

## Łukasz JANCZEWSKI, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

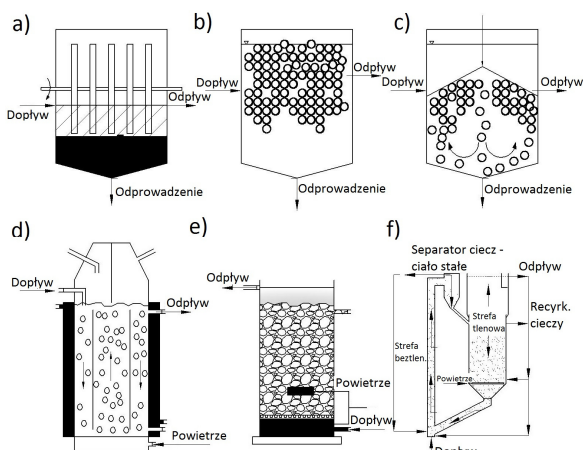
e-mail: lukasz.janczewski@pwr.edu.pl

Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

# Bioreaktory membranowe z warstwą biofilmu

## Wstęp

Bioreaktory należą do szczególnej grupy aparatów chemicznych. Wykorzystywane w hodowli drobnoustrojów, muszą spełniać szereg wymagań technologicznych: zapewniać odpowiednie środowisko (często sterylne, oddzielone od otoczenia) do realizacji zdefiniowanego zadania (namnażania biomasy, wytwarzania metabolitów). Stosując podział przedstawiony w literaturze [Bednarski i Fiedurek, 2007] można wyróżnić bioreaktory wykorzystywane do hodowli wstępnej, do hodowli na stałym podłożu oraz z unieruchomionym (immobilizowanym) materiałem biologicznym. Aby unieruchomić organizmy stosuje się metody sorpcyjne, zamykania w siatce polimeru oraz metody agregacji. Spośród wielu typów reaktorów najczęściej stosowane są reaktory (w wersji okresowej lub ciągłej) z nieruchomym złożem lub ze złożem cyrkulującym a dalej aparaty fluidalne typu ciecz-ciało stałe lub trójfazowe gaz-ciecz-ciało stałe. Przykładowe rozwiązania konstrukcyjne reaktorów z immobilizowaną biomasą przedstawiono na rys. 1 [Bednarski i Fiedurek, 2007].



Rys. 1. Przykładowe rozwiązania konstrukcyjne bioreaktorów z warstwą biofilmu: a) rotacyjny reaktor dyskowy, b) złożo ruchome (proces beztlenowy), c) złożo ruchome (proces tlenowy), d) air – lift, e) złożo nieruchome, f) złożo fluidyzacyjne [Bednarski i Fiedurek, 2007].

Szczególnym przypadkiem bioreaktorów z unieruchomionym materiałem biologicznym (Rys.1e) są bioreaktory membranowe z warstwą biofilmu osadzoną na powierzchni membrany. W tym przypadku membrana oprócz służenia jako suport może wpływać na selektywne dostarczanie substancji ze strumienia ciekłego lub gazowego.

Celem pracy jest zaprezentowanie wybranych rozwiązań bioreaktorów z immobilizowaną warstwą biofilmu. Opisano reaktory napowietrzane membranowo z warstwą biofilmu na powierzchni membrany oraz mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, w których biofilm jest immobilizowany na powierzchni elektrody.

## Immobilizacja biofilmu na membranie

Biofilmy bakteryjne stanowią wielokomórkowe zbiorowiska, w których komórki są rozmieszczone obok siebie i są otoczone zewnątrzkomórkową substancją zwaną glikokaliksem. Biofilmy mogą być zamieszkiwane przez jeden rodzaj bakterii lub co jest częstszym zjawiskiem tworzyć mieszaninę różnych społeczności komórek, począwszy od filogenetycznie wysoce różnorodnych społeczności do tych, w których jedna lub ograniczona liczba komórek będzie dominowała liczebnie i funkcjonalnie. Proces formowania biofilmu obejmuje różne etapy takie jak: odwracalne, następnie nieodwracalne

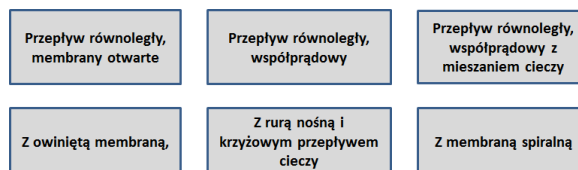
przyłączenie do powierzchni; wstępne uformowanie mikrokolonii; dojrzewanie, starzenie oraz różnicowanie się mikrokolonii; ostatecznie rozpad biofilmu i powstawanie komórek rozproszonych [Kjelleberg i Givskov, 2007]. Biofilm charakteryzuje się pod względem składu mikrobiologicznego, ekspansji objętościowej oraz dostępu (na drodze dyfuzji) substratów. Te cechy wynikają z rodzaju mikroorganizmów w biofilmie, ich przestrzennego umiejscowienia oraz dynamicznej równowagi pomiędzy organizmami [González-Brambila i in., 2006].

Biofilm ma tendencję do adaptacji do różnych warunków (np. dużych sił ścinających), w związku z tym podjęte próby zrywania nadmiarowego biofilmu [Pellicer-Nächer i in., 2013] przez zwiększenie natężenia przepływu wody, zrywanie biofilmu z pomocą pęcherzyków gazu, intensywne mieszanie ciągłe, czy mieszanie przerywane następujące w przerwie procesu realizowanego w warunkach niskich sił ścinających - bywają nieskuteczne. Często biofilm poddany dużym siłom ścinającym staje się gęstszy i bardziej spoisty od biofilmu wytworzonego w warunkach niskich sił ścinających. Kontrola grubości biofilmu jest bez wątpienia jednym z najtrudniejszych zadań przy realizacji zadań z jego wykorzystaniem.

Sposób dostarczania gazów do biofilmu może wpływać zarówno na skład konsorcjum mikroorganizmów, jak i kinetykę przemian biochemicznych. Głównym ograniczeniem w realizacji dozowania gazów w całej objętości cieczy jest niska rozpuszczalność wielu z nich w środowisku wodnym. Powstający w tym przypadku układ heterogeniczny ciecz-gaz jest szczególnie niekorzystny w przypadku biodegradacji substancji lotnych, które desorbują do gazu. W bioreaktorach membranowych z warstwą biofilmu gaz może być doprowadzony przez membranę.

W pracy Casey'a i in. [1999] przedstawiono klasyfikację systemów, w których biofilm jest immobilizowany na membranie i równocześnie membrana jest wykorzystywana do precyzyjnego dozowania substratów. Rozróżniono: a) bioreaktory z warstwą biofilmu napowietrzane membranowo (MABR) z transportem tlenu lub powietrza przez membranę (tlen dyfunduje przez membranę do biofilmu, gdzie następuje utlenianie zanieczyszczeń doprowadzonych od strony powierzchni biofilmu); b) biofiltry membranowe – gaz odpadowy przepływa przez membranę, składniki lotne np. propan, toluen dyfundują przez membranę do biofilmu, w którym przebiega proces ich biodegradacji; c) ekstrakcyjne bioreaktory membranowe (EMB) – składniki jak np. fenol, chloronitrobenzen, dichloroanilina, trichloroetan czy związki azotowe zawarte w zanieczyszczonym ciekłym medium są selektywnie transportowane przez membranę lita do biofilmu, gdzie przebiega proces biodegradacji.

Pod względem konstrukcyjnym stosowane są najczęściej membrany kapilarne, zwłaszcza zamknięte (Rys. 2), z możliwą cyrkulacją.

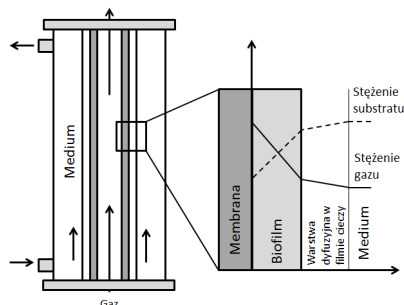


Rys. 2. Bioreaktory z membranowym doprowadzaniem gazu [Martin i Nerenberg, 2012]

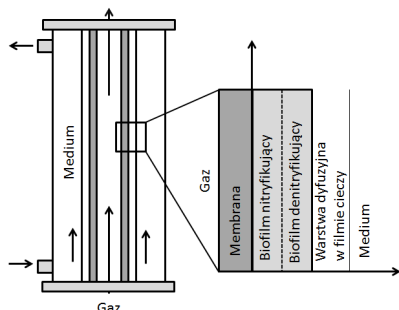
Dominują membrany hydrofobowe (np. z politetrafluoroetyleny, polietyleny, polichloru winylu, polipropylenu, polisulfonu), mikroporowate. Stosuje się również membrany lite np. z polidimetylosiloksanu lub membrany kompozytowe [Casey i in., 1999]. Z uwagi na szybkość dyfuzji zarówno membrany lite, jak i warstwa separująca membran kompozytowych powinny być jak najcieńsze.

## Profile stężeń w biofilmie

Porównanie immobilizacji biofilmu na tradycyjnych podłożach stałych (np. złożu ziarnistym) oraz na membranie służącej równocześnie do selektywnego transportu składników, w aspekcie uzyskiwanych profili stężeń tlenu oraz głównej substancji organicznej wskazuje na istotne zalety biofilmu immobilizowanego na membranie (Rys. 3).



Rys. 3. Profile stężeń w przypadku dwustronnego dozowania reagentów (tlenu ze strumienia gazowego, materii organicznej ze strumienia ciekłego).



Rys. 4. Rozwarstwienie w biofilmie przy dwustronnym dostarczaniu substratów i przy przebiegających procesach nityfikacji denitryfikacji

W rezultacie obustronnego dostarczania substancji i wynikającego z tego gradientu stężeń, mikroorganizmy w warstwach różnicują się na żyjące w środowisku tlenowym oraz na żyjące w strefie beztlenowej [Ahmadimotlagh i in., 2008]. Stąd możliwa jest realizacja równoczesnych procesów aerobowych oraz anaerobowych w jednym reaktorze [Shanahan i Semmens 2006] (Rys. 4). Najwyższa aktywność biofilmu powstałego w ten sposób jest w jego centralnej części. W przypadku zbyt dużej grubości biofilmu działanie biofilmu ogranicza się do warstwy aktywnej, gdzie są dostępne oba limitujące reakcję substraty [Casey i in., 1999].

W dyfuzyjnym transporcie masy składnika ze strumienia gazowego przepływającego wewnątrz kapilar wyróżnić można następujące opory: opór membrany, opór warstwy biofilmu oraz opór w cieczy po drugiej stronie biofilmu. Opór warstewki po stronie gazowej jest na ogół pomijalnie mały. Na profil stężenia gazu pomiędzy membraną a biofilmem wpływa opór transportu dyfuzyjnego gazu przez warstwę biofilmu oraz aktywność zużywania gazu przez mikroorganizmy. Mikroorganizmy wykorzystujące gaz zwiększają gradient stężeń, a przez to intensyfikują transport masy przez membranę [Pellicer-Nàcher i in., 2013]. Warstewka dyfuzyjna występująca od strony cieczy i spalniająca transport gazu do cieczy sprzyja jego utrzymaniu w biofilmie (i wykorzystaniu przez mikroorganizmy). Możliwy jest również transport wsteczny gazu (z cieczy do biofilmu).

## Skuteczność usuwania zanieczyszczeń

Skuteczność biodegradacji w reaktorach membranowych z osadem czynnym oraz z komórkami immobilizowanymi na membranie (służącej jedynie jako suport) w odniesieniu do ChZT oraz nityfikacji jest porównywalna. Jak wykazały badania biofilm sprawdził się bardziej przy usuwaniu azotu całkowitego oraz fosforu [Casey i in., 1999]. Jest on również efektywniejszy przy wysokich stężeniach zanieczyszczeń z uwagi na wyższą odporność komórek zgromadzonej w biofilmie.

Szeroko omawiane w pracy bioreaktory z natlenianiem membranowym badano głównie ze względu na jednocześnie usuwanie ChZT, nityfikację i denitryfikację [Semmens i in., 2003; Satoh i in., 2004; Hu i in., 2008; Liu i in., 2010; Wei i in., 2012; Pellicer-Nàcher i in., 2013]. Liu i in. [2010] badali wpływ proporcji substratów ChZT/N na skuteczność realizacji procesu oraz strukturę społeczności mikroorganizmów. Przy małych wartościach ChZT/N dominowały bakterie nityfikujące natomiast przy zbyt wysokich wartościach w ChZT/N heterotrofy hamowały wzrost bakterii nityfikujących w wyniku współzawodnictwa o tlen. Dla optymalnej wartości ChZT/N = 5 możliwa była efektywna, równoczesna realizacja procesów usuwania ChZT (85%), nityfikacji (93%) i denitryfikacji (92%) w jednym reaktorze.

Reaktory MABR były również badane pod względem usuwania specjalnych rodzajów zanieczyszczeń jak: benzen, toluen, etylobenzen, ksylen, rozpuszczalniki chlorowcopochodne, chlorofenole (wspieranie rozwoju wolno rosnących bakterii degradujących ksenobiotyki) [Hibiya i in. 2003]. Mikroorganizmy w MABR wykorzystano również do biodegradacji kancerogennego acetonitrylu powszechnie stosowanego w przemyśle farmaceutycznym przy produkcji środków ochrony roślin, rozpuszczalników i ekstrahentów. Biofilm chronił mikroorganizmy przed toksycznym wpływem wysokich stężeń acetonitrylu w otaczającym medium [Li T. i in. 2008; 2009]. W porównaniu do hodowli wglębnych biofilmy (szczególnie te napowietrzane membranowo) są mniej podatne na efekty inhibicji. Do innych opisanych zastosowań MABR można zaliczyć biodegradację związków alifatycznych fluorowców np. fluorooctanu [Heffernan i in., 2009], zanieczyszczonej wody z pól naftowych [Li P. i in., 2014], odcieków z wysypisk śmieci [Syron i Casey, 2012], usuwanie 1,2-dichloroetanu (DCA) z wód gruntowych [Hage i in., 2004], barwników, jak np. Acid Orange 7 [Wang i in., 2012].

## Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe

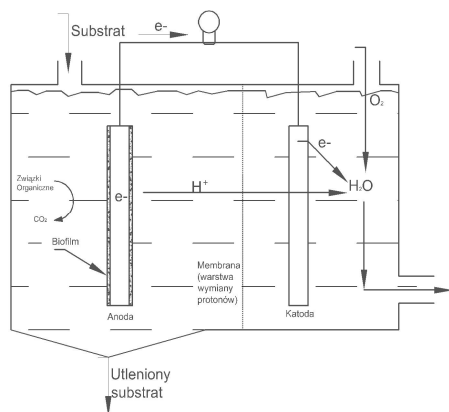
Od kilkunastu lat prowadzone są prace nad wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych do produkcji energii elektrycznej z szerokiej grupy związków organicznych. Spośród różnych rozwiązań można wyróżnić reaktory, w których mikroorganizmy:

- produkują metabolity, a te następnie są utleniane na anodzie (znajdującej się w tym samym reaktorze lub w osobnym ogniwie),
- wytwarzają elektrony natomiast w celu spowodowania ich transportu do anody wprowadzane są do reaktora tzw. mediatory (pośredniczą one w wymianie elektronów),
- bezpośrednio przekazują elektrony do anody - poprzez znajdującą się na zewnętrznej membranie cytochromy [Pant i in, 2010].

Szczególnym przypadkiem mikrobiologicznych ogniwiw paliwowych są układy, w których wykorzystuje się biofilm złożony z wyspecjalizowanych grup bakterii zdolnych do bezpośredniego przekazywania elektronów anodzie, do zamiany energii zawartej w zanieczyszczeniach organicznych i ostatecznie wytwarzania energii elektrycznej.

Schemat mikrobiologicznego ogniwa paliwowego wykorzystującego bakterie tworzące biofilm przedstawiono na rys. 5. W zbiorniku zanurzone są elektrody (np. grafitowe), oddzielone od siebie membraną jonoselektywną (przepuszczającą zwykle protony). Zbiornik w ten sposób podzielony jest na część anodową i katodową. Do części anodowej doprowadzane są substraty w postaci związków organicznych. W wyniku reakcji chemicznych przebiegających na anodzie elektrony są przenoszone przez obwód elektryczny do katody, natomiast powstałe protony migrują przez jonoselektywną membranę do części katodowej reaktora. Tlen doprowadzony w części katodowej jest tam redukowany.

W pracy Yu i in. [2011] przedstawiono mikrobiologiczne ogniwo paliwowe z membranowym natlenianiem biofilmu. W odróżnieniu od tradycyjnych układów części katodowa i anodowa nie były rozdzielone membraną jonowymienną. Dzięki zastosowanej integracji możliwa była skuteczna realizacja jednoczesnej nityfikacji, denitryfikacji, usuwania ChZT oraz produkcja energii elektrycznej w jednym reaktorze.



Rys. 5. Mikrobiologiczne ogniwo paliwowe [Sikora i Sikora, 2005]

## Podsumowanie

Wyzwania badawczo-rozwojowe w odniesieniu do bioreaktorów z warstwą biofilmu i membranowym doprowadzaniem gazu obejmują przede wszystkim zagadnienia wymiany masy oraz zwiększenia skali. Niezbędne jest stosowanie metod kontroli grubości warstwy biofilmu w celu uzyskania i utrzymywania biofilmu o wysokiej aktywności. Kierunek prac nad metodami kontroli grubości biofilmu winien uwzględniać metody chemiczne (np. użycie kwasów, zasad, soli, utleniaczy), jak również tzw. zielonej strategii (np. zastosowanie enzymów, fagów). Kontrola grubości poszczególnych warstw w wielogatunkowych (wielofunkcyjnych) biofilmach to dodatkowe wyzwanie.

Pomimo licznej literatury na temat biofilmu wciąż mało jest wiadomo o zjawisku dyfuzji wstecznej gazu i jego wpływie na efektywność realizacji procesów biodegradacji. Zagadnienie dyfuzji poszczególnych składników (również w aspekcie dyfuzji przeciwnierunkowej) jest istotne szczególnie w biofilmach, gdzie wytwarzane są związki mające negatywny wpływ (inhibitory) na procesy zachodzące w biofilmie.

## LITERATURA

- Ahmadimotlagh A., Lapara T., I Semmens M., 2008. Ammonium Removal in Advective-Flow Membrane-Aerated Biofilm Reactors (AF-MABRs). *J. Membr. Sci.*, **319**, nr 1-2, 76–81. DOI: 10.1016/j.memsci.2008.03.020
- Bednarski W., Fiedurek J., 2007. *Podstawy Biotechnologii Przemysłowej*. WNT Warszawa.
- Casey E., B Glennon, Hamer G., 1999. Review of Membrane Aerated Biofilm Reactors. *Res. Conserv. Recycling*, **27** nr 1-2, 203-215. DOI: 10.1016/S0921-3449(99)00007-5
- González-Brambila M., Monroy O., López-Isunza F., 2006. Experimental and Theoretical Study of membrane-aerated biofilm reactor behavior under different modes of oxygen supply for the treatment of synthetic wastewater. *Chem. Eng. Sci.*, **61**, nr 16, 5268-5281. DOI: 10.1016/j.ces.2006.03.049
- Hage J. C., Van Houten R. T., Tramper J., Hartmans S., 2004. Membrane-aerated biofilm reactor for the removal of 1,2-dichloroethane by *Pseudomonas Sp.* Strain DCA1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, nr 5, 718-25. DOI: 10.1007/s00253-004-1586-6
- Heffernan B., Cormac D. M., Syron E., Casey E., 2009. Treatment of fluoroacetate by a *Pseudomonas fluorescens* biofilm grown in membrane aerated biofilm reactor. *Env. Sci. Technol.*, **43**, 6776–85. DOI: 10.1021/es9001554
- Hibiya K., Terada A., Tsuneda S., Hirata A., 2003. Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor. *J. Biotechnol.*, **10**, nr 1, 23-32. DOI: 10.1016/S0168-1656(02)00227-4

- Hu S., Yang F., Sun C., Zhang J., Wang T., 2008. Simultaneous removal of cod and nitrogen using a novel carbon-membrane aerated biofilm reactor. *J. Env. Sci.*, **20**, nr 2, 142–48. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)60022-4
- Kjelleberg S., Givskov M. (Eds), 2007. *The biofilm mode of life: Mechanisms and adaptations*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, 5-23
- Li P., Zhao D., Zhang Y., Sun L., Zhang H., Liang M., Lian B. 2014., Oil-field wastewater treatment by hybrid Membrane-Aerated Biofilm Reactor (MABR) system. *Chemical Engineering Journal*, DOI: 10.1016/j.cej.2014.11.131
- Li T., Bai R., Ohandja D., Liu J., 2009. Biodegradation of Acetonitrile by adapted biofilm in a Membrane-Aerated Biofilm Reactor. *Biodegradation*. nr 20, 569–80. DOI: 10.1007/s10532-008-9246-7
- Li T., Liu J., Bai B. i in. 2008. Membrane-Aerated Biofilm Reactor for the treatment of Acetonitrile wastewater. *Env. Sci. Technol.*, **42**, 2099–2104. DOI: 10.1021/es702150f.
- Liu H., Yang F., Shi S., Liu X., 2010. Effect of Substrate COD/N Ratio on Performance and Microbial Community Structure of a Membrane Aerated Biofilm Reactor. *J. Env. Sci.*, **22** nr 4, 540-46. DOI: 10.1016/S1001-0742(09)60143-1.
- Martin K. J., Nerenberg R., 2012. The Membrane Biofilm Reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: principles, applications, and recent developments. *Biores. Technol.*, **122**, 83-94. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.110.
- D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, K. Vanbroekhoven, 2010, A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Biores. Technol.*, **101**, 1533–1543. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.10.017
- Pellicer-Nàcher C., Domingo-Félez C., Lackner S., Smets B. F., 2013. Microbial activity catalyzes oxygen transfer in Membrane-Aerated Nitrifying Biofilm Reactors. *J. Membr. Sci.*, **446**, 465-471. DOI: 10.1016/j.memsci.2013.06.063
- Satoh H., i in. 2004. Macroscale and microscale analyses of nitrification and denitrification in biofilms attached on Membrane Aerated Biofilm Reactors. *Water Res.*, **38** nr 6, 1633-1641. DOI: 10.1016/j.watres.2003.12.020
- Semmens M., Dahm K., Shanahan J., Christianson A. 2003. COD and nitrogen removal by biofilms growing on gas permeable membranes. *Water Res.*, **37**, nr 18, 4343–50. DOI:10.1016/S0043-1354(03)00416-0
- Shanahan J. W., Semmens M. J., 2006. Influence of a nitrifying biofilm on local oxygen fluxes across a micro-porous flat sheet membrane. *J. Membr. Sci.*, **277**, 65-74. DOI: 10.1016/j.memsci.2005.10.010
- Sikora A., Sikora R., 2005. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe. *Biotechnologia*, **2** nr 2, 68-77
- Syron E., Casey E., 2012. Performance of a pilot scale Membrane Aerated Biofilm Reactor for the treatment of landfill leachate. *Procedia Eng.*, **44**, 2082-2084. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.09.052
- Wang J., Liu G., Lu H., Jin R., Zhou J., Lei T., 2012. Biodegradation of Acid Orange 7 and its auto-oxidative decolorization product in Membrane-Aerated Biofilm Reactor. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, **67**, 73-77. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.12.003.
- Wei X., Li B., Zhao S., Qiang C., Zhang H., Wang S., 2012. COD and Nitrogen removal in Facilitated Transfer Membrane-Aerated Biofilm Reactor (FT-MABR). *J. Membr. Sci.*, **389**, 257–64. DOI: 10.1016/j.memsci.2011.10.038.
- Yu C.-P., Liang Z., Das A., Hu Z., 2011. Nitrogen removal from wastewater using membrane aerated microbial fuel cell techniques. *Water Res.*, **45**, nr 3, 1157-1164. DOI: 10.1016/j.watres.2010.11.002.

*Praca została zrealizowana w ramach działalności statutowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej jako projekt S40616/Z0311. Prezentacja wyników podczas XII Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej "Postępy Inżynierii Bioreaktorowej" sfinansowana ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.*