

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ХІТОЗАНУ НА ПОВЕРХНІ ТРЕКОВИХ ПОЛІЕТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТНИХ МЕМБРАН, АКТИВОВАНИХ ПЕРІОДАТОМ НАТРІЮ

*Розроблено методику іммобілізації хітозану на поверхні треккових поліетилентерефталатних мембран з попередньою обробкою їхньої поверхні водним розчином періодату натрію. Наявність прищепленого хітозану до поверхні мембран підтверджено ІЧ-спектроскопічними дослідженнями. Вимірювання крайових кутів змочування мембран водою свідчить про істотну гідрофілізацію їхньої поверхні. Внаслідок іммобілізації хітозану поверхня мембран набуває позитивного заряду, що підтверджено даними ξ -потенціометрії. Антибактеріальні властивості отриманих мембран було досліджено щодо грамнегативної бактерії *Escherichia coli* та грампозитивної бактерії *Staphylococcus aureus*.*

Вступ

Однією з головних перешкод для довготривалої експлуатації мембран є їхня схильність до біологічного забруднення та біодеструкції.

У процесі експлуатації мембран бактерії осідають на їхній поверхні там, де відбувається їх розмноження та утворення біологічної плівки [1, 2]. Це в подальшому призводить до руйнування поверхні мембрани, падіння проникності через блокування пор та спричинює вторинне забруднення очищеної води продуктами метаболізму. Тому для запобігання впливу біозабрудненню та біодеструкції на властивості мембран розробляють методи формування та модифікування мембран біоцидними реагентами різної хімічної будови [3, 4]. Значний інтерес для отримання мембран з антибактеріальними властивостями становить іммобілізація на їхній поверхні хітозану, який проявляє високу антибактеріальну активність стосовно більшості мікроорганізмів.

Останнім часом інтенсивно ведуться дослідження іммобілізації хітозану на полімерних та неорганічних поверхнях. Особливої актуальності набувають питання іммобілізації хітозану на поверхні полімерних мембран з метою її функціоналізації [5-7]. З цієї метою надзвичайно перспективними є треккові мембрани з поліетилентерефталату (ПЕТФ) [1, 2, 5, 6]. Серед основних недоліків ПЕТФ - його висока гідрофобність, низька змочуваність, відсутність реакційноздатних функціональних груп на поверхні [5, 6]. Для поліпшення цих характеристик може бути ефективно застосована низка фізико-хімічних методів активування поверхні ПЕТФ, у тому числі обробка плазмою [6, 8], радіаційне [9-11]

та УФ-опромінювання [12, 13] з наступною прищепленою полімеризацією функціональних полімерів. Однак ці методи потребують складного обладнання і є досить дорогими.

Одним зі способів іммобілізації бактерицидних речовин на мембранах є формування на їхній поверхні відповідних реакційноздатних груп, які є комплементарними до бактерицидних полімерів, а отже, легко утворюють з ними полімер-полімерні комплекси, що приводить до закріплення селективного шару з антибактеріального полімеру [14, 15]. Іммобілізація хітозану може ефективно відбуватися на поверхні, що містить групи кислотного характеру. З цієї метою може бути використаний зокрема періодат натрію. Полімераналогічні перетворення поверхні поліетилентерефталату внаслідок її обробки окисником NaIO_4 ведуть до появи на ній полярних карбоксильних груп, здатних до взаємодії з аміногрупами хітозану. Для запобігання впливу на перебіг реакції сторонніх факторів - домішки повітря, додаткове окиснення, а також для збереження відтворюваності результатів модифікування проводили в атмосфері аргону [16].

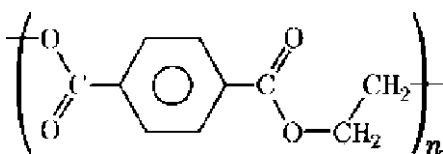
Модифікування гідрофобних мембран надає можливість, з одного боку, гідрофілізувати їхню поверхню (в т. ч. поверхню пор), а з іншого - надати мембранам специфічних роздільних характеристик за рахунок утворення на поверхні бактерицидних функціональних груп [5-7].

У зв'язку з вищесказаним метою цього дослідження було отримати гідрофільні заряджені мембрани з антибактеріальною активністю шляхом модифікування поліетилентерефталатних мембран хітозаном з попереднім активуванням їхньої поверхні періодатом натрію.

Матеріали та методи

Реактиви та матеріали. Мембрани

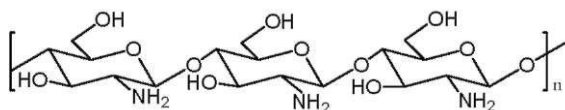
У роботі було використано трекові поліетилен-терефталатні (ПЕТФ) мембрани з діаметром пор 0,05 мкм (виробництво ОІЯД м. Дубна, Росія).



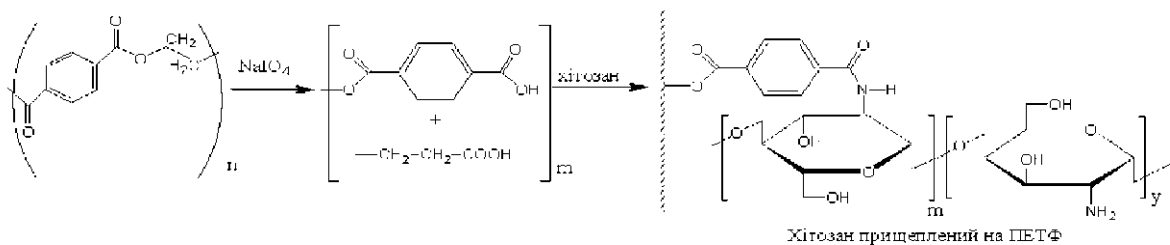
Речовини для модифікування

Періодат натрію NaIO_4 - білий порошок. Молекулярна маса 213,89; густина $d^{20} = 3860 \text{ кг/м}^3$, розчинний у воді (виробництва фірми Aldrich). Використовували без додаткового очищення.

Хітозан - полі-Р-(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамін з молекулярною масою 400 кДа (Fluka).



Імобілізацію хітозану на поверхню мембран проводили за такою методикою: відмиті етанолем мембрани витримували в 0,1 М розчині NaIO_4 при 60-90 °С протягом 0,5-3 годин в атмосфері аргону, після чого мембрани обробляли 2 % розчином хітозану в 2 % розчині оцтової кислоти при кімнатній температурі протягом 0,5-24 годин. Загальна схема іммобілізації хітозану має такий вигляд:



Вимірювання ξ -потенціалу поверхні мембран

Вимірювання поверхневого заряду мембран проводили на електрокінетичному аналізаторі (ЕКА, Anton Paar GmbH). Вимірювання ξ -потенціалу проводили стосовно розчину KCl концентрацією $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$.

Методика визначення бактерицидних властивостей мембран

Бактерицидну активність отриманих мембран визначали фільтруванням суспензії грамне-

гативної бактерії *Escherichia coli* HB 101 та грампозитивної бактерії *Staphylococcus aureus*.

Обладнання та розрахунки

Для визначення водопроникності мембран використовували стандартну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8200 (виробництво Millipore Corporation, США). Внутрішній об'єм комірки дорівнював $0,18 \text{ м}^3$, площа робочої поверхні мембрани - $2,64 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2$. Вимірювання водопроникності проводили при робочому тиску у комірці (0,1 МПа) та температурі $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ступінь прищеплення (СП, %) розраховували за формулою:

$$\text{СП} = (\text{M}_{\text{модиф.}} - \text{M}_0) / \text{M}_0 \cdot 100 \%,$$

де M_0 - маса вихідної мембрани; $\text{M}_{\text{модиф.}}$ - маса модифікованої мембрани.

Вимірювання крайових кутів змочування методом сидячої краплі

Оцінку гідрофільності поверхні мембран проводили шляхом вимірювання крайових кутів змочування поверхні мембрани бідистильованою водою методом сидячої краплі. Вимірювання здійснювали за допомогою цифрової фотокамери (Olympus C-765 Ultra Zoom), результати обробляли у програмі Adobe Photoshop 7.0. Значення контактних кутів змочування усереднювали вибіркою з 10 вимірювань; похибка вимірювання становила $\pm 3^\circ$.

гнативної бактерії *Escherichia coli* HB 101 та грампозитивної бактерії *Staphylococcus aureus* CCM 209 у фізіологічному розчині через досліджувану мембрану. Фільтрацію проводили в установці непроточного типу Amicon 8200 (виробництво Millipore Corporation, USA) з використанням термостатування і перемішування при робочому тиску 0,1 МПа та температурі 25°C . Культури вирощували на селективному середовищі Ендо (*Escherichia coli* HB 101) та МПА (*Staphylococcus aureus* CCM 209) («Serva») і вно-

сили в фізіологічний розчин у концентрації близько 10^6 клітин/мл. Після розведення до концентрації 10^3 клітин/л 100 мл суспензії фільтрували через досліджувану мембрану до сухого залишку. Контролем слугувала початкова немодифікована мембрана без додавання хітозану. Після фільтрації мембрану інкубували на щільному діагностично-диференційному середовищі Ендо (*Escherichia coli* HB 101) та МПА (*Staphylococcus aureus* ССМ 209) за температури 32°C протягом доби. Бактерицидну активність визначали за кількістю колонієутворювальних одиниць (КУО), що виросли на досліджуваній мембрані, та виражали у відсотках щодо кількості КУО, що виросли на поверхні початкової немодифікованої мембрани.

Інфрачервона спектроскопія (ІЧ-спектроскопія)

Дослідження поверхневих шарів зразків мембран проводили на спектрометрі TENSOR 37, BRUKER методом багаторазового порушеного повного відбиття (МБППВ).

Результати та обговорення

Для ефективної імобілізації хітозану інертну поверхню поліетилентерефталатних мембран потрібно активувати, тобто утворити на ній відповідні реакційноздатні групи, комплементарні до аміногруп хітозану, зокрема групи кислотного характеру [5, 7]. З цією метою нами було проведено обробку поверхні мембран розчином перйодату натрію.

Аналіз ІЧ-спектрів поверхні оброблених мембран свідчить про зростання інтенсивності валентних коливань зв'язку $\text{C}=\text{O}$ карбоксильної групи з довжиною хвилі $1713,34\text{ см}^{-1}$, що є наслідком збільшення концентрації цих груп при її обробці перйодатом натрію.

У результаті проведення імобілізації хітозану на активованих мембранах на ІЧ-спектрах поверхні мембрани з'являється смуга поглинання $3273,19\text{ см}^{-1}$, що відповідає валентним коливанням зв'язаної NH групи N-однозаміщених амідів, а смуги 2967 см^{-1} та 2905 см^{-1} (валентні асиметричні коливання CH_3 групи при бензольному кільці) збільшують свою інтенсивність. Порівняння ІЧ-спектрів поверхні мембрани з іммобілізованим хітозаном та вихідного хітозану показує, що відбувається зміщення смуги валентних коливань вільної аміногрупи при довжині хвилі $3436,47\text{ см}^{-1}$ на $3273,19\text{ см}^{-1}$, яка відповідає зв'язаній NH групі N-однозаміщених амідів і є наслідком хімічного прищеплення макромолекул хітозану до поверхні активованої ПЕТФ мембрани.

Одним із опосередкованих методів дослідження ступеня модифікування мембран є визначення ступеня прищеплення хітозану до їхньої поверхні. Він свідчить про відносну кількість полімеру, яка іммобілізувалася на попередньо активовану поверхню мембрани. Вплив умов попереднього активування розчином перйодату натрію на ступінь прищеплення хітозану представлено в табл. 1.

Таблиця 1. Вплив умов (τ , T°) активування ПЕТФ мембран розчином NaIO_4 на ступінь прищеплення (СП, %) хітозану (витримування в розчині хітозану 120 хв)

		СП хітозану, %			
τ , хв	$T, ^\circ\text{C}$	60°C	70°C	80°C	90°C
30		2,76	4,07	3,08	2,32
60		3,14	9,49	8,79	6,88
120		3,39	6,26	5,84	5,53
180		2,83	5,40	4,32	3,47

Дані таблиці свідчать, що імобілізація хітозану на поверхні активованих мембран відбувається найефективніше, якщо обробку розчином NaIO_4 проводити при 70°C протягом 60 хв. У цьому разі ступінь прищеплення хітозану є максимальним і становить 9,49 %. Зростання ступеня прищеплення зумовлене тим, що з підвищенням температури полегшується дифузія NaIO_4 до поверхні мембран та збільшується швидкість реакцій окиснення. Всі ці фактори сприяють збільшенню кількості активних реакційноздатних центрів на поверхні мембран. Такі ефекти посилюються завдяки наближенню температури окиснення до температури склування ПЕТФ, що провокує радикальні реакції з утворенням активних макрорадикалів. Поява максимуму на кривих залежності ступеня прищеплення від тривалості та температури обробки є результатом врівноваження двох процесів - адсорбції та десорбції хітозану на поверхні мембран. Підвищення температури і збільшення часу модифікування призводять до часткової деструкції мембрани і втрати маси зразка.

Водопроникність залежить від розміру та кількості наскрізних транспортних пор у мембрані, ступеня гідрофільності її поверхні та стеричних факторів. Визначення водопроникності при модифікуванні мембран є вкрай важливим методом дослідження, оскільки основні характеристики поверхні мембрани та її пор змінюються, впливаючи тим само на пропускну здатність, що є однією з найважливіших характеристик мембран. Прищеплення хітозану до поверхні ПЕТФ мембран призводить до зменшення їхньої водопроникності за рахунок часткового перекривання пор. У табл. 2 наведено дані щодо зміни величини водопроникності мембран після імобілізації хітозану на їхні поверхні.

Таблиця 2. Вплив умов (τ , T) активування ПЕТФ мембран розчином NaIO_4 на їх водопроникність (J_v) (витримування в розчині хітозану 120 хв)

Водопроникність, J_v , л/м ² *год				
τ , хв \ T , °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
30	70,41	56,92	53,42	80,42
60	72,93	41,07	42,35	76,37
120	61,27	47,02	48,70	80,85
180	69,38	45,13	51,24	96,49

Як видно з таблиці, найбільша зміна водопроникності модифікованих мембран спостерігається при максимальних величинах прищеплення хітозану, однак при цьому мембрана зберігає добрі експлуатаційні характеристики.

У табл. 3 наведено дані щодо зміни ступеня гідрофільності поверхні мембран після іммобілізації хітозану на їхні поверхні.

Таблиця 3. Вплив умов (τ , T) активування ПЕТФ мембран розчином NaIO_4 на гідрофільність їхньої поверхні (витримування в розчині хітозану 120 хв)

Кут змочування, °				
τ , хв \ T , °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
0	59,2°	59,2°	59,3°	59,1°
30	54,4°	49,5°	48,6°	48,2°
60	52,6°	43,5°	44,5°	43,7°
120	48,2°	43,3°	43,2°	43,5°
180	44,7°	43,4°	43,5°	43,4°

Як видно з таблиці, іммобілізація хітозану на поверхні поліетилентерефталатних мембран, попередньо окиснених NaIO_4 , приводить до підвищення їх гідрофільності, що виражається у зменшенні величини кута змочування поверхні водою. Зі збільшенням тривалості обробки мембран розчином NaIO_4 величина кута змочування мембран водою зменшується з 59,2° (немодифікована мембрана) до 43,5° при 60 хв обробки і залишається стабільною при збільшенні тривалості окиснення. Це зумовлено утворенням суцільного шару гідрофільного полімеру на поверхні мембран, тому подальша їх обробка розчином NaIO_4 не є доцільною.

З даних табл. 1-3 було обрано оптимальні умови іммобілізації хітозану на поверхні ПЕТФ мембран: температура 70 °C, 0,1 М розчин NaIO_4 , тривалість активування 1 година в атмосфері аргону.

Модифіковані при даних умовах ПЕТФ мембрани були використані для вивчення процесу іммобілізації хітозану. Відомо, що взаємодія речовин із протилежним зарядом на поверхні мембран приводить до суттєвих змін ξ -потенціалу поверхні, аж до її перезарядки. У зв'язку з цим вивчення змін ξ -потенціалу може свідчи-

ти про ефективність модифікування мембран хітозаном.

Результати вимірювання ξ -потенціалу поверхні модифікованих та немодифікованих мембран засвідчують, що при іммобілізації хітозану відбувається зміна електроповерхневих властивостей мембран (рис. 1).

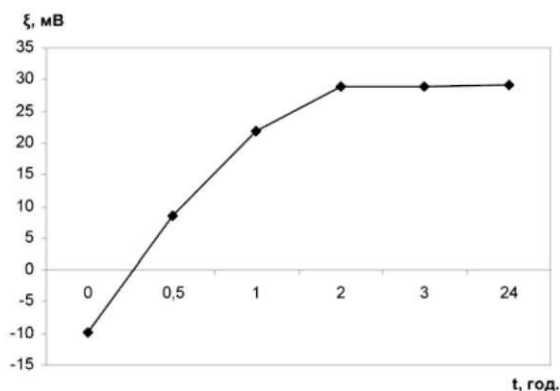


Рис. 1. ξ -потенціал поверхні мембран від тривалості іммобілізації хітозану

Поверхня немодифікованої трекової ПЕТФ мембрани має невеликий негативний ξ -потенціал. При окисненні мембранної поверхні NaIO_4 відбувається несуттєве зниження ξ -потенціалу мембрани з -10 до -12 мВ. Після іммобілізації хітозану протягом 30 хвилин відбувається перезарядка поверхні, і вона набуває позитивного заряду. Зі збільшенням тривалості модифікування поверхневий заряд із часом перестає змінюватися. Це є наслідком того, що кількість поверхневих груп при подальшій іммобілізації хітозану вже не збільшується.

Бактерицидну дію модифікованих мембран досліджували стосовно культури грамнегативної бактерії *Escherichia coli* HB 101.

Таблиця 4. Бактерицидність залежно від тривалості витримування в розчині хітозану

τ , год	0	0,5	1	1,5	2	3	24
Бактерицидність, %	0	23	52	83	100	100	100

Дослідження антибактеріальних властивостей модифікованих мембран свідчить, що при іммобілізації на них хітозану протягом 2 годин вони характеризуються 100 % бактерицидністю, яка залишається стабільною при збільшенні тривалості модифікування розчином хітозану (табл. 4). Таким чином, бактерицидні властивості мембран зростають зі збільшенням кількості хітозану, іммобілізованого на поверхні до 9,49 %, і виходять на плато при адсорбційному насиченні поверхневого шару.

При застосуванні мембран з бактерицидними властивостями велике значення надають не лише наявності антибактеріального ефекту в отриманих мембран, але й терміну, протягом якого цей ефект зберігається. Тривалість збереження антибактеріальних властивостей мембран, модифікованих хітозаном, представлено в табл. 5.

Таблиця 5. Тривалість збереження антибактеріальних властивостей мембран, модифікованих хітозаном

Тест-культура	Бактерицидність, %			
	Хітозан			Контроль
	1 доба	28 діб	56 діб	
E. coli	100	100	100	0
S. aureus	100	100	100	0

Бактерицидність мембран зберігається 56 діб, протягом яких на модифікованих хітозаном мембранах ріст тестових культур *Escherichia coli* HB 101 не спостерігався.

Висновки

Таким чином, у результаті виконаних експериментальних досліджень одержано заряджені поліетилентерефталатні мембрани з гідрофілізованою поверхнею, що проявляють антибактеріальні властивості, які залишаються стабільними тривалий час при відносно незмінній водонепроникності. Цей метод імобілізації може бути рекомендовано для запобігання забрудненню мембран у процесах водоочищення та фракціонування.

- Li J., Maekawa Y., Yamaki T., Yoshida M. Chemical Modification of a Polyethylene terephthalate Surface by the Selective Alkylation of Acid Action // *Macromol. Chem. Phys.* - 2002. - 203, No. 17. - P. 2470-2474.
- Launay A., Thomine F., Verdu J. Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate): a Kinetic Study // *Polymer Degradation and Stability.* - 1994. - 46. - P. 319-324.
- Huh M. W., Kang I.-K., Lee D. H., Kim W. S., Lee D. H., Park L. S., Min K. E., Seo K. H. Surface Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan-Grafted Polyethylene terephthalate Prepared by Plasma Glow Discharge // *Journal of Applied Polymer Science.* - 2001. - Vol. 81. - P. 2769-2778.
- Brine C. J., Sanford P. A., Zikakis J. P. (Ed.) An economical technique for producing chitosan. In *Advances in Chitin and Chitosan*, Alimuniar and Zainuddin // Elsevier Applied Science. - 1992.
- Zhang X., Bai R. Immobilization of Chitosan on Nylon 6,6 and PET Granules Through Hydrolysis Pretreatment // *Journal of Applied Polymer Science.* - 2003. - Vol. 90. - P. 3973-3979.
- Man Woo Huh, Inn-Kyu Kang, Du Hyun Lee, Woo Sik Kim, Dong Ho Lee, Lee Soon Park, Kyung Eun Min, Kwan Ho Seo. Surface Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan-Grafted Poly(ethylene terephthalate) Prepared by Plasma Glow Discharge // *Journal of Applied Polymer Science.* - 2001. - Vol. 81. - P. 2769-2778.
- Bratskaya S., Marinin D., Nitschke M., Pleul D., Schwarz S., Simon F. Polypropylene Surface Functionalization with Chitosan // *J. Adhesion Sci. Technol.* - 2004. - Vol. 18, No. 10. - P. 1173-1186.
- Zou X. P., Kang E. T., Neoh K. G. Plasma-induced graft polymerization of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate on poly(tetrafluoroethylene) films for reduction in protein adsorption // *Surface and Coatings Technology.* - 2002. - Vol. 149, No. 1. - P. 119-128.
- Bucio Emilio, Cedillo Gerardo. Radiation-induced grafting of functional acrylic monomers onto polyethylene and polypropylene films using acryloyl chloride // *Polymer Bulletin.* - 2001. - Vol. 46, No. 1. - P. 115-121.
- Shanko N. I., Kahanov V. Ya. The use of radiation-induced graft polymerization for modification of polymer track membranes // *Beam Interactions with Materials and Atoms.* - 1999. - Vol. 151, No. 2. - P. 416-422.
- Sidorova L. P., Aliev A. D. Modification of polyethylene by radiation-induced graft polymerization of acrylic acid // *Radiation Physics and Chemistry.* - 1986. - Vol. 28, No. 2. - P. 407-413.
- Yan W., Yang P., Wang Y. UV-radiation grafting of acrylamide onto cellulose acetate reverse osmosis membrane // *Shuichuli Jishu.* - 1988. - Vol. 14. - P. 213-222.
- Uchida Emiko, Ikada Yoshito. Topography of Polymer Chains Grafted on a Polymer Surface // *Macromolecules.* - 1997. - Vol. 30. - P. 5464-5469.
- Жданов Г. С., Китаева Н. К., Баннова Е. А., Миняйло Л. В. Основные подходы к модифицированию трековых мембран из полиетилентерефталата // *Критические технологии. Мембраны.* - 2004. - № 2 (22).
- Смирнова Н. Н., Федотов Ю. А. Полиэлектrolитные комплексы - материалы для разделительных мембран // *Крит. технол. Мембраны.* - 2001. - № 12. - С. 25-37.
- Sacak M., Celtik M. Hydrogen Peroxide Initiated Grafting of Acrylamide onto Poly(ethylene terephthalate) Fibers in Benzyl Alcohol // *Journal of Applied Polymer Science.* - 1996. - Vol. 59. - P. 1191-1194.

T. Murlanova, P. Vakuliuk, A. Burban

CHITOSAN IMMOBILIZATION ON THE SURFACE OF TRACK POLYETHYLENETEREPHTHALATE MEMBRANES ACTIVATED WITH SODIUM PERIODATE

A method for chitosan immobilization on the surface of track polyethyleneterephthalate membranes with preliminary treatment of their surface with water solution of sodium periodate is developed. Grafting of chitosan to the membrane surface is proved by IR-spectra. Measuring of membrane contact angles shows high level of their surface hydrophilisation. As a result of chitosan immobilization membrane charges positively, which is proved by ξ -potentiometry data. Antibacterial properties of produced membranes were investigated relatively to gram-negative bacterium *Escherichia Coli* and gram-positive bacterium *Staphylococcus Aureus*.