

Jarosław SKOWROŃSKI*

METODYKA OCENY WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH MODYFIKOWANYCH MEMBRAN FILTRACYJNYCH

Istotą procesów membranowych jest rozdział mieszanin poprzez zagęszczenie części jej składników (w tym potencjalnie obecnych drobnoustrojów) po jednej stronie układu. Skutkuje to tworzeniem warunków, sprzyjających formowaniu biofilmów mikrobiologicznych na powierzchni czynnej membrany (nazywane inaczej bio-foulingiem), co prowadzi do znaczącego obniżenia wydajności i ekonomii procesu. Powszechnie stosowane metody zapobiegania temu zjawisku bywają niewystarczające dla utrzymania optymalnych parametrów układu. Dlatego też, zasadnym wydaje się skojarzenie kilku technik, w tym opartych o modyfikacje powierzchni membran filtracyjnych. W niniejszym opracowaniu zaprezentowano metodykę oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych prototypowych membran funkcjonalizowanych. Ich skuteczność określano względem reprezentatywnych szczepów *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Ocenie poddano również stopień bio-foulingu powierzchni badanych materiałów. Uzyskane rezultaty potwierdzają przydatność opracowanej metodyki, podkreślając jednocześnie zasadność funkcjonalizowania powierzchni polimerowych membran filtracyjnych.

1. WSTĘP

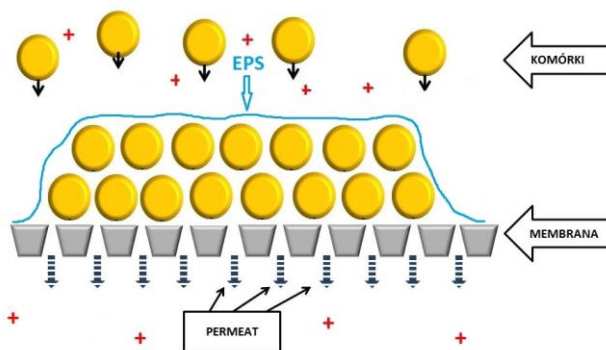
1.1. BIO-FOULING POWIERZCHNI FILTRACYJNYCH

Techniki membranowe w procesach rozdziału, z początku uznawane w kategoriach metod pomocniczych, z czasem głównie na skutek osiągnięć w dziedzinie chemii tworzyw sztucznych stały się podstawą wielu technologii w dużej skali. Obecnie, z uwagi na uniwersalność, efektywność, prostotę, selektywność, niskie nakłady energetyczne, stabilność operacyjną oraz łatwość kontroli procesu, membrany filtracyjne są szeroko stosowane w procesach, takich jak rozdzielanie produktów, zagęszczanie, oczyszczanie, klarowanie, emulsyfikacja, krystalizacja itp. [9].

* Instytut Technologii Eksploatacji – PIB. ul. K. Pułaskiego 6/10, 26-600 Radom

Głównymi surowcami, stosowanymi do wytwarzania membran filtracyjnych, są polimery takie jak polietylen, polipropylen, poliamid i polisulfon. Charakteryzują się bardzo dobrymi ogólnymi właściwościami fizyko-chemicznymi i łatwością przetwarzania [10]. Nie posiadają jednak specyficznych właściwości powierzchniowych, a znaczna porowatość – w połączeniu z warunkami pracy – sprzyja zjawisku bio-foulingu.

Istotą procesów membranowych jest rozdział mieszanin i zagęszczenie części jej składników (w tym potencjalnie obecnych drobnoustrojów) po jednej stronie układu (rys.1). Stwarza to warunki sprzyjające formowaniu biofilmów mikrobiologicznych z uwagi na istotną rolę czynnika zagęszczenia populacji [4].



Rys. 1. Istota i skutki foulingu biologicznego powierzchni membrany polimerowej

Drobnoustroje tego samego gatunku, żyjące w formie planktonicznej (rozproszonej w wodnym środowisku), niejednokrotnie charakteryzuje odmienna morfologia i profil metaboliczny niż formy osiadłe, związane z podłożem. Wynika to ze zdolności części mikroorganizmów (bakterii i niektórych grzybów) do wyczuwania bądź szacowania gęstości populacji, której jest częścią, a zjawisko to nazywane jest *quorum sensing* (łac. *quorum* - wystarczająca obecność). Bakterie gram-dodatnie i gram-ujemne wykształciły różne systemy szacowania kworum, jednak w obu przypadkach polega on na wydzielaniu do środowiska cząstek sygnałnych, zwanych autoinduktorami, oraz rozpoznawania stężenia autoinduktorów własnych i obcych w otaczającym środowisku. Osiągnięcie pewnego stężenia granicznego (zależnego gatunkowo) powoduje zmiany w ekspresji pewnych rejonów genomu i tym samym aktywację lub supresję określonych genów [6]. Efektem są zmiany metaboliczne i fizjologiczne komórek drobnoustroju, polegające na np. utracie narządów ruchu czy wzmożonym wydzielaniu zewnątrzkomórkowych substancji polimerycznych (ang. *Extracellular Polymeric Substances* - EPS), tworzących tzw. macierz biofilmu. Substancje polimeryczne, głównie o charakterze polisacharydów, odpowiadają za fizyczną stabilizację biofilmu i jego trwałą adhezję do podłoża. Oprócz tego, EPS otaczając komórki drobnoustroju chronią je przed wysychaniem i utrudniają dyfuzję substancji toksycznych ze środowiska. [5]. Ponadto, struktura i układ komórek w przekroju poprzecznym przez biofilm także odzwierciedla strategię przetrwania i płynące z niej korzyści dla popu-

lacji drobnoustroju. W obrębie biofilmu komórki tworzą mikrokolonie, które z powodu zróżnicowanego dostępu do tlenu i substancji odżywczych cechuje gradient wielkości i aktywności metabolicznej komórek. Dzięki temu komórki, znajdujące się najgłębiej, są fizycznie chronione przez pozostałe przed niekorzystnymi czynnikami środowiska, a spowolniony lub zahamowany metabolizm czyni je niepodatnymi na działanie np. wielu antybiotyków. Przestrzenie między mikrokoloniami tworzą sieć kanałów wodnych, zapewniających dystrybucję substancji odżywczych, usuwanie produktów przemiany materii oraz utrzymywanie odpowiedniej wilgotności środowiska biofilmu. [7]. Wszystkie te cechy sprawiają, że mikroorganizmy wykształciły prosty, lecz skuteczny sposób przeżycia w niekorzystnych warunkach otoczenia. Niejednokrotnie jest on jednak źródłem problemów i strat w przemyśle wskutek zakłóceń technologii na różnych etapach prowadzonego procesu.

1.2. PRZECIWDZIAŁANIE BIO-FOULINGOWI

Materiały, stosowane powszechnie do produkcji membran polimerowych, posiadają istotne właściwości aplikacyjne, takie jak wytrzymałość, łatwość formowania zarówno kształtu membrany, jak i wielkości porów, oraz są relatywnie tanie [9]. Porowatość oraz brak toksyczności w stosunku do komórek drobnoustrojów, w połączeniu ze specyfiką procesu filtracji, czyni je jednocześnie dobrym podłożem do kolonizacji, na którym (przy odpowiednim składzie chemicznym nadawy) zachodzi intensywny fouling biologiczny. Próbuje się ograniczyć to zjawisko poprzez stosowanie przepływu krzyżowego (ang. *cross flow*) omywającego powierzchnię membrany lub przepływu wstecznego (ang. *back pulse*) [8], jednak w niektórych przypadkach bywa to nieskuteczne. Wprowadzenie biocydu do fazy ciekłej układu, choć efektywne, z uwagi na charakter procesu nie zawsze jest możliwe, dlatego też zasadną i racjonalną drogą rozwiązania problemu foulingu biologicznego wydaje się łączenie kilku technik. Biofouling mógłby być potencjalnie ograniczony lub zahamowany drogą obniżenia ogólnej liczebności populacji komórek drobnoustrojów obecnych w nadawie i/lub zmianę właściwości powierzchniowych elementów filtracyjnych w taki sposób, aby nie dopuścić do ich kolonizacji. Cechy te mogą zostać nadane na etapie komponowania materiału lub poprzez modyfikację gotowej membrany. Właśnie ta droga, dzięki dostępności szerokiej gamy komercyjnych, "surowych" membran polimerowych, oferuje potencjalnie szeroki zakres wprowadzanych modyfikacji, wydaje się racjonalna i ekonomicznie uzasadniona [1]. Wykorzystanie technik inżynierii powierzchni staje się zatem drugim zasadniczym elementem branży przetwórstwa tworzyw sztucznych. Powszechnie stosowanymi technikami są: ekspozycja na płomień i różnego rodzaju promieniowanie oraz działanie plazmą, chemikaliami, strumieniem fotonów, elektronów lub jonów [2]. Operacje te mają na celu między innymi: zmianę hydrofilowości, zwiększenie usieciowania powierzchni, usunięcie warstw granicznych i zanieczyszczeń oraz wprowadzenie na powierzchni dodatkowych grup chemicznych użytecznych funkcjonalnie [3]. Zmiana właściwości powierzchni może polepszyć cechy polimerów

membranowych, takie jak strumień filtracji czy selektywność, zredukować zjawisko foulingu oraz wzbogacić powierzchnię o dodatkowe grupy funkcyjne. Modyfikacje te mogą znajdować zastosowanie w niemal każdej aplikacji [1].

Celem podjętych działań jest opracowanie metodyki miarodajnej oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych i anty-biofoulingowych modyfikowanych membran filtracyjnych.

2. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Obiekty do badań zostały udostępnione w ramach współpracy z Wydziałem Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej*. Próbkę w formie kapilarnych, mikrofiltracyjnych membran polipropylenowych cechowały różnice w charakterze powierzchniowej modyfikacji (umownie nazwane P1-P4). Nowe właściwości powierzchniowe zostały nadane drogą obróbki chemicznej i fizycznej z wykorzystaniem technik modyfikacji plazmowej, polimeryzacji szczepionej inicjowanej plazmowo oraz chemicznej depozycji z roztworu. Próbkę kontrolne stanowiły odcinki niemodyfikowanych (natywnych) membran polipropylenowych (K).

Oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych i antifoulingowych dokonywano względem dwóch mikroorganizmów reprezentatywnych dla grupy bakterii gram dodatnich (*Bacillus subtilis* PCM2021) i gram ujemnych (*Escherichia coli* PCM2560). Drobnoustroje pochodzą z kolekcji Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Eksperymenty zostały dobrane w sposób, umożliwiający ocenę zmian, zachodzących w hodowlach w warunkach statycznych oraz dynamicznych, imitujących rzeczywiste środowisko pracy membran filtracyjnych.

We wszystkich doświadczeniach wykorzystano komercyjne podłoże LB firmy A&A Biotechnology (płynne lub zestalane dodatkiem 1,5% agaru), przygotowywane zgodnie z zaleceniami producenta. pH podłoża ustalano na 7,1÷7,2 po czym poddawano sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min. Hodowle wyjściowe przeznaczone do inokulacji prowadzono w kolbach Erlenmeyera (obj. 100 ml) poprzez szczepienie 20 ml podłoża LB i inkubację w temperaturze 37°C przez jedną dobę. Pomiary gęstości optycznej hodowli OD₅₅₀ (absorbancji zawiesiny przy długości fali 550 nm) realizowano z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS JASCO V-630, używając kuwet o drodze optycznej 2 mm.

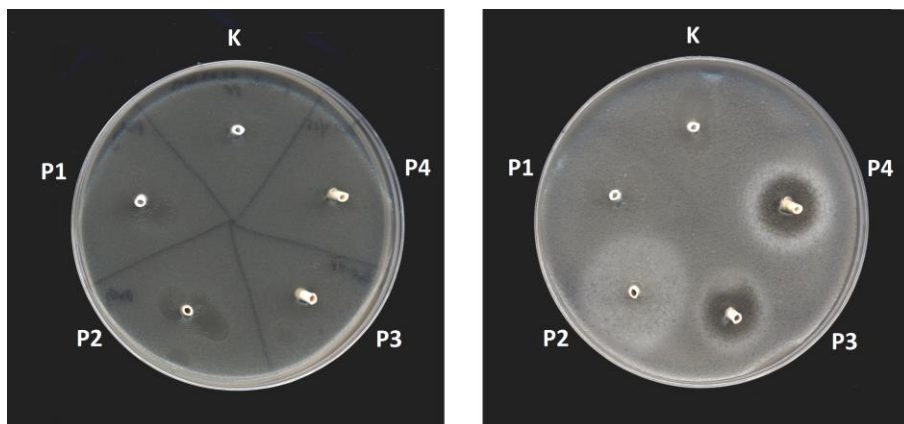
Testy płytkowe wykonywano poprzez szczepienie 20 ml podłoża LB (1% agaru) dodatkiem 100 µl zawiesiny danego drobnoustroju o gęstości optycznej OD₅₅₀=0,1. Tak przygotowane podłoże przenoszono na sterylne płytki Petriego, a po częściowym zestaleniu w warunkach jałowych umieszczano w nim próbki membran o długości ok. 5 mm. Obiekty te poddawano uprzedniemu odkażeniu w 70%-owym roztworze etanolu przez 1 h i suszono. Tak przygotowane próbki inkubowano w szafie termostatowanej Lovibond przez 24 h w temperaturze 37°C. Z uwagi na możliwą aktywność foto-

katalityczną części modyfikacji powierzchniowych, we wnętrzu komory inkubacyjnej umieszczono świetlówkę o mocy 13 W w odległości ok. 20 cm od naczyń.

Eksperymenty, w warunkach dynamicznych, w hodowlach płynnych, prowadzono w kolbach Erlenmeyera (obj. 50 ml) poprzez szczepienie 8 ml sterylnego podłoża LB dodatkiem zawiesiny bakteryjnej do końcowego $OD_{550}=0,1$. Do tak przygotowanych naczyń wprowadzano uprzednio sterylizowane w etanolu (1 h) i wysuszone próbki membran. Kolby zamykano korkami, umożliwiającymi wymianę gazową, oraz umieszczano w zestawie inkubacyjnym, składającym się z wytrząsarki o ruchu orbitalnym SeaStar firmy Heathrow Scientific, zamontowanej w szafie termostatowanej Lovibond, której komorę oświetlano świetlówką. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C, przy 220 obr./min, przez 24 h. Po inkubacji ponownie mierzono gęstość optyczną podłoża. Usunięte próbki membran przenoszono do probówek i przemywano 3 ml jałowego podłoża. Następnie przenoszono je do kolejnych probówek, wprowadzano 3 ml świeżego podłoża i poddawano intensywnemu wytrząsaniu na wortexserze przez 2 min. Oznaczano OD_{550} uzyskanej zawiesiny oraz określono liczbę jednostek tworzących kolonie metodą płytkową.

3. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

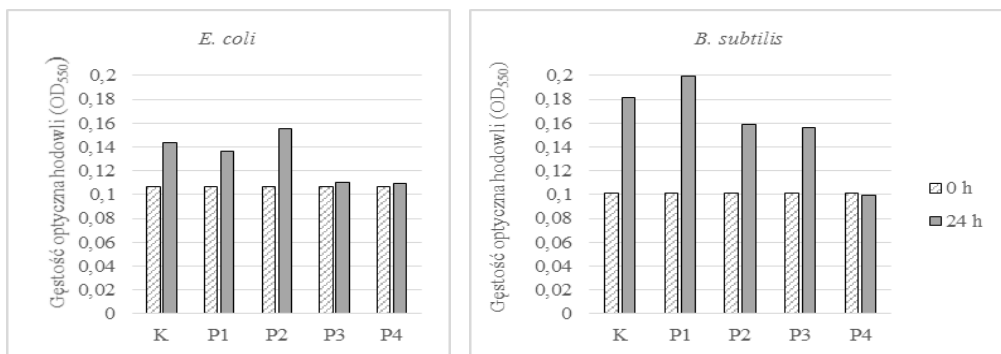
Wyniki testów płytkowych zostały zaprezentowane na rys. 2. Drobnoustroje, rosnące w podłożu w formie jednolitego zmętnienia, w różny sposób zachowywały się w pobliżu umieszczonych próbek membran. Sposób, w jaki umieszczano badane próbki eliminował zmienną, związaną z głębokością zanurzenia oraz ułatwiał porównania i interpretację.



Rys. 2. Testy płytkowe do wstępnej oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowej badanych materiałów (od lewej: *E. coli*, *B. subtilis*)

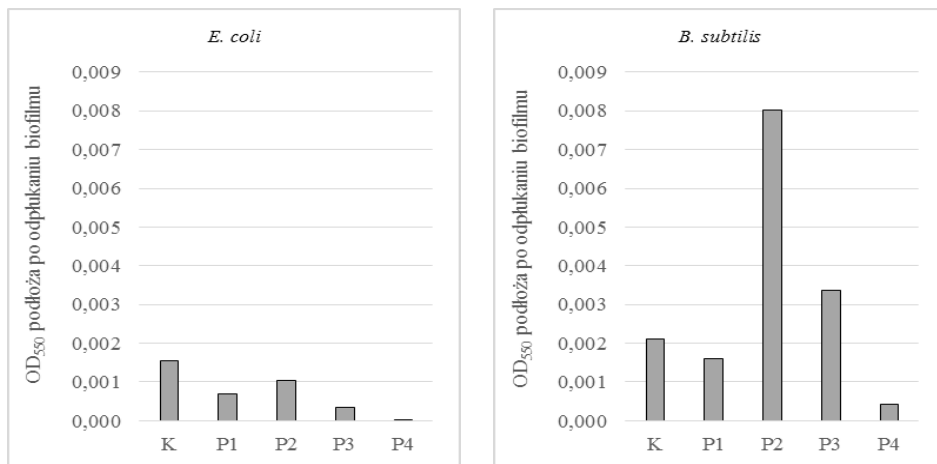
W przypadku obu drobnoustrojów zmętnienie podłoża w okolicach próbki kontrolnej i P1 nie uległo zmianie. W pobliżu próbki P2 (szczególnie dobrze widoczne w przypadku *B. subtilis*) zaobserwowano wyraźnie większe zmętnienie podłoża, co może mieć związek z występowaniem na powierzchni membrany substancji o charakterze mikroelementu, będącego w niedoborze, lub też z wywołaniem u tego drobnoustroju wytwarzania endospor. Bardzo wyraźne strefy przejaśnienia wystąpiły w otoczeniu próbek oznaczonych jako P3 i P4. Zupełny brak zmętnienia wokół membran i znaczna średnica powstałej strefy sugeruje związek z uwalnianiem i migracją w podłożu czynników o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, takich jak np. wolne rodniki. Wskazuje na to również obecność w czasie inkubacji świetlówki (źródło niewielkiej ilości promieniowania UV do inicjowania reakcji fotokatalitycznych) oraz fakt stosowania niskiego stężenia czynnika zestalającego w podłożu, ułatwiający dyfuzję. W przypadku testów płytkowych, szczepionych pałeczką okrężnicy, nie zaobserwowano zmian zmętnienia w okolicy P2, a strefy przejaśnień wokół P3 i P4 są obecne, choć znacznie mniej widoczne niż na płytkach szczepionych *B. subtilis*. Może mieć to związek z brakiem zdolności *E. coli* do tworzenia przetrwalników oraz wzrostem w postaci znacznie mniejszego zmętnienia.

Doświadczenia z wykorzystaniem hodowli płynnych dostarczyły wyników, zgodnych ze wstępną oceną, dokonaną na podstawie testów płytkowych. Prowadzone eksperymenty imitowały rzeczywiste warunki pracy membran, choć obecność ciał stałych w wytrząsanych hodowlach może wprowadzać dodatkowy czynnik stresu mechanicznego. Uznano jednak, że kontrola w formie hodowli inkubowanej z fragmentami membran natywnych będzie wystarczająca do interpretacji. Oceny wpływu obecności badanych obiektów w podłożu hodowlanym dokonywano drogą porównań zmian OD₅₅₀ (pomiar w chwili szczepienia oraz po 24 h inkubacji). Na załączonym diagramie (rys. 3) przedstawiono zarejestrowane zmiany gęstości optycznej w przeliczeniu na 1 cm² membrany kapilarnej obecnej w układzie.



Rys. 3. Zmiany gęstości hodowli po 24-godzinnej inkubacji z próbkami badanych materiałów

We wszystkich naczyniach poddanych inkubacji zaobserwowano przyrost OD₅₅₀ po 24 h, co świadczy o tym, że modyfikowane powierzchniowo membrany początkowo nie inaktywują wprowadzonego inokulum. Należy pamiętać, że pomiar gęstości optycznej uwzględnia również komórki martwe o zachowanej integralności błon cytoplazmatycznych, dlatego też wysoka wartość OD₅₅₀ nie w pełni odzwierciedla stan fizjologiczny hodowli i jej potencjał do tworzenia biofilmu. Obserwowany wzrost OD₅₅₀ w każdej próbie sugeruje zależność od czasu ekspozycji i może świadczyć o tym, że faktyczny czynnik bakteriostatyczny lub bakteriobójczy jest generowany *in situ* (np. tworzenie wolnych rodników lub wymywanie związków chemicznych z pokrycia powierzchniowego). Próbka o oznaczeniu P1 nie wprowadzała istotnych zmian wartości OD₅₅₀ względem kontroli. Obecność próbki P2 w hodowli pałeczki okrężnicy powodowała wzrost, a w przypadku *B. subtilis* – spadek gęstości optycznej hodowli w porównaniu do próbki kontrolnej. Zdecydowanie najwyższą skutecznością, a tym samym najmniejszym wzrostem OD₅₅₀ w czasie inkubacji obu hodowli drobnoustrojów, wykazały się próbki P3 i P4, z wyraźną przewagą tej ostatniej. Hodowle, do których wprowadzono wspomniane materiały, wykazały jedynie nieznaczny wzrost OD₅₅₀ (w przypadku *B. subtilis* inkubowanego z P4 – spadek) po 24-godzinnej inkubacji, związany prawdopodobnie z częściową inaktywacją inokulum, znacznym spowolnieniem wzrostu i tempa podziałów komórek ocalałych oraz postępującą ich lizą. Wyniki analizy podatności badanych próbek membran na fouling biologiczny przedstawiono w formie diagramu (rys. 4).



Rys. 4. Pomiar gęstości optycznej podłoża hodowlanego po usunięciu biofilmu (w przeliczeniu na 1 cm² powierzchni membrany)

Wszystkie badane obiekty inkubowane w hodowlach *Escherichia coli* (w porównaniu do membran natywnych) charakteryzował spadek ilości zaadsorbowanych ko-

mórek w przeliczeniu na 1 cm² powierzchni. Potwierdzają to również testy płytkowe, określające liczbę jednostek, tworzących kolonie (tab. 1). Wyniki uzyskane w testach z wykorzystaniem *Bacillus subtilis* nie są tak jednoznaczne. Hodowle inkubowane z P2 i P3 wykazały wzrost OD550, podczas gdy obecność P1 i P4 wywołała znaczący spadek tego parametru względem membran kontrolnych. Zaobserwowane różnice gatunkowe wynikać mogą albo z niejednakowej toksyczności badanych próbek względem tych drobnoustrojów lub z różnic składu chemicznego EPS (cecha drobnoustroju), determinującej stabilność biofilmu na danym podłożu. Podkreśla to konieczność poszukiwania modyfikacji powierzchniowych o dużej efektywności przeciwdrobnoustrojowej i uniwersalnej skuteczności.

Tabela 1. Liczba jednostek tworzących kolonie w zawiesinach po usunięciu biofilmu

Liczba jednostek tworzących kolonie ($n \cdot 10^8$ w 1 cm ³ zawiesiny)									
<i>Escherichia coli</i>					<i>Bacillus subtilis</i>				
K	P1	P2	P3	P4	K	P1	P2	P3	P4
12,0	-	27,6	0,12	0,004	3,4	0,81	34,8	0,13	0,03

4. PODSUMOWANIE

Modyfikacja powierzchniowa membran filtracyjnych stanowi obiecującą drogę polepszania ich właściwości aplikacyjnych. Zmiany, obejmujące trwałe wprowadzenie biocydu na powierzchni membrany, są potencjalnie efektywnym sposobem redukcji populacji drobnoustrojów, a tym samym ograniczają zjawisko foulingu biologicznego. Miarodajny sposób testowania właściwości bakteriobójczych i bakteriostatycznych staje się zatem istotnym etapem selekcji i wdrażania nowych materiałów membranowych. Zaprezentowane wyniki potwierdzają, w tym zakresie, przydatność opracowanej metodyki.

Praca naukowa wykonana w ramach realizacji Programu Strategicznego pn. „Innowacyjne systemy wspomagania technicznego zrównoważonego rozwoju gospodarki” w Programie Operacyjnym Innowacyjna Gospodarka.

Składam serdeczne podziękowania mgr inż. Marcie Bojarskiej (Wydział Chemii Fizycznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej) za udostępnienie próbek modyfikowanych membran filtracyjnych, wykonanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

LITERATURA

- [1] BRYJAK M., GANCARZ I., SMOLIŃSKA K., *Plasma nanostructuring of porous polymer membranes*, Advances in Colloid and Interface Science, 2010, Volume 16, 2-9.

- [2] BRYJAK M., JANECKI T., GANCARZ I., SMOLIŃSKA K., *Plazmowa modyfikacja membran polimerowych*, Wykłady monograficzne i specjalistyczne, Toruń 2009, 64-79.
- [3] CHAN C.M., KO T.M., HIRAOKA H., *Polymer surface modification by plasmas and photons*, Surface Science Reports, 1996, Vol. 24, 1-54.
- [4] CZACZYK K., MYSZKA K., *Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne*, Biotechnologia, 2003, Vol. 76, Nr. 1, 40-52.
- [5] FLEMMING H. C., WINGENDER J., *The biofilm matrix*, Nature Reviews Microbiology, 2010, Vol. 8, 623-633.
- [6] JAWORSKI A., SERWECIŃSKA L., STĄCZEK P., *Quorum sensing – komunikowanie się komórek w populacjach bakterii przy udziale chemicznych cząstek sygnałowych.*, Postępy mikrobiologii, 2005, Vol. 2, 231-256.
- [7] LÓPEZ D., VLAMAKIS H., KOLTER R., *Biofilms*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010, Vol. 2(7), a000398.
- [8] SHUGMAN E.M., ALDRICH C., SANDERSON R.D., MCLACHLAN D.S. *Infrasonic backpulsed membrane cleaning of micro- and ultrafiltration membranes fouled with alumina and yeast*, Water SA, 2013, Vol. 39, no. 1, 9-16.
- [9] STRATHMANN H., GIORNO L., DRIOLI E., *An introduction to membrane science and technology*, CNR, Roma 2006.
- [10] WANG L.K., CHEN J.P., HUNG Y.T., SHAMMAS N.K., *Membrane and desalination technologies*, Handbook of environmental engineering, 2011, Vol. 13.

TESTING OF ANTI-BIOFOULING PROPERTIES OF SURFACE MODIFIED FILTRATION MEMBRANES

The essence of membrane technologies lies in separation of mixtures by selective concentration of compounds (including potentially present microorganisms) on one side of a membrane. Simultaneously, favorable conditions for membrane bio-fouling occur due to significance of the factor of microbial concentration. Commonly used techniques, such as cross-flow or back pulse, are sometimes insufficient when it comes to maintaining optimum process performance. Combining them with surface modification and functionalization of a membrane is considered to be potentially the most reasonable approach. In this paper the methodology of antimicrobial properties of surface-modified membranes is presented. Effectiveness of the modified membranes was determined against representative strains of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in static (on Petri dish) and dynamic conditions (batch culture). Additionally, changes in biofilm formation were estimated. The results presented confirm the aptitude of this methodology, simultaneously emphasizing the role of surface modification as a perspective direction in membrane development.