в тангенциальном потоке [8].

Цель исследования. Оценить эффективность фильтрующих мембран, используемых для пробоподготовки

и детекции проб воды, по санитарно-микробиологическим и санитарно-вирусологическим показателям качества, нормируемым регламентирующими документами.

Материалы и методы. В экспериментальных исследованиях изучали эффективность фильтрующих мембран в виде дисков в отношении концентрирования бактерий и вирусов из воды в режиме микрофильтрации. Предварительная подготовка ФМ проводилась согласно рекомендациям, перечисленным в паспорте производителя. Для концентрирования и выделения бактерий и вирусов из воды использовали аппараты для мембранной фильтрации воды: прибор вакуумного фильтрования «ПВФ-35» и аппарат напорной фильтрации «АФ-142».

Для извлечения бактерий исследовались ФМ из различных материалов со средним диаметром пор 0,45 и 0,2 мкм на основе ацетата целлюлозы (ФМАЦ-0,2, ФМАЦ-0,45); нитрата целлюлозы (ФМНЦ-0,2, ФМНЦ-0,45); смеси эфиров целлюлозы (ФМСЭ-0,45); полиамида (ФМПА-0,2). Детекцию бактерий проводили с использованием бактериологического посева способом мембранной фильтрации. Модельные водоемы с внесенной суточной культурой *E. coli* М17-02 в объеме 100 мл пропускали через устройства для фильтрации воды. Фильтрующий материал переносили на чашки Петри со средой Эндо и инкубировали в течение (21 ± 3) ч при 37 °С. Определяли общее количество колоний *E. coli*, а также количество типичных колоний, выросших на фильтре, в сравнении с прямым посевом, согласно методикам, указанным в нормативных документах [13]. Результаты выражали числом колониеобразующих единиц (КОЕ) *E. coli*. При оценке мембранных фильтров для извлечения бактерий учитывался «процент извлекаемости» (удержания) мембранных фильтров, который в соответствии с нормативной документацией должен быть $\geq 80\%$ [13].

Исследовали эффективность мембран в отношении концентрирования вирусов с размером пор 0,2 мкм из материалов: полиэфирсульфона (ПЭС-0,2), полиамида (ФМПА-0,2), смеси эфиров целлюлозы (ФМСЭ-0,22), капрона с положительным зарядом со средним диаметром пор 0,2 мкм (Капрон+). Разные объемы модельных растворов ротавирусов в концентрации 10^7 вирионов/мл в дистиллированной воде пропускались через мембранные фильтры. Затем элюентом двукратно по 10 мл (3% бифэкстракт на трис-буфере, pH 9, 1–9,5) проводили механический смыв с поверхности мембраны в течение нескольких минут; pH полученного элюата довели до 7,0–7,5 1,0 N раствором соляной кислоты [9]. Маркеры ротавирусов в элюатах определяли, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический анализ (ИХА) и реакцию агглютинации латекса (РАЛ). Для проведения ПЦР применяли программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Полученные в результате экспериментальных и натуральных исследований данные были обработаны

статистически с использованием программного обеспечения Microsoft Office 2007.

Результаты и их обсуждение. Наибольшая эффективность сорбции *E. coli* при бактериологическом посеве методом мембранной фильтрации получена на ФМ (рис. 1).

Наибольшая эффективность извлекаемости (удержания) *E. coli* при бактериологическом посеве способом мембранной фильтрации получена на ФМ из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,45 мкм. Результаты с наибольшей сорбционной способностью получены при использовании ФМ из полиамида со средним диаметром пор 0,2 мкм, при этом выявлены особенности роста *E. coli* на полиамидной мембране в виде роста колоний только в R-форме (рис. 2).

Сорбирующую эффективность микрофильтрационных ФМ в отношении ротавирусов оценивали по результатам детекции маркеров ротавирусов (антигенов и рибонуклеиновой кислоты) в фильтратах. Наибольшая сорбция ротавирусов определена на полиамидных мембранах: ФМПА-0,2 и Капрон+, на которых маркеры ротавирусов в фильтратах определялись способом ПЦР и не определялись ИФА (табл. и рис. 3).

Эффективность элюции определялась расчетным методом с учетом содержания ротавирусов в элюатах. В результате определения маркеров ротавирусов в элюатах после фильтрации 0,01 л контаминированной ротавирусами воды в концентрации не $< 10^7$ /мл с использованием различных методик получены результаты, подтверждающие наибольшую эффективность концентрирования ротавирусов на полиамидных

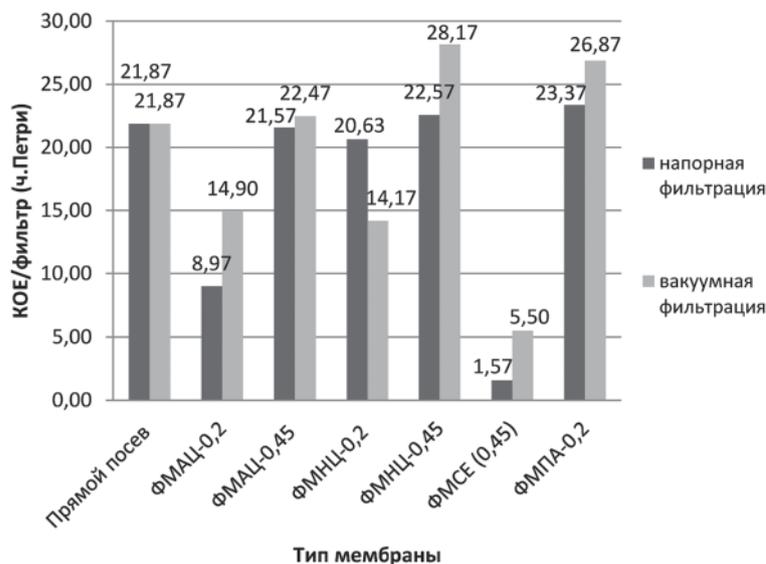


Рис. 1. Среднее количество колоний *E.coli*, адсорбированных на изученных фильтрационных мембранах, в сравнении с прямым посевом, (КОЕ), n=30

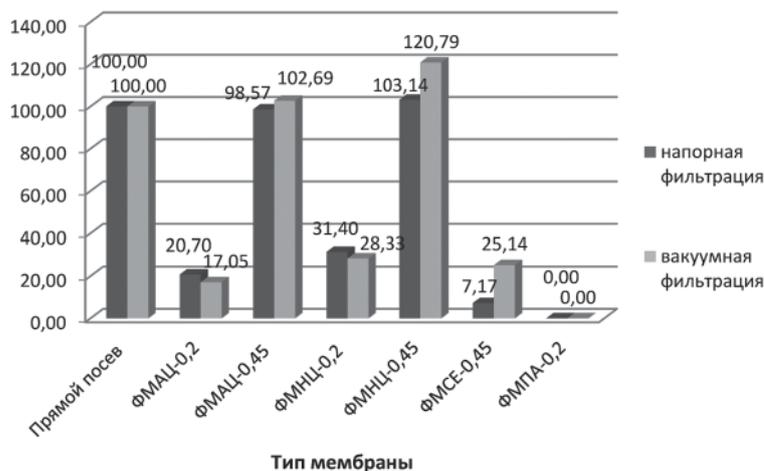


Рис. 2. Эффективность извлекаемости (удержания) *E.coli* на фильтрационных мембранах при бактериологическом посеве методом мембранной фильтрации, в сравнении с прямым посевом, n=10

мембранах (полиамидной фильтрующей мембране ФМПА-0,2 и мембране Капрон+), рисунок 4.

Таким образом, эффективность сорбции на полиамидных мембранах приблизительно в 20 раз больше по сравнению с фильтрующими мембранами из полиэфирсульфона и смеси эфиров целлюлозы. В то же время эффективность элюции у фильтрующей

мембраны из капрона с положительным зарядом на порядок больше, чем у полиамидной мембраны.

Заключение. Результаты проведенных экспериментальных исследований дают основание рекомендовать в практику санитарно-микробиологического контроля качества воды различных водных объектов

Таблица

Результаты определения маркеров ротавирусов в фильтрах воды

Объем проб воды, л	Концентрация ротавирусов /мл	Материал мембран				Методика исследования
		ФМПА-0,2 мкм, n=10	ПЭС-0,2 мкм, n=10	Капрон+, n=10	ФМСЕ-0,22 мкм, n=10	
0,01	10 ⁷	- / - / +	- / + + + / +	- / - / +	- / + / +	ИХА/ИФА/ПЦР
0,1	10 ⁶	- / - / +	- / + + + / +	- / - / +	- / + / +	ИХА/ИФА/ПЦР
1,0	10 ⁵	- / - / +	- / + + + / +	- / - / +	- / + / +	ИХА/ИФА/ПЦР

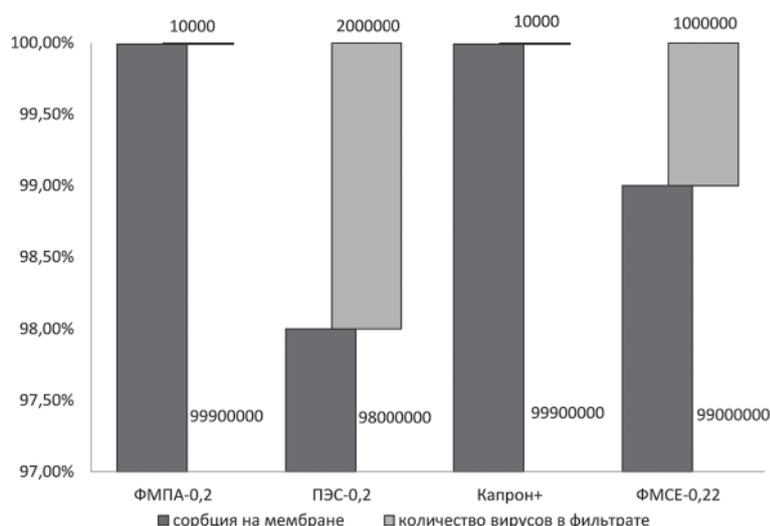


Рис. 3. Графическая характеристика сорбции ротавирусов на исследуемых мембранах при фильтрации 0,01 л контаминированной ротавирусами воды в концентрации не < 10⁷/мл, n=10

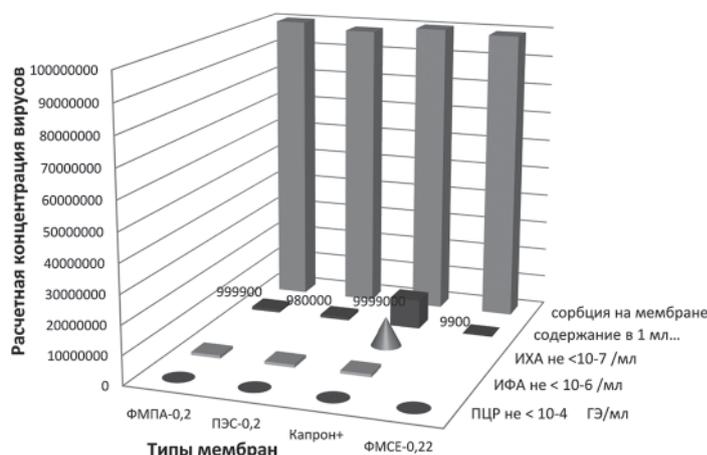


Рис. 4. Результаты детекции маркеров ротавирусов в элюатах воды после фильтрации, n=10

определенные материалы и конкретный диаметр пор фильтрующих мембран. Для подсчета *E. coli* бактериологическим посевом на плотной питательной среде методом мембранной фильтрации рекомендуется использовать ФМ из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,45 мкм.

Максимальное количество ротавирусов извлечено из воды с помощью капроновых (полиамидных) мембран с положительным зарядом. В элюатах маркеры ротавирусов определялись с использованием ПЦР, ИФА и экспресс-методик ИХА, РАЛ. Использование инновационных фильтрующих материалов для пробоподготовки и детекции ротавирусов в воде позволяет получать большую концентрацию ротавирусов, маркеры которых определяются более простыми экспресс-методиками. Это позволяет рассматривать возможность использования всего лабораторного комплекса контроля качества воды в экстремальных ситуациях и в полевых условиях.

Литература

1. Богатырева, И.А. Экспериментальное обоснование возможности использования трековых мембран при выполнении санитарно-бактериологического анализа воды / И.А. Богатырева, А.Е. Недачин, Г.С. Жданов // Водоснабжение и санитарная техника. – 2007. – № 5. – С. 17–20.
2. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2010 году». – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 431 с.
3. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году». – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2014. – 191 с.
4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году». – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2016. – 200 с.
5. Дубяга, В.П. Полимерные мембраны / В.П. Дубяга, Л.П. Перепелкин, Е.Е. Каталевский. – М.: Химия, 1981. – 232 с.
6. Змеева, Т.А. Совершенствование санитарно-микробиологических исследований воды с использованием мембранных технологий и специфических методов детекции / Т.А. Змеева [и др.] // Сб. мат. Всеросс. научн.-практ. конф. – СПб.: Человек и его здоровье, 2015. – С. 53–56.
7. Корш, Л.Е. Ускоренные методы санитарно-бактериологического исследования воды / Л.Е. Корш, Т.З. Артемова. – М.: Медицина, 1978. – 272 с.
8. Малышев, В.В. Использование мембранных технологий в санитарной микробиологии: Учебное пособие / В.В. Малышев, В.Б. Сбойчаков. – СПб.: ВМА, 2016. – 88 с.
9. Малышев, В.В. Мембранные технологии в пробоподготовке и детекции кишечных вирусов в водных объектах / В.В. Малышев, [и др.] // Санитарный врач. – 2016. – № 12. – С. 28–35.
10. Малышев, В.В. Роль производственного лабораторного контроля за качеством воды как составная часть санитарного надзора / В.В. Малышев // Санитарный врач. – 2012. – № 8. – С. 48–51.
11. Методические указания 4.2.0209-05. Санитарно-вирусологический контроль водных объектов. – М., 2006. – 10 с.
12. Мулдер, М. Введение в мембранную технологию: пер. с англ. / М. Мулдер. – М.: Мир, 1999. – 513 с.
13. Методические указания 2.1.4.1057-01 Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды. (ред. изм. № 1 от 12.07.11). – Введ. впервые 01.10.2001. – 2011. – 66 с.
14. Санамян, А.Г. Использование мембранного модуля МФМ-0142 для концентрации вирусов при санитарно-вирусологическом контроле водных объектов / А.Г. Санамян, [и др.] // Гигиена и санитария. – 2006. – № 6. – С. 74–76.
15. Санамян, А.Г. Разработка и гигиеническая оценка метода концентрирования вирусов с использованием позитивно-заряженных фильтрующих мембран для санитарно-вирусологического исследования воды различных водных объектов : дисс. ... канд. биол. наук / А.Г. Санамян. – М. – 2005. – 151 с.
16. Тарасов, А.В. Применение мембран с положительным поверхностным зарядом для санитарно-вирусологического контроля воды / А.В. Тарасов [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 1 (9). – С. 2372–2376.

T.A. Zmeeva, V.V. Malyshev, V.B. Sboychakov, V.Ya. Apchel, S.G. Mardany, E.E. Katalevsky

Improvement of control of water quality using membrane technology and specific methods of detection

Abstract. Questions of modern condition in using of membrane technologies in the sanitary control of water quality, assessment of the main advantages of membranes for microfiltration and ultrafiltration, as well as the prospects for the use of new membranes based on innovative materials were considered. Special attention in research was given to the improvement of the method of membrane filtration of water samples for the concentration of enteric bacterial and viral pathogens from water bodies of the environment (surface waters, waste water, etc.), and evaluated the capabilities of modern laboratory techniques, including rapid, for detection of their markers. The widespread introduction of membrane technology in sample preparation and detection of bacterial and viral pathogens leads to increased information content and reduced research time, which has important epidemiological significance. These innovative approaches will definitely expand our testing capabilities in the control of water quality in field conditions, flood, natural disasters, disaster at addressing the challenges faced by troops, and other situations. The results of the conducted experimental studies give reason to recommend the practice of sanitary-microbiological control of water quality filtration membranes of certain materials with specific pore diameter. For counting *Escherichia coli*, bacteriological sowing on a dense nutrient medium with the membrane filtration method, it is recommended to use filtration membranes of cellulose acetate and cellulose nitrate with an average pore diameter of 0,45 μm. Application of innovative filter media for sample preparation and detection of rotaviruses in water, allowed to obtain the optimum for the detection of more simple and rapid methods the concentration of rotaviruses whose markers were determined in the reaction of agglutination of latex and by immunochromatographic analysis. This allowed us to consider the use of the entire laboratory complex of quality control of water in the extreme and field conditions.

Key words: intestinal infections, rotaviruses, water quality control, filtration membrane, membrane filtration method, enzyme immunoassay, polymerase reaction, agglutination of the latex.

Контактный телефон: +7-921-915-16-41; e-mail: vladimal_spb@list.ru