Biofilm structuren nader bekeken

Introductie

Op vele plaatsen in de 'waterwereld' heeft men te maken met biofilms. Deze 'slijmlagen' met micro-organismen spelen een belangrijke rol in diverse zuiveringsprocessen, en vormen een belangrijke factor in de omzettingen die plaatsvinden in rioolsystemen. Daarnaast speelt de groei van bacteriën op oppervlakken een belangrijke rol bij de drinkwaterbereiding en transport, biocorrosie, en in natuurlijke watersystemen. Veelal is er tussen onderzoekers (en praktijkmensen) uit de bovengenoemde toepassingsgebieden slechts in geringe mate contact. Om hier enige verbetering in aan te brengen en om de bestaande kennis in kaart te brengen is recent in Noordwijkerhout het congres 'Biofilm structure, growth and dynamics' georganiseerd door de Biotechnologie School Delft Leiden (BSDL) gehouden. BSDL is een KNAW erkende onderzoeksschool gericht op onderzoek en onderwijs op het gebied van (milieu)biotechnologische processen. BSDL is een samenwerkingsverband tussen de TU-Delft, RU-Leiden, LU-Wageningen en TNO-Delft.

In dit door de IAWQ, NVA, KNAW en Paques b.v. ondersteunde congres stond de opbouw en structuur van biofilms centraal. Het congres heeft uit al bovenstaande gebieden onderzoekers aangetrokken.

De 120 deelnemers kwamen uit zo'n 25 verschillende landen uit de hele wereld, terwijl eenderde afkomstig was van bedrijven.

Naast het bevorderen van contacten tussen biofilmonderzoekers, was het ook de bedoeling om de bestaande ideeën over biofilm vorming te bediscussiëren. De laatste paar jaren is door de mogelijkheden die nieuwe analysetechnieken bieden het inzicht in de biofilmstructuur danig veranderd. Dit heeft ook consequenties voor modellen van de biofilm opbouw. Dit gegeven werd door prof. Sef Heijnen (TUD) in zijn openingslezing onderstreept door op te roepen om van een bottom-up benadering over te gaan op een top-down benadering van biofilmstructuren. De structuur van een biofilm wordt niet zoals in bestaande modellen bepaald door wat in de film gebeurt, maar door hoe het oppervlak van de biofilm zich gedraagt.

Het congres was opgedeeld in 4 plenaire sessies, een postersessie met 35 bijdragen en 6 discussiegroepen waarin specifieke thema's nader werden bediscussieerd. Hieronder volgt een kort overzicht van de belangrijkste bevindingen en conclusies uit de voordrachten.

Biofilm structuur

De laatste jaren is een grote hoeveelheid nieuwe analysetechnieken opgekomen die in het biofilmwerk kunnen worden gebruikt. Voorbeelden zijn moleculaire probes, micro-electrodes, confocale microscopie (CSLM), en fourier-transformed-infrarood-spectroscopie (FTIR). Deze technieken hebben het beeld van de homogene netjes gelaagde biofilms uit de bestaande 1-dimensionale modellen op de helling gezet. Onderzoek van Dirk de Beer (Max-Planck Instituut, Bremen) heeft laten zien dat in biofilms grote hoeveelheden poriën aanwezig kunnen zijn. Door deze poriën kan convectief transport van substraten en kleine deeltjes plaatsvinden. Dit convectief transport kan afhankelijk van de vloeistofsnelheid boven de biofilm het totaal substraattransport naar de biofilm met een factor 2,5 vergroten. Daarnaast werd een methodiek beschreven waarmee lokaal in de biofilm de diffusie van substraten in de biofilm kan worden gemeten.

Z. Lewandowski (Montana USA) toonde dat de rafelige structuur van biofilms (met poriën en uitgroeisels) in doorstroomde systemen tot een extra drukval leidt. Deze drukval wordt veroorzaakt doordat de biofilm boven een bepaalde stroomsnelheid begint te vibreren. Dit vibreren zou ertoe bij kunnen dragen dat de structuur van de biofilms open blijft. Ook Ulrich Schindler (TU Munchen) liet met anemometrie zien dat wanneer de biofilm een rafelige structuur heeft de hydrodynamische grenslaag niet aanwezig is door de continue beweging van de biofilm.

Door ondergetekende werd op basis van onderzoek bij TNO en de TUD aan airliftreactoren, en op basis van literatuurgegevens een hypothese voor het ontstaan van biofilmstructuren gepresenteerd. Centraal daarbij is het belang van de verhouding tussen de biomassaproduktie in de biofilm en de afslagkrachten die op de biofilm inwerken. Als deze verhouding klein is (relatief grote afslagkracht of shear) lijkt altijd een stabiele en compacte biofilm te ontstaan. Onder deze condities zijn er weinig poriën aanwezig in de biofilm. Anderzijds leidt een relatief lage shear tot volumineuze en rafelige biofilms die sterk gevoelig zijn voor bijvoorbeeld sloughing.

Biofilmvorming kan ook sterk worden beïnvloed door de kinetische eigenschappen van specifieke micro-organismen. Dick van der Kooij (KIWA) bediscussieerde de waarde van AOC-metingen voor het voorspellen van wandgroei in drinkwatersystemen. Het bleek dat slechts een klein deel van het AOC beschikbaar was voor de biofilmgroei. Verder onderzoek naar de relatie tussen AOC en biofilmgroei moet in de toekomst inzicht geven in de groei van ongewenste bacteriën in deze biofilms.

Rol van vaste stof

Het gedrag van vaste stof is in het onderzoek een sterk onderbelicht gebied. Dit is onterecht, niet alleen bevat het water vaak veel particulair materiaal, ook de verspreiding van bacteriën in biofilms wordt bepaald door de mogelijkheden voor vaste stof transport in de biofilm. Door Maria Vieira (Braga, Portugal) werd getoond dat de invang van kleideeltjes in biofilms leidde tot de vorming van meer stabiele biofilms. Ook de totale hoeveelheid biomassa werd groter.

Wim van Benthum (TUD) liet zien dat in min of meer homogene, compacte, biofilms met een vlak oppervlakdeeltjes snel worden ingevangen en dieper in de biofilm terechtkomen. Deze deeltjes kunnen daarna zeer lang in de biofilm aanwezig blijven. Deze verblijftijd kan vele malen de gemiddelde biomassaverblijftijd in het systeem zijn. Alhoewel de biofilmstructuur redelijk overeenkomt met bestaande modellen, kunnen deze modellen dit gedrag van vaste stof absoluut niet beschrijven. Aangezien het voorspellen van de aanwezigheid van bepaalde (gewenste danwel pathogene) micro-organismen in een biofilm van groot belang is moet dit aspect meer aandacht krijgen. Tijdens een aparte discussie werd het belang van vaste stof voor biofilms nog eens onderstreept. Dit belang uit zich onder andere in omzetting van vaste substraten, verspreiding van (pathogene) micro-organismen, en de vorming van gesuspendeerd materiaal.

Populatiedynamica in biofilms

In biofilms vindt in feite een competitie om een goede positie plaats. Micro-organismen dichtbij het oppervlak kunnen meer van substraten in de oplossing profiteren dan dieper groeiende organismen. Dit betekent dat snelgroeiende bacteriën meer aan de buitenkant van de biofilm worden gevonden. De populatieverdeling van nitrificeerders werd bediscussieerd door Satoshi Okabe (Saporro, Japan) en Akiyoshi Ohashi (Nagaoka, Japan). Ze hebben respectievelijk biorotors en biofilters onderzocht. Met microscopische en moleculair genetische technieken werd aangetoond dat nitrificeerders vooral diep in de biofilm worden aangetroffen. Bij biofilters wordt hierdoor tijdens het spoelen vooral de heterotrofe buitenlaag verwijderd terwijl de nitrificeerders zich kunnen handhaven. Modellering met bestaande biofilmmodellen liet zien dat

deze de stratificatie wel voorspellen, maar dat die in het echt nog sterker is dan het model voorspelt.
Ook protozoën hebben een sterke invloed op de biofilm structuur. Ulf Jeppson (Lund, Zweden), liet zien dat sterke groei van protozoën de nitrificatie in een biofilm kan remmen, maar tegelijkertijd ook de vorming van gesuspendeerd vaste stof kan onderdrukken. Dit komt waarschijnlijk doordat deze protozoën als een laag op de biofilm groeien op gesuspendeerd materiaal. Hierdoor komt minder nitraat beschikbaar voor de onderliggende nitrificeerders.
Renze van Houten (LUW) liet in zijn bijdrage zien dat ook in sulfaatreducerende biofilms de sneller groeiende bacteriën zich meer aan de buitenkant van de biofilm ophopen. Deze waarneming lijkt goed overeen te komen met die aan andere systemen. Ook in aërobe of methanoge systemen vormen sneller groeiende bacteriën (vergelijk heterotrofen of verzuurders) een rafeliger biofilm dan langzaam groeiende bacteriën (vergelijk nitrificeerders en methanogenen).

Modellering van biofilmprocessen
De betere waarnemingen aan biofilms noodzaken tot nieuwe methodes en definities om deze structuren te kunnen beschrijven. Zowel Paul Bishop (Cincinnati, USA) als Slav Hermanowicz (Berkeley, USA) beschreven methodes om biofilmstructuren als een fractale structuur te beschrijven. De eerste gebruikte hiervoor een geostatistische methode om de oppervlakte ruwheid te analyseren, terwijl in de tweede bijdrage beeldanalyse van CSLM-opnames werden gebruikt. Beide methodes lijken geschikt voor het beschrijven van de waargenomen ruwheid van biofilms. Het is echter nog onduidelijk hoe de verkregen getallen gebruikt kunnen worden om het gedrag van biofilmsystemen beter te kunnen voorspellen.
In twee bijdragen uit Denemarken (van Poul Harremoes en Jean Arcangeli) werd het 'standaard' biofilmmodel gebruikt om het gedrag van biofilmprocessen te beschrijven. De dynamiek van de denitrificatie in een full scale denitrificerend Biocarbon systeem konden zowel met een overall halfde orde kinetiek als met een mathematisch model (Biosim) worden beschreven. In het laatste geval bleek echter wel dat de gefitte parameters zoals biofilmdikte niet in overeenstemming waren met de fysische werkelijkheid. De conclusie was dat door een te groot aantal onbekende parameters in de modellen deze nu nog niet goed bruikbaar zijn om voor reactormodellering te gebruiken.
In een tweede bijdrage werd getracht de tolueen omzetting in een aërobe en denitrificerende lab-reactor te modelleren.
In dit geval was het modelleren veel beter mogelijk doordat nu vele parameters uit het model onafhankelijk konden worden bepaald en in de hand gehouden.
De laatste twee bijdragen gingen in op de mogelijkheid om het bestaande model te verbeteren. Al Cunningham (Montana, USA) gebruikte daarvoor de rekenkracht van een computer door een 'fluid dynamics' model te gebruiken voor de stroming door een filterbed met daarin biofilmgroei. Dit leidt uiteraard tot goede beschrijvingen in nette laboratoriumsystemen waarbij de geometrie van de biofilm van te voren in het model wordt gestopt. Probleem blijft juist om deze geometrie te voorspellen. Wellicht dat de bovengenoemde fractaalanalyse daarbij in de toekomst kan helpen.
Het bestaande 1-dimensionale model voor de beschrijving van biofilmprocessen werd in de laatste lezing door de auteur van dit model (Oscar Wanneer, Zwitserland) onder de loep genomen. Hij stelde een reeks van veranderingen in het model voor om de in de laatste jaren verworden inzichten in de biofilmstructuur in het model te kunnen verdisconteren. Het blijkt inderdaad mogelijk om de heterogeniteit van biofilmstructuur in deze modellen te verdisconteren; of dit model ook bruikbaar is zal toekomstig onderzoek moeten uitwijzen.

Samenvattend kan gesteld worden dat het beeld van biofilms de afgelopen jaren danig is veranderd van een min of meer homogene 1-dimensionale structuur naar een complexe drie dimensionale structuur. Met deze complexiteit moet rekening worden gehouden als men alle fenomenen samenhangend met biofilmprocessen wil kunnen voorspellen (omzetsnelheden, overleven van bacteriën en virussen in systemen, toename van frictie in pijpleidingen, etc.). Deze complexiteit lijkt het nodig te maken om de modellen ook steeds complexer te maken. Echter in enkele bijdragen werd erop gewezen dat, afhankelijk van het doel, men vaak ook met redelijk simpele vergelijkingen uit de voeten kan. Veel van de optredende fysische mechanismen lijken langzamerhand duidelijk te zijn, een grote vraag was echter of de kennis van het gedrag van micro-organismen in de biofilm niet te veel gesimplificeerd werd. Daarom werd besloten dat over twee jaar in een vergelijkbaar congres de microbiële ecologie in biofilms centraal zal staan.

De belangrijkste bijdragen aan dit congres zullen binnenkort in een editie van Water Science en Technology verschijnen.

Mark van Loosdrecht, Sef Heijnen,
Vakgroep bioprocestechnologie, TU-Delft

• • •

Ontwerpen NEN 6435, NEN 6436, NEN 6463 en NEN 6466 ter kritiek gepubliceerd

- NEN 6435 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het berylliumgehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)';
- NEN 6436 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het bariumgehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)';
- NEN 6463 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het vanadiumgehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)';
- NEN 6466 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het mangaangehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)'.

Het Nederlands Normalisatie-instituut heeft ter kritiek de volgende ontwerpen gepubliceerd:
- *NEN 6435 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het berylliumgehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)'*;
- *NEN 6436 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het bariumgehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)'*;
- *NEN 6463 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het vanadiumgehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)'*;
- *NEN 6466 'Water en slibhoudend water. Bepaling van het mangaangehalte met atomaire-absorptiespectrometrie (grafietoventechniek)'.*

Kritiek op de ontwerpen NEN 6435, NEN 6436, NEN 6463 en NEN 6466 wordt verwacht vóór 1 februari 1996. Exemplaren van de ontwerpen NEN 6435, NEN 6436, NEN 6463 en NEN 6466 zijn tegen vergoeding verkrijgbaar bij het Nederlands Normalisatie-instituut, Postbus 5059, 2600 GB Delft, telefoon 015 - 269 03 90.