

# Immobilisatie: Waarom hechten micro-organismen?

Voordracht gehouden tijdens het NVA-NBV-symposium 'Immobilisatie en afvalwaterbehandeling' op 2 april 1987 te Rotterdam.

## Inleiding

Bij continu verlopende biotechnologische processen is één van de problemen bacteriën in de reactor vast te houden. Een mogelijke oplossing voor dit probleem is de adhesie van cellen op een dragermateriaal of de aggregatie van cellen in vlokken of korrels. Immobilisatie is een natuurlijk proces. Met uitzondering van de open oceanen zijn micro-organismen in de natuur veelal verbonden met een vaste fase. Deze kan bestaan uit kunstmatige deeltjes, uit zand of andere bodemdeeltjes, uit andere micro-organismen, of uit hogere



M. C. M. VAN LOOSDRECHT  
Vakgroep Microbiologie,  
Landbouwniversiteit Wageningen



A. J. B. ZEHNDER  
Vakgroep Microbiologie,  
Landbouwniversiteit Wageningen

organismen en resten ervan (bijvoorbeeld schelpen, skeletten, onderdelen van planten, enz.). In verband met de hechting van micro-organismen zijn eigenlijk twee vragen van belang:

1. Welke voordelen brengt het gehecht zijn?
2. Hoe hechten micro-organismen?

## Voordelen van het hechten

De voordelen kunnen in vier groepen worden samengevat:

– *Organismen hechten om een optimale plaats in het milieu niet te verliezen.*

Voorbeelden zijn: bacteriën op stenen van oxydatiebedden, bacteriën die een korrelig slib vormen, bacteriën die zich aan het darmepiteel vasthouden, algen die op stenen groeien, enz. Het gemeenschappelijke aspect van al deze voorbeelden is dat het hechten de micro-organismen beschermt tegen uit- of wegspoelen.

– *Organismen hechten om zich tegen predatoren te beschermen.* Het best onderzochte systeem is actief slib.

Vrijzwemmende bacteriën zijn een gemakkelijke prooi voor ciliaten in het actief-slib systeem, de bacteriën in een vlok daarentegen zijn voor predatoren moeilijk te bereiken. Ook in de bodem worden bacteriën tegen protozoën beschermd door hechting aan deeltjes.

– *Organismen hechten om het substraat beter te kunnen gebruiken.* Micro-organismen hechten zich aan cellulose of lignocellulose deeltjes om de afbraakprodukten van hun exo-enzymen efficiënter te kunnen opnemen. Ook het koloniseren van planten-

wortels door bacteriën (gebruik van uitscheidingsprodukten van de plant) hoort hierbij.

– *Organismen hechten om fysiologische voordelen te verwerven.* Over dit punt bestaan een aantal theorieën [Ellwood 1982, Fletcher 1982, Heukelekian 1940] maar proeven die deze theorieën duidelijk bevestigen zijn ons niet bekend. Eén van de argumenten voor het bestaan van een voordeel is dat zich aan grensvlakken substraat ophoopt (dus ook aan deeltjes) en organismen daar dus hogere substraat-concentraties aantreffen. Afhankelijk van de aard van het grensvlak kunnen organische moleculen zich erop concentreren. Om thermodynamische redenen is de chemische potentiaal van deze geadsorbeerde moleculen ondanks hun hogere concentratie gelijk aan hun chemische potentiaal in de waterfase. De vrijkomende energie bij biologische omzettingen is niet afhankelijk van de concentratie van een stof maar van de chemische potentiaal. Energetisch gezien is het daarom moeilijk aan te geven welk profijt een micro-organisme van geadsorbeerd materiaal zou hebben.

## Mechanismen van het hechten

De kolonisatie van een water-vast grensvlak gebeurt in drie opeenvolgende stappen [Marshall, 1976]: (1) initiële adsorptie die puur fysisch-chemisch van aard is; dit is in het algemeen een omkeerbaar proces; (2) permanente hechting door middel van polymeren die als bruggen functioneren tussen cel-oppervlak en het organisch of anorganisch deeltje; (3) vermenigvuldiging en vorming van micro-colonies.

Omdat de initiële adsorptie beslissend is en in feite immobilisatie mogelijk maakt, willen wij ons in het tweede deel op dit punt concentreren. De initiële adsorptie kan fundamenteel benaderd worden via kolloïdchemische theorieën. Een bacteriesuspensie kan worden beschouwd als een levend kolloïdaal systeem. De DLVO-theorie voor de kolloïdale stabiliteit beschrijft de verandering in vrije energie van een deeltje als functie van de afstand tot een oppervlak of ander deeltje. De totale interactie-energie tussen een deeltje en een oppervlak bestaat uit een sommatie van elektrostatische en van-der-Waals-interacties. Deze laatste worden veroorzaakt door attractieve, intermoleculaire wisselwerkingen. De Hamakerconstante bepaalt de grootte van deze wisselwerking. Deze constante is experimenteel echter moeilijk te bepalen. Enig inzicht kan worden verkregen door het meten van de randhoek die een druppel water maakt met een oppervlak (of een laag bacteriën) [van Loosdrecht 1987a]. Indien de randhoek klein is (bijvoorbeeld bij glas) zijn de interacties in het grensvlak groot. Dit betekent

dat de Hamakerconstante (en dus de van-der-Waals-interactie) relatief klein is. Indien de randhoek groot is (bijvoorbeeld plastic) is de van-der-Waals-interactie ook relatief groot.

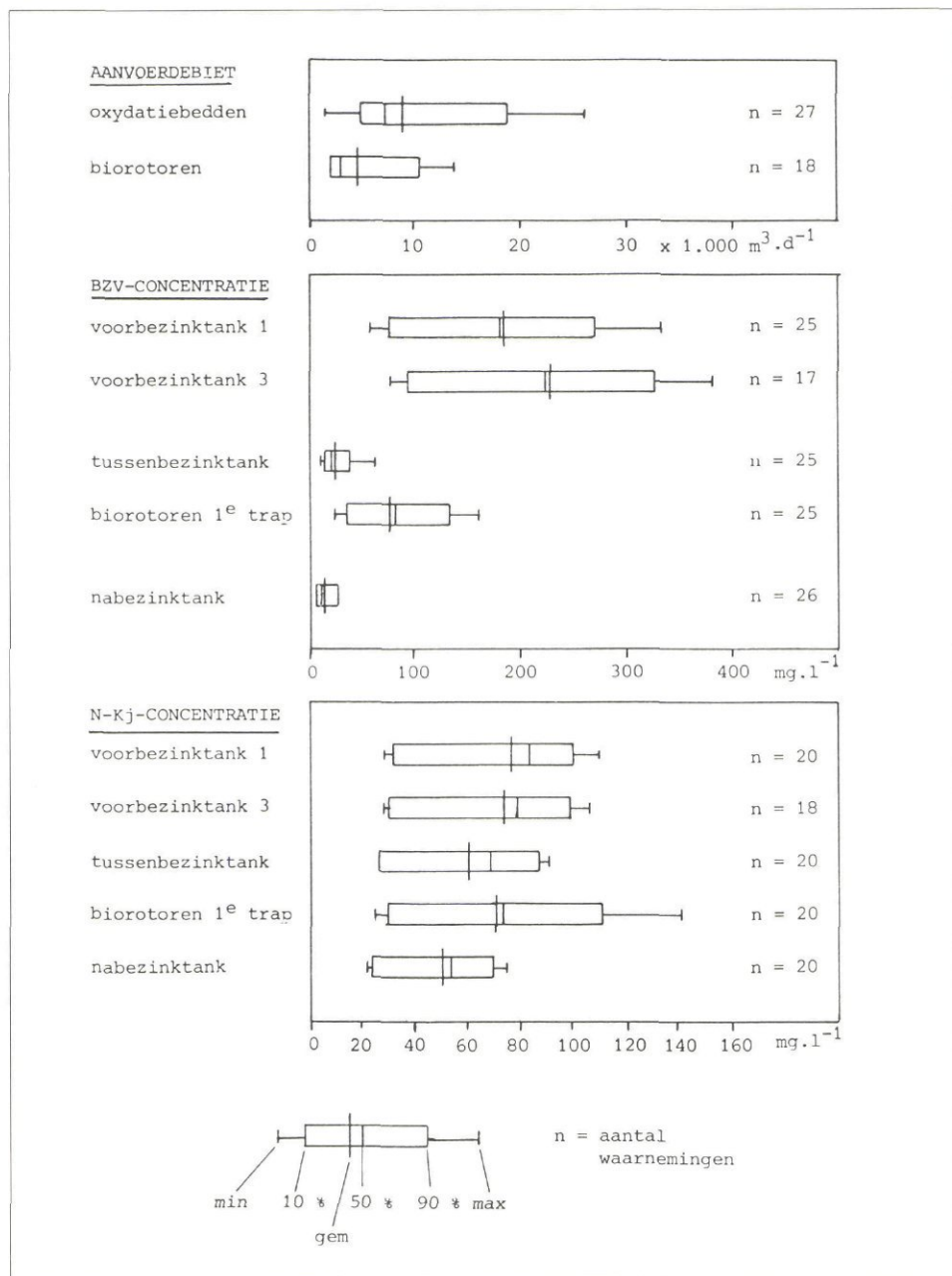
De elektrostatische interactie wordt veroorzaakt doordat deeltjes en oppervlak geladen zijn (ten gevolge van gedissocieerde groepen). Bacteriën en de meeste natuurlijke oppervlakken zijn negatief geladen, hetgeen een elektrostatische repulsie veroorzaakt. Behalve de oppervlaktepotentiaal zijn de ionsterkte en de valentie van de tegenionen van belang voor de mate van repulsie. Een hoge ionsterkte schermt de oppervlaktelading af, waardoor de repulsie dus vermindert. Meerwaardige ionen hebben een vergelijkbaar maar veel groter effect (100 mM Na<sup>+</sup> is vergelijkbaar met 1 mM Ca<sup>++</sup>). Een maat voor de potentiaal van een deeltje is de mobiliteit in een elektrisch veld (elektroforetische mobiliteit) [van Loosdrecht 1987b]. Voor een uitgebreide verhandeling over de DLVO-theorie in relatie tot de bacteriële adhesie kan een artikel van Rutter [1984] geraadpleegd worden.

Experimenten, waarbij de adhesie van verschillende bacteriën aan negatief geladen polystyreen is bepaald, tonen aan dat zowel de celpotentiaal als de celhydrofobiciteit van invloed zijn op de adhesie. Hydrofiele sterk geladen cellen vertonen de geringste adhesie. Tevens blijkt dat het effect van de celpotentiaal afneemt naarmate de cellen hydrofober worden [van Loosdrecht 1987a,b].

De adhesiesterkte kan bepaald worden uit de adhesie-isotherm. Omdat de adhesie reversibel blijkt te verlopen kan de isotherm met behulp van de Langmuir-vergelijking worden geanalyseerd. Hieruit volgt een adhesie-energie van 2-3 kT, voor diverse bacteriën. Berekeningen volgens de DLVO-theorie geven ook een dergelijke lage adhesie-energie. Dat deze energie niet groot is heeft consequenties voor adhesie in systemen met vloeistofstroming. De energie nodig voor desorptie is relatief klein. Bij het optreden van afschuifkrachten langs het oppervlak, kunnen deze krachten verantwoordelijk zijn voor het wegspoelen van bacteriën. Op basis hiervan lijkt het verstandig om bij het zoeken naar geschikte dragermaterialen voor bioreactoren behalve de fysische oppervlakte-eigenschappen ook de oppervlakteruwheid in beschouwing te nemen.

Bij een benadering van bacteriële adhesie volgens de DLVO-theorie is het effect van diverse stoffen op de adhesie goed te verklaren. Toevoeging van meerwaardige ionen als Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> of Al<sup>+++</sup> vermindert de elektrostatische repulsie en bevordert dus

● Slot op pagina 387



Afb. 5 - Overzicht meetresultaten eerste en tweede trap van de rwzi Bostel.

benadrukt, dat met betrekking tot stikstof-omzetting de verhouding tussen N- en BZV-gehalte van belang is: toepassing van de in eerder onderzoek gevonden relatie wordt begrensd door de maximaal mogelijke omzetting, die bepaald wordt door deze verhouding. Hoewel deze beperking in het voornoemde artikel in een van de afbeeldingen is aangegeven, is het goed de samenhang van deze relatie met de randvoorwaarden aan te geven. Om de prestaties met betrekking tot de tweede trap te verbeteren, wordt gedacht aan maatregelen om de verwijdering in de eerste trap biorotoren op te voeren. Hierbij wordt thans gedacht aan ijzerdosering in de voorbezinktank voor de eerste biorotortrap. Hierdoor wordt sulfide gebonden en afge-

scheiden, waardoor groei van *Beggiatoa* wordt verminderd. Tevens wordt via uitvlokking de BZV-verwijdering in de voorbezinktank verhoogd. Dit resulteert in lagere belasting op de biorotoren, hogere verwijdering en daarmee lagere BZV-concentraties, voor de tweede trap.

### Samenvatting

De biorotor is een voorbeeld van toepassing van geïmmobiliseerde micro-organismen bij de afvalwaterreiniging. Uitvoering vindt plaats bij kleinschalige toepassing voor enkele tientallen inwonerequivalenten tot grootschalige toepassing voor tienduizenden inwonerequivalenten. De praktijkresultaten bij kleinschalige toepassing zijn, bij juiste dimensionering, naar verwachting. Problemen

van ernstige aard treden niet op.

De biorotoren in Bostel functioneren niet optimaal. Mechanische storingen zijn opgetreden en nog niet volledig onder controle. De begroeiing van de eerste trap toont aan, dat het afvalwater sulfide bevat, waardoor *Beggiatoa*-ontwikkeling kan plaatsvinden. Dit beïnvloedt de prestaties. De tweede trap nitrificeert onvoldoende, waarschijnlijk doordat de stikstof/BZV-verhouding te laag is in de afloop van de eerste trap. Voor verbetering van deze situatie wordt gedacht aan ijzerdosering op de voorbezinktank, waardoor hogere BZV-verwijdering en sulfide-neerslag wordt verkregen.

### Literatuur

1. Harremoës, P. (1978). *Biofilm kinetics*. Water Pollution Microbiology, Vol. 2, Wiley Intersc.
2. Harremoës, P. (1983). *The application of biofilm kinetics to RBC*. Proc. RBC-Seminar, oktober 1983 in Fellbach, Germany, EWPCA.
3. Wijlhuizen, E. et al (1983). *Globale ontwerpgrondslagen van biorotoren voor rwzi's*. H<sub>2</sub>O (16) 1983, p. 470-473.
4. Wouda, T. W. M. (1982). *Stikstofverwijdering met biorotoren*. H<sub>2</sub>O (15) 1982, p. 595-600.

### Waarom hechten micro-organismen?

- *Vervolg van pagina 374*

de hechting of vlokking. Pyrofosfaat, EDTA en andere chelaatvormers nemen deze ionen juist weg en veroorzaken het in suspensie gaan van cellen. Stoffen als zeep en dergelijke maken een oppervlak hydrofieler hetgeen eveneens in een verminderde adhesie resulteert.

Zolang onze kennis met betrekking tot het regulatiemechanisme van de permanente hechting in belangrijke mate gebaseerd is op empirische gegevens (die hier niet besproken zijn), blijft de kolloïd/chemische benadering van de bacteriële adhesie het enige instrument voor de kwantitatieve voorspelling van het immobilisatiegedrag van bepaalde micro-organismen.

### Literatuur

- Ellwood, D. C., Keevil, C. W., Marsh, P. D., Brown, C. M. and Wardell, J. N. (1982). *Surface-associated growth*. Phil. Trans. R. Soc. London B. 297: 517-532.
- Fletcher, M. and Marshall, K. C. (1982). *Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria?* Adv. in Microbial Ecology 6: 199-230.
- Heukelekian, H. and Heller, A. (1940). *Relation between food concentration and surface for bacterial growth*. J. Bact. 40: 547-558.
- Loosdrecht, M. C. M. van, Lijklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. (1987a). *The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion*. Appl. Env. Microb. Submitted.
- Loosdrecht, M. C. M. van, Lijklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. (1987b). *Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion*. Appl. Env. Microb. Submitted.
- Marshall, K. C. (1976). *Interfaces in Microbial Ecology*. Harvard UP.
- Rutter, P. R. and Vincent, B. (1984). *Physicochemical interactions of the substratum, micro-organisms, and the fluid phase*. In: Microbial adhesion and aggregation pp 21-38. ed.: K. C. Marshall. Springer Verlag Berlin.