

5. Федеральный закон Российской Федерации №123-ФЗ «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности» - М.: 2008.- С. 103
6. Сафонов В.С., Олишария Г.Э., Швыряев А.А. Теория и практика анализа риска в газовой промышленности. М.: АОЗТ «Оолита», 1996.

Гидрофобизация внутриполостных поверхностей фотобиореакторов под длительное выращивание клеточной массы микроводорослей

д.т.н. проф. Бирюков В.В., Петрищева О.А., к.т.н. Мальцевская Н.В., Баранов Е.Р.,
Коваленко Н.В.

Университет машиностроения
birval@rambler.ru

Аннотация. Проведены эксперименты по культивированию микроводорослей *Chlorella sp.* и *Scenedesmus quadricauda* на колбах, которые показали, что для борьбы с обрастанием стеклянных поверхностей из коммерчески доступных гидрофобизирующих рецептур наиболее эффективно использование диметилдихлорсилана, в виде 5% раствора в изопропанол. Используемая процедура обработки емкостей достаточно проста и включает в себя кратковременное ополаскивание указанным препаратом и высушивание под вакуумом при температуре 100-110 °С.

Ключевые слова: фотобиосинтез, культивирование микроорганизмов, гидрофобизация, фотобиореакторы

Для поддержания высокой рентабельности промышленного фотобиосинтеза важно минимизировать издержки, связанные с адгезией клеток выращиваемой культуры на стеклянных поверхностях работающей аппаратуры. Адгезия клеток приводит к снижению освещенности внутриполостного пространства и ухудшению теплообменных характеристик процесса; может оказаться причиной недостаточно полного извлечения наработанного клеточного продукта из аппарата и сделать необходимой завершающую (скорее всего, достаточно трудоёмкую) очистку стеклянных поверхностей от образовавшихся биоорганических наслоений. В то же время не менее важно, чтобы предпринятая гидрофобизация аппаратуры не повредила проводимому культивированию – в частности, через попадание в культуральную среду нежелательных соединений.

В практике промышленной гидрофобизации широкое распространение получили кремнийорганические агенты, прежде всего – алкилсиланы. Обусловлено это тем, что молекулы последних, имея в центре четырёхвалентный кремний, через его пространственное окружение обладают двойственной природой – с одной стороны гидрофобной, в химическом же отношении при этом инертной, с другой стороны – гидрофильной, активной в химическом плане, способной при определенных условиях обеспечить жесткое – на грани хемосорбции – взаимодействие силанов с поверхностью стекла. Так, в случае метилхлорсиланов [1] активными элементами являются ковалентно связанные с кремнием атомы хлора, тогда как метильные остатки - в случае состоявшейся сцепки молекул силана с поверхностью стекла - работают уже как структурные элементы гидрофобного квази-покрытия. При этом, чем больше атомов хлора в молекуле алкилсилана, тем гидрофобное покрытие окажется более устойчивым [1]. В то же время, если все четыре заместителя являются именно органическими радикалами (как, скажем, в случае тетраметилсилана), принимается, что такой сугубо гидрофобный силан к жесткой адгезии именно к стеклу не способен.

Гидролиз метилхлорсиланов, заменяющий хлор в окружении кремния на гидроксил (частично или полностью), приводит к образованию алкилоксисиланов, активные группы которых способны работать в том числе по установлению водородных связей. К отечественным агентам подобного типа в частности относится антиадгезионная смазка К-21 [5].

Отдельный класс признанных гидрофобизаторов составляют полиалкилсилоксаны [1, 6] – полимерные структуры, в которых атомы кремния, несущие в каждом случае по два углеводородных радикала (как фактор гидрофобности) при этом связаны между собой через кислородные мостики. Именно последние, как принято считать [1], играют роль фактора гидрофильности – и, соответственно, множественного, в пределах одной молекулы, адгезионного фактора. К представителям данного класса соединений принадлежит, в частности, полидиметилсилоксан, известный под коммерческим названием «диметикон» [7].

Если же в полиалкилсилоксане один из двух углеводородных радикалов заменить на гидроксил, от соответствующего класса соединений – полиалкил-оксисилоксанов [1] – справедливо ожидать еще большей адгезионной способности – в том числе за счёт возможности образовывать водородные связи с поверхностью стекла. К числу отечественных агентов подобного типа относится препарат ГКЖ-94, поставляемый промышленностью в виде 50%-ой эмульсии.

Стоит отметить, что современные композиты на основе кремний-органических полимеров с целью усиления адгезионной способности могут дополняться ингредиентами каталитического действия. К таковым, в частности, относится средство, выпускаемое под коммерческим названием «антидождь».

Приоритетной задачей гидрофобизации является получение как можно более стойкого покрытия. В этой связи наряду с рассмотренным выше молекулярным аспектом существенную роль играет технология гидрофобизации – по сути же то, насколько полно заложенные в кремнийорганических агентах потенциальные возможности могут быть реализованы технически. Ознакомление с литературой убеждает, что какой либо стандартной методики не существует при том, что подготовка стеклянных поверхностей к гидрофобизации может предусматриваться весьма тщательной, а сами последующие воздействия – весьма жесткими. Так, в случае метил- и этил- хлорсиланов стекло предварительно тщательно обезжиривают и выдерживают в гигростате; сама же обработка состоит в погружении стекла в раствор гидрофобизатора (с использованием в качестве растворителей толуола, уайтспирита, керосина и т.п.), после чего гидрофобизированное изделие подвергается нагреву при температуре 150-180 °С в течение часа [1]. При использовании метилбутоксидиаминасилана ($\text{CH}_3\text{Si}(\text{NH}_2)_2\text{OC}_4\text{H}_9$) [13] обрабатываемое изделие также сначала тщательно обезжиривают, после чего выдерживают в 10%-ом растворе агента (с использованием в качестве растворителя CCl_4) в течение часа, далее подвергают воздушной сушке - также в течение часа - после чего выдерживают при температуре 120 °С еще три часа. Вместе с тем, напротив, гидрофобизация таким средством, как «антидождь» предусматривает процедуру вполне мягкую (нанесение средства на поверхность стекла с последующим лёгким втиранием и т.п.); надо думать, что высокая стойкость покрытия обеспечивается в данном случае эффектом каталитической добавки. Что же касается пределов термической и химической стойкости алкилсилановых покрытий, нанесённых по технологиям подобного рода, речь идёт о выдерживании температур порядка 300-400 °С в случае полисилоксановых плёнок [1] и способности разрушаться разве что крепкой щёлочью, а также крепкой минеральной либо плавиковой кислотой.

Задачей настоящего исследования является разработка низкочастотного и одновременно технологичного способа борьбы с загрязнениями внутрисполостных стенок фотобиореакторов – а именно, с отложениями микроводорослей, которые чаще всего имеют место в аппаратах данного типа при высоком накоплении биомассы в процессе культивирования промышленных штаммов-продуцентов.

С учётом изложенного, решение задачи видится на основе гидрофобизации аппаратов кремнийорганическими агентами и при этом предусматривается реализация в два этапа: на первом этапе в лабораторном исполнении (на колбах) опробуется по некоей стандартной – при этом достаточно простой - технологии ряд коммерчески доступных гидрофобизирующих агентов, тогда как на втором этапе оптимально проявивший себя агент (или агенты) проверяется аналогичным образом, но уже в условиях реально работающей аппаратуры.

В качестве критерия действенности каждого испытываемого гидрофобизатора предлагается к использованию наиболее естественный при такой целевой установке показатель – визуально наблюдаемая загрязненность стеклянных стенок биоорганическим материалом. В то же время в процессе культивирования важно было убедиться, с одной стороны, в том, что обработка стеклянной поверхности кремнийорганическими агентами сама по себе не влияет как-либо негативно на ход культивирования, с другой стороны, в том, что кремнийорганическая защита стеклянной поверхности в должной мере устойчива к абразивному воздействию со стороны перемешиваемой биомассы. В силу того и другого естественно было сопоставлять накопление биомассы в тестовых экспериментах с аналогичным показателем в контрольных опытах.

Экспериментальная часть. Материалы и методы

Подготовку колб, и позже фотобиореактора, к гидрофобизации проводили, сначала тщательно вымыв их и ополоснув их дистиллированной водой. Затем ёмкости подвергли стерилизации в лабораторном автоклаве ВК-75, при температуре 121 °С в течение 1 часа затем колбы высушили. В случае контрольных опытов соответствующие рабочие ёмкости также были вымыты и далее простерилизованы - с той, однако, разницей, что какая-либо дополнительная их обработка не проводилась.

Последующая гидрофобизация осуществлялась так: внутренние стенки каждой отдельной колбы объёмом 250 мл и, соответственно, внутренняя поверхность фотобиореактора «сэндвичного» типа тщательно (повторяющимися круговыми движениями), в течение 3-5 минут, ополаскивались тестируемым гидрофобизатором, после чего ёмкости высушивались под вакуумом при температуре 100 – 110 °С в течение 1 часа; завершающим действием являлось досушивание колб и, соответственно, фотобиореактора в течение 3 суток – однако уже при комнатной температуре.

В качестве гидрофобизаторов были использованы следующие агенты:

1. гидрофобизатор отсутствует (контрольный опыт);
2. диметикон (альфа-(Триметилсилил)-омега-метил-поли [окси(диметилсилилен)]) в виде 10% эмульсии в изопропанол, приготовленной по рецептуре согласно коду CAS 9006-65-9 с вязкостью 350 сп;
3. аналогичный агент, но с вязкостью 100 сп;
4. средство «Антидождь» фирмы «SAPFIRE Professional» (ТУ 2384-012-53928498-2010);
5. «Очиститель-антизапотеватель» фирмы «SAPFIRE Professional» (ТУ: 2384-005-53928498-2010);
6. гидрофобная жидкость 136-41 в виде 10% эмульсии в изопропанол (ГОСТ 10834-76 с изменениями 1-3);
7. гидрофобная жидкость 136-157М в виде 10% эмульсии в изопропанол (ТУ У 24.6-23849235-086-2001);
8. антиадгезионная смазка К-21 в виде 50% раствора в изопропанол (ТУ 6-02-909-79 с изменениями 1-6);
9. 5% раствор диметилдихлорсилана в изопропанол (ГОСТ 16485-87).

На этапе культивирования в колбах вышеперечисленные 9 вариантов были реализованы в процессах выращивания микроводорослей двух видов – *Chlorella* sp. и *Scenedesmus quadricauda*, в каждом случае в двух повторностях. Каждый из этих опытов проводился в

стерильном исполнении – соответственно, со стерильным отбором проб через определённые промежутки времени. При этом культивирование *Chlorella* sp. и *Scenedesmus quadricauda* осуществлялось на питательных средах Тамия [3] и Прата [4], соответственно, при том, что объём исходной среды с посевным материалом в колбах каждый раз составлял 100 мл.

Контроль проводимого эксперимента осуществлялся сначала по завершении гидрофобизации (оценочные критерии – результаты визуального осмотра покрытия, уровень pH промывочной воды) и далее уже в процессе собственно культивирования. При этом фиксировались pH среды (на предмет возможного закисления в связи с лизисом культуры) и её оптическая плотность (ОП) – как показатель накопления биомассы. В последнем случае проба разбавлялась в 1-4 раза в зависимости от ОП и далее фотометрировалась при длине волны 660 нм в кювете с длиной оптического пути 0,5 см. Параллельно проводилось прямое определение сухих веществ (СВ), для чего аликвота среды в объеме 10 мл высушивалась при 105 °С до постоянного веса, сухой же остаток М2 (найденный вес за вычетом пустой тары), при этом определялся с точностью до четвёртого знака – с вычислением требуемого показателя по формуле $СВ = М2 / М1 \times 100\%$. Наконец, осуществлялся и визуальный контроль внутренней поверхности стеклянной поверхности (устанавливалось наличие ободка сверху и отложений снизу), о чём уже говорилось выше.

Результаты и обсуждение. Визуальный и аналитический контроль гидрофобизации.

Из восьми вариантов обработки колб во всех случаях образовалась прозрачная кремнийорганическая плёнка, кроме следующих двух: в случае «Антидождя» №4 сформированная плёнка оказалась мутной, а в случае очистителя-антизапотевателя №5 не образовалась вообще. Стерильная дистиллированная вода, налитая в колбы не смачивала стенки, кроме варианта №5, pH водного смыва с обработанных колб в пределах от 5,7 до 6,7, за исключением варианта №4 (pH 2,2).

Таблица 1.

Данные аналитико-визуального контроля колбочных опытов в случае культивирования *Chlorella* sp.

№№ варианта	ОП	СВ %	Заращение стекла биомассой
1	1,185	1,01	Ободок имеется
2	1,095	1,02	Обрастания не выявлено
3	1,41	1,05	Обрастания не выявлено
4	1,32	0,97	Ободок имеется
5	1,2	0,95	Ободок имеется
6	1,5	1,04	Имеется ободок и нарост на дне
7	0,87	1,14	Имеется средний ободок и нарост на дне
8	1,5	1,06	Имеется слабый ободок и нарост на дне
9	1,44	1,05	Обрастания не выявлено

Этап культивирования на колбах. Данные аналитико-визуального контроля по завершении проведенных процессов (по истечении девяти суток культивирования) – приведены ниже в таблицах 1 и 2.

Рассматривая в качестве приоритета именно данные визуального контроля (последний столбец каждой таблицы), можно с достаточной уверенностью утверждать, что вариант гидрофобизации метилхлорсиланом выгодно отличается от всех других вариантов – прежде всего ввиду того, что артефакты загрязнения стеклянной поверхности в этом случае полностью отсутствуют. При этом не обнаружено также и каких-либо признаков (низких значений ОП и СВ), указывающих на замедление роста биомассы. И то и другое в совокупности, согласно

сделанному нами выводу, сделало данный агент безальтернативным претендентом на дальнейшее использование в эксперименте – то есть, уже на этапе культивирования обеих культур непосредственно в фотобиореакторе. При этом предлагаемая нами процедура обработки внутриволостных поверхностей аппаратов предусматривает кратковременное ополаскивание 5% раствором данного агента в изопропанолем с последующей термической обработкой и далее полным высушиванием. Установлено, что поставленная таким образом защита предотвращает загрязнение стеклянных стенок аппаратуры в течение всего многодневного (по меньшей мере, в пределах 9 суток) культивирования и не оказывает при этом какого-либо негативного влияния на процесс.

Таблица 2.

Данные аналитико-визуального контроля колбочных опытов в случае культивирования *Scenedesmus quadricauda*

№№ варианта	ОП	СВ %	Заращение стекла биомассой
1	0,57	0,086	Ободок имеется
2	0,61	0,126	Имеется средний ободок и нарост на дне
3	0,61	0,155	Имеется средний ободок и нарост на дне
4	0,59	0,072	Имеется слабый нарост на дне
5	0,6	0,072	Ободок имеется, культура не гомогенна, биомасса в виде хлопьев
6	0,4	0,085	Ободок имеется, культура не гомогенна, биомасса в виде хлопьев
7	0,41	0,13	Ободок имеется, культура не гомогенна, биомасса в виде хлопьев
8	0,62	0,387	Ободок имеется, культура не гомогенна, биомасса в виде хлопьев
9	0,65	0,109	Обрастания не выявлено

Работа выполнена в рамках выполнения государственного контракта №14.512.11.0095 по теме «Разработка научно-технических основ технологии и аппаратуры для культивирования фототрофных микроорганизмов с целью получения моторного биотоплива из газовых выбросов тепловых электростанций».

Литература

- Алентьев А.А., Клетченков И.И., Пашенко А.А. Кремнийорганические гидрофобизаторы /Государственное издательство технической литературы УССР Киев, 1962 г.
- Справочник химика т.2, Л.- М.: Химия, 1964
- Сальникова М.Я. Хлорелла – новый вид корма. Монография. - М.: Колос, 1977. - 96 с.
- Патент Ru 2164940, 2001
- Описание продукта. http://www.chemproduct.ru/catalogue/lubricant_k-21.shtml
- Воронков М.Г., Милешкевич В.П., Южелевский Ю.А.. Силоксановая связь, Новосибир., 1976;
- Самуйлова Л., Пучкова Т., Косметическая химия. Часть I. Ингредиенты. Толковый словарь по косметике и парфюмерии. Том II. –М.:Школа косметических химиков», 2005