

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

Samenvatting

Insluiting of hechting van microbiële cellen in of aan vaste deeltjes is een techniek op het gebied van de biotechnologie die de laatste jaren snel ontwikkeld is. Deze zogenaamde immobilisatie van cellen heeft als belangrijkste voordeel dat continu gebruik in een bioreactor mogelijk is, ook onder uitspoelcondities wat betreft vrij gesuspendeerde cellen, terwijl een hoge celdichtheid kan worden gehandhaafd. Diverse procedures voor immobilisatie van cellen worden in dit artikel beschreven en op hun merites beoordeeld.



PROF. DR. IR. J. TRAMPER
Landbouwwuniversiteit Wageningen
Sectie Proceskunde

Geïmmobiliseerde cellen worden bestudeerd en gebruikt met het oog op vele verschillende toepassingen, waarbij behandeling van verontreinigd water één van de meest belangrijke is. Hierbij gaat het tot nu veelal om slecht gedefinieerde microbiële systemen van gemengde cultures die in een laag op vaste deeltjesoppervlakken groeien en toepassing vinden in gepakte of fluïde bedden, de zogenaamde biofilmreactoren. Echter, de laatste tijd krijgen ook in gels ingesloten reïncultures de nodige aandacht in dit verband. Met name hierop wordt in dit artikel de nadruk gelegd. Nitrificatie- en denitrificatieprocessen met geïmmobiliseerde cellen vormen hierbij de hoofdmoot.

Inleiding

Immobilisatie van micro-organismen kan gedefinieerd worden als het zodanig beperken van de bewegingsvrijheid van de microbiële cellen dat deze gemakkelijk in een bioreactor gehouden kunnen worden, zelfs wanneer de omstandigheden dusdanig zijn dat vrij gesuspendeerde cellen uit zouden spoelen. Veel van de huidige cel-immobilisatie technieken zijn ontwikkeld voor de immobilisatie van enzymen. Indeling van de grote verscheidenheid aan methoden in klassen zoals dat bij de enzym-immobilisatieprocedures is gedaan, ligt daarom voor de hand. Afb. 1 geeft deze indeling schematisch weer. In de eerste categorie berust de immobilisatie op hechting van de cellen aan het (inwendige) oppervlak van een (poreus) vast deeltje, waarbij hydrofobe, ionogene en zelfs chemische bindingen een rol kunnen spelen. De tweede hoofdklasse is 'cross-linken' van de cellen tot aggregaten of vlokvormige deeltjes. In de derde categorie worden de cellen ingesloten in het netwerk van een polymeer gel, in een microcapsule of in een holle vezel. Cruciaal bij elke

immobilisatieprocedure is dat de cellen hun gewenste functie blijven behouden en dat een mechanisch, chemisch en biologisch voldoende stabiel systeem wordt verkregen. Een uitgebreid overzicht van de cel-immobilisatietechnieken is recent gegeven door Klein en Vorlop [1].

Hechting

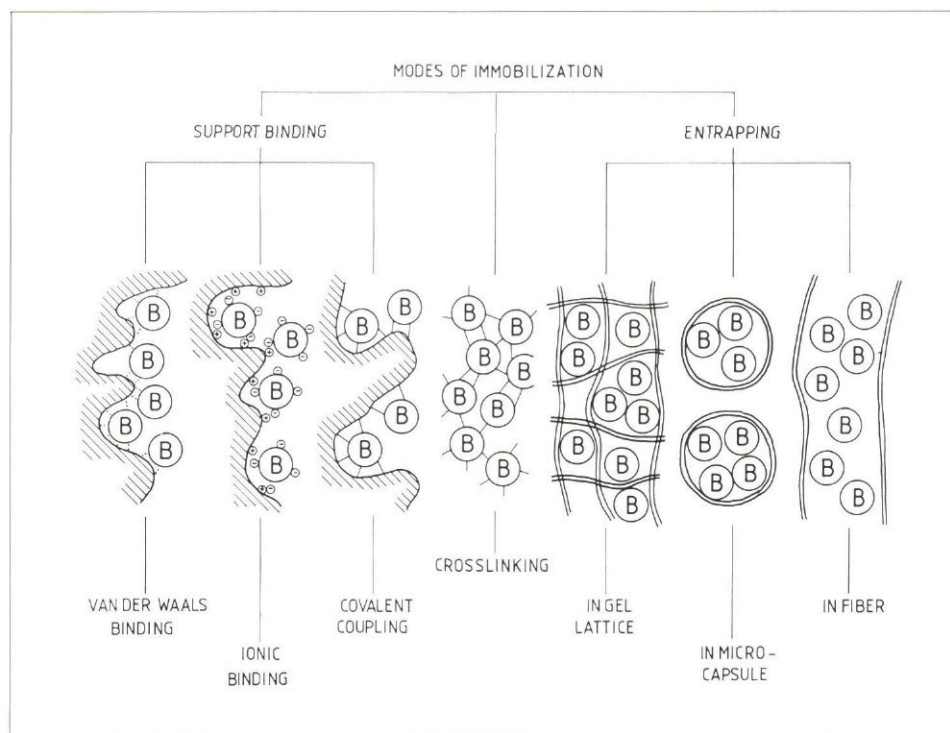
Sommige micro-organismen hebben een natuurlijke neiging zich te hechten aan oppervlakken, denk bijvoorbeeld aan tandplak, en immobiliseren zich op deze manier zelf. De productie van azijn met behulp van een trickling-bed bestaande uit beukekrullen waaraan azijnzuurbacteriën als een biologische film zijn gehecht, is het klassieke voorbeeld van dankbaar industrieel gebruik van deze eigenschap. Een dergelijke hechting, die soms ook geïnduceerd kan worden, kan de basis zijn voor een goedkope maar effectieve immobilisatietechniek, waarvan tot nu toe met name in de waterzuivering gebruik wordt gemaakt in de biofilmreactoren. Sommige micro-organismen hechten zich normaal gesproken niet aan oppervlakken, maar deze kunnen daartoe soms worden aangezet door de fysische of chemische eigenschappen van de cellen of het oppervlak te veranderen, door ionogene aantrekkingskrachten of zelfs door chemische bindingen te introduceren. Het mechanisme van hechting is nog lang niet volledig opgehelderd, maar de gedachte is dat sommige soorten micro-organismen macromoleculen uitscheiden zoals poly-

mucosacchariden die als een soort lijm fungeren en de cel/oppervlakinteracties initiëren. Er zijn ook micro-organismen die op zichzelf niet goed hechten aan oppervlakken, maar die dat wel doen in een gemengde cultuur door de symbiotische werking van andere goed hechtende cellen. Dit verschijnsel is geconstateerd in waterzuiveringsinstallaties die gebruik maken van biofilms bestaande uit gemengde cultures.

Immobilisatie van cellen door hechting aan oppervlakken is in veel gevallen een goedkope en effectieve methode, waar al tamelijk veel praktijkervaring mee is opgedaan. Het nadeel van deze methode is dat er relatief veel tijd nodig is voor het ontwikkelen van de biofilm en dat het een slecht gedefinieerd, nog steeds slecht begrepen en beschreven, gevoelig systeem betreft, waarbij uitspoeling van biomassa aanzienlijk kan zijn.

Er zijn verder ook vaste deeltjes die zulke grote poriën hebben dat cellen gemakkelijk kunnen binnengroeien en deze poriën 'bevolken'. Wanneer de poriën ook weer niet al te groot zijn kan op deze wijze een stabiel biokatalysatorsysteem verkregen worden. Katoenen of nylon structuren, metalen sponsjes en diverse soorten schuim en spons komen daarvoor in aanmerking. Sponsjes zijn op beperkte schaal met wisselend succes in de waterzuivering toegepast. Uitbreiding van het aantal toepassingen in de milieuhygiëne lijkt echter vooralsnog in het verschiet te liggen.

Afb. 1 - Indeling immobilisatie technieken.



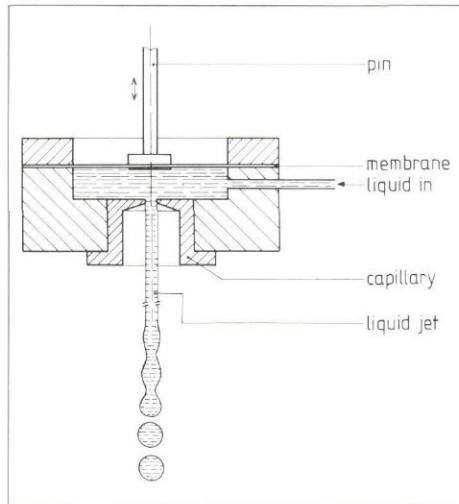
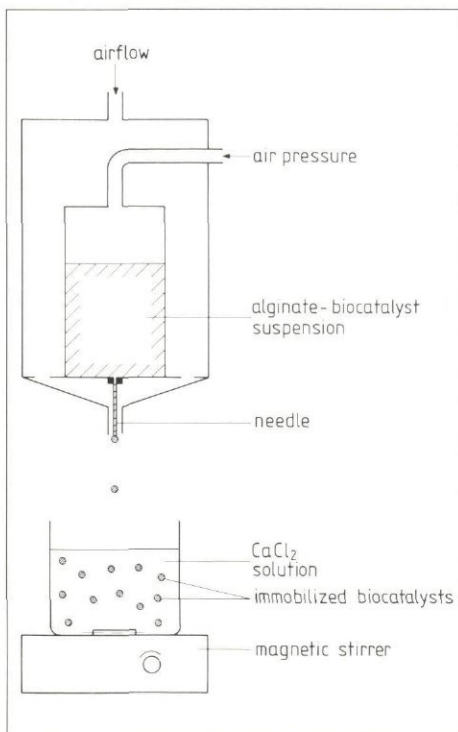
Aggregatie

Er zijn soorten micro-organismen die de neiging hebben aggregaten te vormen of vlokvormige deeltjes, vooral wanneer sprake is van dikke celsuspensies gedurende lange periodes. Dit gebeurt bijvoorbeeld bij diverse giststammen en hiervan wordt gebruik gemaakt in zogenaamde torenfermentoren. Ook bacteriën kunnen vlokke deeltjes vormen die redelijk stabiel zijn zelfs wanneer ze blootgesteld worden aan hoge afschuifkrachten in kolombioreactoren zoals fluide bedden. Hoge celdichtheden, en daarmee grote omzettingssnelheden, zijn daardoor mogelijk. Microbiële aggregatie kan onder sommige omstandigheden ook geïnduceerd worden. Polyelectrolyten kunnen bijvoorbeeld gebruikt worden om de aggregatie van bepaalde soorten bacteriën te bevorderen. Er is ook een aantal gevallen bekend waar beluchten aanleiding geeft tot microbiële aggregatie. Actief slib is daarvan het bekendste voorbeeld. Wat betreft de voor- en nadelen van aggregatie kan het zelfde gezegd worden als bij de hechting van cellen aan oppervlakken.

Insluiting

In vergelijking met voorgaande methoden is insluiting van cellen in polymere gels in het algemeen een beter gedefinieerde vorm van immobilisatie, die bovendien onafhankelijk is van de ceileigenschappen. Fysische insluiting van cellen in een polymere matrix is een van de meest toegepaste immobilisatie-technieken. Natuurlijke hydrogelen zoals

Afb. 2 - Laboratoriumopstelling voor immobilisatie van biokatalysatoren in alginaat.



Afb. 3 - Immobilisatie met een resonantie-nozzle.

alginaat, carrageen en agar, worden daarbij het meest gebruikt als insluitmateriaal omdat de desbetreffende immobilisatieprocedures zeer mild en eenvoudig zijn, zodat de cellen in het algemeen weinig te lijden hebben. Ook andere polymere netwerken kunnen echter toegepast worden, waaronder polyacrylamide, het meest gebruikte synthetische materiaal. Het bezwaar van synthetische polymeren is dat meestal uitgegaan moet worden van een celsuspensie met daarin de monomeren en het crosslinken dus in aanwezigheid van de cellen plaatsvindt, waarbij vaak veel cellen afsterven. Gedeeltelijke prepolymerisatie kan soms aan dit bezwaar tegemoetkomen. De natuurlijke gels worden in het algemeen tot geschikte biokatalysatorbolletjes gemaakt door de cellen te suspenderen in een waterige oplossing van het polymere gelmateriaal en het mengsel druppelsgewijs te extruderen in een oplossing die gelying induceert (afb. 2). In geval van alginaat en carrageen is dat respectievelijk een waterige oplossing van Ca^{2+} en K^+ . Een agaroplossing geleert door de temperatuur voldoende te verlagen. Micro-encapsulering is een techniek die voor cellen tot nu toe nauwelijks toepassing vindt omdat bij deze methode de cellen in het algemeen in aanraking komen met organische oplosmiddelen en chemische reagentia, hetgeen veelal aanleiding geeft tot grote celafsterving. Een fraaie maar dure methode van encapsulering van dierlijke cellen is gepatenteerd door Damon. De cellen worden eerst op de gebruikelijke wijze in alginaat geïmmobiliseerd, waarna een dun semi-permeabel membraan om de alginaatbolletjes wordt gemaakt en vervolgens de alginaat uitgewassen. In principe is deze methode voor alle soorten cellen geschikt, maar naar alle waarschijnlijkheid veel te duur voor toepassingen in de milieuhygiëne. Wat betreft de laatste techniek van insluiting komen vooral de holle-vezel bioreactoren

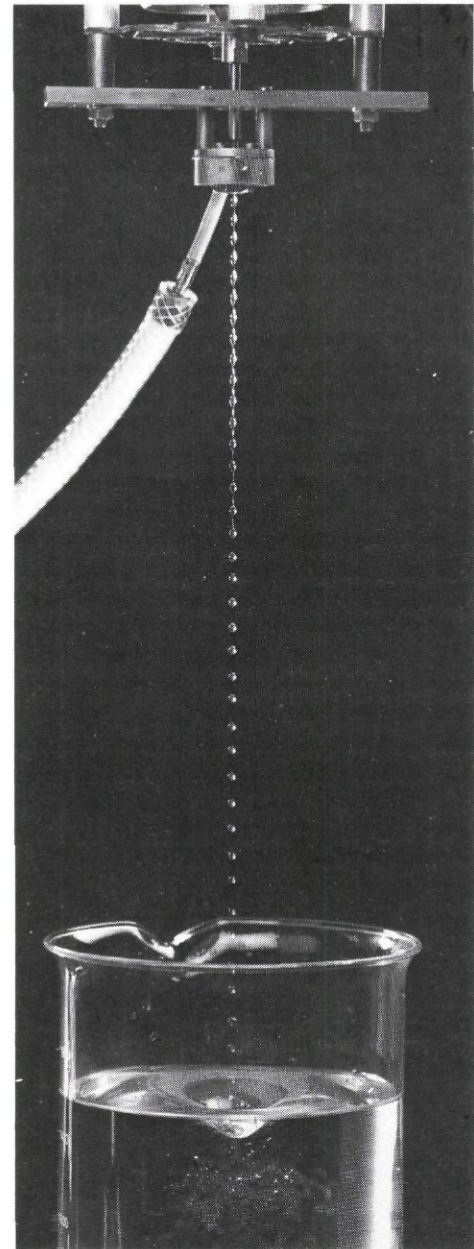


Foto 1 - Opbreken van een vloeistofstraal (celalginaat)-mengsel met een resonantie-nozzle.

praktisch gesproken het meest in aanmerking. Hierin worden de cellen geïmmobiliseerd aan één zijde van de semipermeabele vezel en kunnen substraten en producten 'vrijelijk' door het membraan bewegen. Groei van micro-organismen moet echter zoveel mogelijk beperkt worden om overmatige opbouw van biomassa te voorkomen waardoor teveel drukopbouw kan ontstaan en de capaciteit sterk kan teruglopen. De capaciteit en prijs van dergelijke holle-vezel-bioreactoren maken milieuhygiënische toepassingen echter toch weinig aantrekkelijk.

Opschaling

Het aantal mogelijkheden om cellen te immobiliseren is erg groot, maar het aantal dat echt geschikt is om grote hoeveelheden geïmmobiliseerde cellen in korte tijd te produceren, is daarentegen erg klein. De technieken die vallen onder de eerste twee categorieën van de gegeven indeling, kunnen in principe plaatsvinden in de eigenlijke bioreactor en daarmee dus op de schaal waarop ze toegepast worden. Meestal duurt het echter lange tijd voordat een voldoende grote biomassadichtheid gevormd

is in de bioreactor. Sturings- en controle-mogelijkheden zijn daarbij beperkt, niet het minst omdat de onderliggende mechanismen slecht begrepen worden en nog veel onderzoek vragen. Bij de insluitingstechnieken zijn de sturings- en controle-mogelijkheden daarentegen erg groot. Cellen met een bepaalde gewenste activiteit kunnen in het algemeen snel worden opgekweekt in een fermentor onder goed gecontroleerde optimale omstandigheden. Immobilisatie van deze goed gedefinieerde biomassa in een goed gedefinieerde polymere gel op laboratoriumschaal is eenvoudig, maar op grote schaal zeer bewerkelijk. Technieken waarbij meerdere nozzles ingezet worden zijn in ontwikkeling [1], evenals een techniek die gebruik maakt van een met hoge snelheid draaiende ring met nozzles [2] en die beide opschaling als doel hebben. Ook met het oog hierop hebben wij in ons laboratorium een methode ontwikkeld [3] waarmee met behulp van een resonantienozzle een vloeistofstraal, bestaande uit het cel/opgelost-gelmengsel, wordt opgebroken in druppels van uniforme grootte (afb. 3 en foto 1), die worden opgevangen in een oplossing die gelering induceert. De capaciteit van deze methode is honderdmaal groter dan die van de gewone druppelmethode (afb. 2).

De bruikbaarheid van deze techniek voor milieuhygiënische toepassingen zal beperkt blijven tot systemen waarin de op deze wijze geïmmobiliseerde cellen een lange levensduur hebben. Het betreft namelijk toch voor milieuhygiënische toepassingen een relatief dure methode.

Toepassingen

Een zeer recent overzicht van celimmobilisatie-technieken en toepassingen van geïmmobiliseerde cellen komt van de hand van Scott [4]. Geïmmobiliseerde cellen worden onderzocht of gebruikt voor een verscheidenheid aan toepassingen, waarvan continue productie van ethanol veruit aan kop gaat. Waterzuiveringsprocessen op basis van geïmmobiliseerde cellen zijn echter eveneens een belangrijk toepassingsgebied. Zoals reeds gezegd, zijn het tot nu toe vooral de biofilmreactoren met hun slecht gedefinieerde en gevoelige heterogene populaties, die bestudeerd en in de praktijk toegepast worden. Hiervan is de biofilm-reactor met zandkorreltjes als drager zoals die bijvoorbeeld ontwikkeld is door Gist-Brocades voor nitrificatie, denitrificatie en anaërobie processen, in het verst gevorderde stadium. Algemeen gesproken is veel van het huidige onderzoek aan geïmmobiliseerde cellen voor milieuhygiënische toepassingen gericht op nitrificatie en denitrificatie, maar er bestaat ook veel belangstelling voor verwijdering van opgeloste organische verbindingen. Productie van methaan door

anaërobie afbraak van organische verontreinigingen blijft van groot belang. Ook meer gespecialiseerde benaderingen, zoals het gebruik van geïmmobiliseerde cellen als adsorbentia voor de verwijdering van opgeloste zware metalen, worden bestudeerd. Een geheel nieuwe ontwikkeling is de toepassing van gas/vast-bioreactoren voor behandeling van gasvormige afvalstromen. In een gas/vast-bioreactor is de hoeveelheid vrij water geminimaliseerd en is de gasfase de continue fase. Dit met het oog op een optimaal stoftransport zodat ook gasvormige verontreinigingen aanwezig in zeer lage concentratie nog redelijk effectief verwijderd kunnen worden. In ons laboratorium bestuderen wij in dergelijke bioreactoren met geïmmobiliseerde cellen de afbraak van gechlorideerde koolwaterstoffen. Uiteraard bouwt deze ontwikkeling voort op de al wat langer in de belangstelling staande techniek van biofiltratie, onder andere toegepast voor stankbestrijding, waarin gebruik wordt gemaakt van compost als drager waarop een microbiële flora zich kan ontwikkelen. Het betreft echter ook in dit laatste geval weer een slecht beschreven, slecht te controleren en gevoelig systeem van zich zelf hechtende cellen.

(De)Nitrificatie

Verwijdering van stikstofverbindingen uit afvalstromen is essentieel en wordt vaak bewerkstelligd met biologische processen. Ammonificatie, de biodegradatie van organische stikstofverbindingen tot ammoniumionen, is de eerste stap. In actief-slibinstallaties gebeurt dit in het algemeen snel en het vereist geen speciale maatregelen. Nitrificatie, de oxydatie van ammonium tot nitrietionen door 'gespecialiseerde' bacteriën van het geslacht *Nitrosomonas*, geeft vaak problemen door uitspoeling van deze langzaam groeiende cellen. Nitrificatie, de oxydatie van nitriet tot nitraationen door 'gespecialiseerde' bacteriën van het geslacht *Nitrobacter* is onderhevig aan hetzelfde probleem. Denitrificatie, de reductie van nitraat en nitrietionen tot moleculaire stikstof, is een snel proces, maar vereist anoxische omstandigheden.

Om uitspoeling te voorkomen en om een efficiënte bioreactor te ontwikkelen, is immobilisatie van de micro-organismen een rationele benadering. Gezien onder andere de aanzienlijke hoeveelheden zuur en base die geproduceerd worden in respectievelijk het nitrificatie- en denitrificatieproces, lijkt uitvoering van beide stappen in één bioreactor het meest aantrekkelijke alternatief. Verder overwegende de vereiste aërobie en anoxische condities van de respectieve processen, is het eenvoudigste systeem wat denkbaar is een biokatalysatorbolletje met een aërobie, nitrificerende buitenste schil en

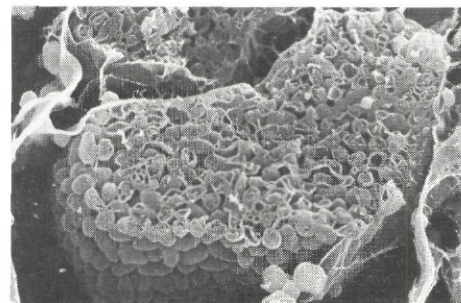


Foto 2 - *Nitrosomonas europaea* cellen geïmmobiliseerd in algiënaat.

een anoxische, denitrificerende kern. Ontwikkeling van een dergelijk systeem is één van de doelstellingen van ons onderzoek aan geïmmobiliseerde cellen. Mede ook in verband met opbouw van fundamentele kennis van geïmmobiliseerde (groeiende) cellen, maar ook om tot een goed begrip van de mechanismen en een goede modelbeschrijving van de nitrificatie- en denitrificatieprocessen te komen, worden de diverse stappen afzonderlijk bestudeerd. Daarbij wordt onder andere gebruik gemaakt van elektronenmicroscopie (zie foto 2). Naast opbouw van fundamentele kennis, wordt met name aan de volgende twee toepassingen gewerkt:

1. Verwijdering van ammoniak uit gasvormige afvalstromen zoals stallucht in verband met de zure-regenproblematiek.
2. Verwijdering van nitraat uit grondwater. Met name bij de laatste toepassing kunnen 'schone', goed gedefinieerde systemen, zoals bijvoorbeeld een denitrificerende reïncultuur geïmmobiliseerd in agar, aantrekkelijke alternatieven zijn. Een en ander [5-9] gebeurt in nauwe samenwerking met de vakgroep Waterzuivering, eveneens van de Landbouwniversiteit.

Literatuur

1. Klein, J., Vorlop, K.-D. (1986). *Immobilization Techniques-Cells*. In 'Comprehensive Biotechnology', (Moo-Young, M., ed.), Vol. 2, Pergamon press, Chapter 12.
2. Matulovic, U. e.a. (1986). *New equipment for the scaled up production of small spherical biocatalysts*. Biotechnol. Lett. 8, 485-490.
3. Hulst, A. C. e.a. (1985). *A new technique for the production of immobilized biocatalyst in large quantities*. Biotechnol. Bioeng. 27, 870-876.
4. Scott, C. D. (1987). *Immobilized cells: a review of recent literature*. Enz. Microb. Technol. 9, 66-73.
5. Ginkel, C. G. van e.a. (1983). *Characterization of Nitrosomonas europea immobilized in calcium alginate*. Enz. Microb. Technol. 5, 297-303.
6. Tramper, J. e.a. (1985). *Characterization of nitrifying bacteria immobilized in calcium alginate*. Enz. Microb. Technol. 7, 155-159.
7. Tramper, J. e.a. (1985). *Nitrification and denitrification by immobilized bacteria*. Proceedings Vol. IV Third European Congress on Biotechnology, VCH, 363-368.
8. Tramper, J. and de Man, A. W. A. (1986). *Characterization of Nitrobacter agilis immobilized in calcium alginate*. Enz. Microb. Technol. 8, 472-476.
9. Tramper, J. and Grootjen, D. R. J. (1986). *Operating performance of Nitrobacter agilis immobilized in carrageenan*. Enz. Microb. Technol. 8, 477-481.

