



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

Op zoek naar acetogene bacteriën die ijzer corroderen
en hun toepassing in microbiële electrosynthese

Eva Monballyu

Promotor: Prof. dr. ir. Korneel Rabaey

Tutor: Dr. Jo Philips en Dr. Jan B.A. Arends

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

Op zoek naar acetogene bacteriën die ijzer corroderen
en hun toepassing in microbiële electrosynthese

Eva Monballyu

Promotor: Prof. dr. ir. Korneel Rabaey

Tutor: Dr. Jo Philips en Dr. Jan B.A. Arends

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Auteursrechtelijke bescherming

“De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de scriptie te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.”

“The author and the promoter give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this thesis”.

juni 2016

Prof. dr. ir. Korneel Rabaey
Promotor

Eva Monballyu
Auteur

Voorwoord

Los van de theoretische achtergrond die je tijdens je opleiding onder de knie hebt gekregen, wordt de echte kennis toch opgedaan in de praktijk. Hierbij wordt duidelijk dat het praktisch en theoretisch gedeelte niet altijd even mooi samenlopen. Labowerk gaat gepaard met kleine en iets grotere problemen. Gelukkig kon ik altijd rekenen op steun uit diverse hoeken zowel binnen CMET, als bij mijn familie en vrienden.

Ten eerste wil ik mijn promotor Prof. dr. ir. Korneel Rabaey bedanken voor de kans die ik gekregen heb om dit onderzoek uit te voeren.

Graag wil ik mijn tutor Jo Philips bedanken. Dankzij je uitstekende begeleiding en aanmoedigingen kon ik mijn masterproef waarmaken. Na Jo's bevalling werd ik opgevangen door Jan B.A. Arends. Ik wil Jan dus graag bedanken voor het helpen finaliseren van mijn masterproef en alle feedback. Bedankt dat ik bij je terecht kon, je was een zeer grote hulp! Niets was je te veel en daar ben ik je zeer dankbaar voor. Zonder jou zou het onmogelijk geweest zijn om deze masterproef tot een goed einde te brengen. Jana De Bodt wil ik bedanken voor de staalnames wanneer ik door lessen of examenperiode niet aanwezig kon zijn. Vervolgens wil ik graag Greet Van de Velde bedanken. Ik kon altijd bij je terecht en de rust die je uitstraalde in het labo was bewonderenswaardig. Ik wens jullie allen het allerbeste toe!

Ook de Gentse brandweerzone Centrum wil ik bedanken voor het opduiken van sediment en roest in de Coupure. Zonder de medewerking van opperadjudant Gino Hamelink en zijn team zou deze masterproef niet mogelijk geweest zijn.

Mijn ouders wil ik bedanken voor de steun die ik gedurende mijn studies kreeg. Jullie bleven altijd in me geloven en moedigden me mateloos aan. Ook mijn broers, Kris en Gil stonden altijd paraat. Bedankt!

Als laatste wil ik mijn meisjes Iris, Ruth en Rani bedanken. Iris, dikke merci om samen met mij al die uren achter onze laptop door te brengen, om me te helpen met Word en Excel als ik weer eens een knopje niet vond, om samen even alle spanning te ventileren door onnozel te doen op muziek van Taylor Swift,... Ook al zijn de meeste van onze nachtelijke avonturen beperkt gebleven tot de thesisfeestjes met z'n twee in de living, was het een fantastisch jaar dat zorgde voor prachtige herinneringen die ik voor altijd zal blijven koesteren! Ruth, bedankt om er altijd voor me te zijn. Zowel in het labo als tijdens de lessen, de vergaderingen en de vele momenten tussendoor! Jij loopt altijd rond met een aanstekelijke glimlach op je gezicht en het was een plezier om die dagelijks te zien. Rani, bedankt om altijd naar ons te luisteren. Ook al ligt het schrijven van een thesis al even achter je, je leefde toch constant met Iris, Ruth en mij mee en moedigde ons mateloos aan. Jullie zijn drie schatten van vriendinnen!

Samenvatting

Door de groeiende wereldbevolking en de stijgende levensstandaard is er een almaar groter wordende behoefte aan energie. Een van de grootste uitdagingen is de energieopslag. De bestaande batterijen bieden voorlopig onvoldoende capaciteit om de energieoverschotten op te slaan om energietekorten te overbruggen. Een methode om dit probleem te omzeilen is de omzetting van elektrische energie naar chemische energie. Microbiële electrosynthese (MES) wordt gebruikt om elektrische energie en CO₂ om te zetten naar organische componenten. Een manier om MES te testen is door gebruik te maken van aangerijkte culturen met Fe(0) als enige elektrondonor.

Naast het testen van de pure culturen *C. ljungdahlii* en *S. sphaeroides* worden milieustalen (sediment en roest van gedumpte fietsen) afkomstig uit de Coupure (Gent) onderzocht op hun mogelijkheid om te groeien met Fe(0) als enige elektrondonor en CO₂ als elektronacceptor. Hierbij wordt het gehalte aan geproduceerd acetaat, waterstof en methaan en de pH-verandering bijgehouden. Incubatie van de milieustalen verloopt bij 15°C of 28°C startende van pH 6,2 (MES) of pH 7,2 (MOPS). De milieustalen op 28°C worden meerdere keren getransfereerd en gesplitst in aanrijkingen in aan- of afwezigheid van BES om methanogene groei te voorkomen. De optimale grootte van de ijzerdeeltjes werd nagegaan door gebruik te maken van partikels en poeder.

De aangerijkte stalen produceerden acetaat gekoppeld aan Fe(0) oxidatie. Bij de pure culturen was de acetaatproductie bij *C. ljungdahlii* dubbel zo hoog als in vergelijking met *S. sphaeroides*. De resultaten van de milieustalen duiden op een groei van acetogene bacteriën in anaerobe omstandigheden met Fe(0) als enige elektrondonor met de productie van acetaat.

Abstract

Due to the growing world population and rising living standards, the need for energy is increasing. One of the biggest challenges is the storage of energy. The existing batteries do not offer enough capacity to store the surplus energy to overcome energy shortages. One way to circumvent this problem is the conversion of excess electrical energy into chemical energy. Microbial electrosynthesis (MES) is used to convert electrical energy and CO₂ into organic components such as acetate. One way to test MES is by using cultures enriched with Fe(0) as the sole electron donor.

In addition to the pure cultures *C. ljungdahlii* and *S. sphaeroides*, some environmental samples (sediment and rust from dumped bicycles) from the Coupure channel (Ghent), were examined for their ability to grow with Fe(0) as the sole electron donor, and CO₂ as electron acceptor. Hydrogen, methane and acetate production and pH changes have been monitored in these microcosms. Incubation of the environmental samples took place at 15°C or 28°C, starting from pH 6.2 (MES) or pH 7.2 (MOPS). The environmental samples at 28°C were transferred several times and split into enrichments in the presence or absence of BES in order to prevent methanogenic growth. The optimum size of the iron particles is examined by the use of particles and powder.

The enriched microorganisms produced acetate linked to Fe(0) oxidation. The amount of acetate production by *C. ljungdahlii* was double compared to *S. sphaeroides*. The results of the environmental tests indicate a growth of acetogenic bacteria in anaerobic conditions with Fe(0) as sole electron donor with the production of acetate.

Inhoudsopgave

Voorwoord.....	i
Samenvatting	iii
Abstract.....	iv
Inhoudsopgave.....	v
Lijst met afkortingen	viii
Lijst met figuren.....	ix
Lijst met tabellen	xi
Inleiding.....	xii
Literatuurstudie.....	1
Deel 1: Microbiële corrosie.....	1
1. Corrosie.....	1
2. Mechanismen van microbiële corrosie (biocorrosie)	3
3. Micro-organismen betrokken bij microbiële corrosie	4
3.1 Sulfaatreducerders	4
3.2 Nitraatreducerders.....	6
3.3 Methanogenen	7
3.4 Andere: <i>Geobacter</i>	9
3.5 Acetogene bacteriën.....	10
Deel 2: Microbiële electrosynthese	14
1. Principe.....	14
2. <i>Geobacter</i> als modelorganisme	15
3. Acetogenen voor microbiële electrosynthese.....	16
Onderzoeksdoelstellingen	18
Materiaal en methoden.....	20
1. Cultuurmedia	20
2. Micro-organismen	20
3. Experimentele opstellingen.....	21
4. Analytische methoden.....	21
4.1 Fysicochemische parameters	21
4.2 Gasbepalingen	22
4.3 Bepaling van vluchtige vetzuren	22
4.4 Bepaling van kationen en anionen in waterstaal	23
4.5 IJzerbepaling.....	23
5. Berekeningen	24
5.1 Standaarddeviatie	24

5.2 Elektronequivalenten	24
5.3 IJzergehalte	25
Resultaten	26
1. Abiotische corrosie van Fe(0) onder anaerobe omstandigheden	26
2. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van pure culturen	27
2.1 <i>Clostridium ljungdahlii</i> experiment	27
2.2 <i>Sporomusa sphaeroides</i> experiment	30
3. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen	31
3.1 Proefopzet bij 15°C	31
3.2 Proefopzet bij 28°C	33
3.3 Transfers	34
3.4 Testen productiesnelheid	39
4. IJzerbepaling	41
4.1 <i>S. sphaeroides</i>	41
4.2 Testen productiesnelheid	41
Discussie	42
1. Abiotische corrosie van Fe(0) onder anaerobe omstandigheden	42
2. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van pure culturen	42
2.1 <i>Clostridium ljungdahlii</i> experiment	42
2.2 <i>Sporomusa sphaeroides</i> experiment	43
2.3 Vergelijking <i>C. ljungdahlii</i> en <i>S. sphaeroides</i>	43
3. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen	44
3.1 Proefopzet bij 15°C	44
3.2 Proefopzet bij 28°C	45
3.3 Transfers	45
3.4 Testen productiesnelheid	46
4. IJzerbepaling	47
4.1 <i>S. sphaeroides</i>	47
4.2 Testen productiesnelheid	47
Algemeen besluit	48
Toekomstperspectieven	50
Duurzaamheid	51
Referentielijst	52
Appendices	56
Appendix 1: 1X Phosphate Buffered Saline (PBS buffer)	56
Appendix 2: DSMZ 879 aangepast medium voor de aanrijking van acetogenen	57
Appendix 3: DSMZ 311 medium voor <i>Sporomusa</i> (Betaine)	59

Appendix 4: DSMZ 879 medium voor <i>Clostridium ljungdahlii</i>	60
Appendix 5: Fe(II)extractie	61
Appendix 6: Meting van opgelost ijzer (referentie: ISO 6332).....	61
Appendix 7: Overzicht van de transfers bij 28°C	62
Transfer 1.....	62
Transfer 2.....	64
Transfer 3.....	66

Lijst met afkortingen

BES	2-bromoethanesulfonate
CMET	Center for Microbial Ecology and Technology
CMIC	Chemical Microbially influenced Corrosion
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EMIC	Electrical Microbially influenced Corrosion
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MES	Microbial electrosynthesis
MIC	Microbially influenced Corrosion
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
NRB	Nitraatreducerende bacteriën
SHE	Standaard waterstofelektrode
SRB	Sulfaatreducerende bacteriën

Lijst met figuren

Figuur 1: Het roesten van ijzer onder aerobe en vochtige omstandigheden (www.aljevragen.nl)	1
Figuur 2: Verschillende methoden van elektrontransfer van ijzerpartikel naar micro-organisme. De indirecte methodes via H ₂ vorming door elektrolyse van water of via een mediator ofwel elektron shuttle. De directe methode via elektronopname aan het ijzerpartikel.	3
Figuur 3: Schematische voorstelling van ijzercorrosie onder anaerobe omstandigheden door SRB via CMIC (Mori <i>et al.</i> , 2010). I, Oplossen van Fe; II, waterdissociatie; III, protonreductie; IV, sulfaatreductie; V, sulfidevorming.....	5
Figuur 4: Hypothetisch model van Fe(0) corrosie door <i>Prolixibacter</i> sp. MIC1-1. Volle lijnen: biotische stappen, stippellijnen: abiotische stappen (Iino <i>et al.</i> , 2015).	7
Figuur 5: Acetyl-CoA Wood-Ljungdahl pathway gebruikt door acetogene bacteriën (Drake <i>et al.</i> , 2008). Afkortingen: H ₄ F = tetrahydrofolaat, HSCoA = coenzyme A, P ₁ = anorganisch fosfaat, Co-Protein = corrinoid enzym, ATP = adenosine 5'-triphosphate.	10
Figuur 6: Mogelijke elektrondonors en elektronacceptoren van acetogene bacteriën (Drake <i>et al.</i> , 2008).	11
Figuur 7: Geproduceerde metabolieten door de aangerijkte culturen. (A) Generatie van Fe(II) uit Fe(0) granulen door de aangerijkte culturen en de abiotische controles. (B) Generatie van H ₂ in de abiotische controles met Fe(0) granulen. (C en D) Acetaat, CH ₄ en H ₂ productie in de aanwezigheid van Fe(0). (C) Fe(0) + BES. (D) Aanrijkingen. (Kato <i>et al.</i> , 2015).....	12
Figuur 8: Overzicht van microbiële electrosynthese. De oranje vormen op de kathode geven de bacteriën weer.	14
Figuur 9: Opduiken van milieustalen in Coupure ter hoogte van de Hospitaalstraat op 12 november 2015.	21
Figuur 10: H ₂ productie van de abiotische proefopstellingen met verschillende media. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=3. De datapunten zijn het gemiddelde van 3 replicaten.	27
Figuur 11: Productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat in meq/L op dag 7 van het experiment bij Fe + <i>C. ljungdahlii</i> , Fe abiotisch, geen Fe abiotisch, geen Fe + <i>C. ljungdahlii</i> en <i>C. ljungdahlii</i> + H ₂ headspace. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=2.	28
Figuur 12: Productie van H ₂ (meq/L) gedurende 55 dagen. De foutvlaggen stellen de standaarddeviatie voor met n=2.	29
Figuur 13: Productie van H ₂ en acetaat (meq/L) gedurende 55 dagen. De foutvlaggen stellen de standaarddeviatie voor met n=2. De gehalte aan acetaat bij <i>C. ljungdahlii</i> + H ₂ in de headspace is op dag 1 gelijk aan 188,82 meq/L en op dag 7 gelijk aan 213,95 meq/L.	29
Figuur 14: Productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) bij Fe + <i>S. sphaeroides</i> , Fe abiotisch, geen Fe abiotisch geen Fe + <i>S. sphaeroides</i> en <i>S. sphaeroides</i> + H ₂ in headspace op dag 155 van het experiment. De standaarddeviatie wordt berekend met n=3 voor Fe + <i>S. sphaeroides</i> , Fe abiotisch en n=2 voor geen Fe abiotisch, geen Fe + <i>S. sphaeroides</i> en <i>S. sphaeroides</i> + H ₂ in headspace.	30
Figuur 15: Productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) na 28 dagen incubatie bij 15°C. De standaarddeviatie (n=2) wordt weergegeven aan de hand van de foutvlaggen.	32
Figuur 16: Totale productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat in meq/L gedurende het volledige experiment bij incubatie op 15°C startende van pH 6 of pH 7. De standaarddeviatie wordt weergegeven met n=2.	32
Figuur 17: De totale productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) op dag 26 bij incubatie bij 28°C. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=2, behalve bij de spaak waar n=1.	33

Figuur 18: De totale productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) gedurende het volledige experiment bij incubatie bij 28°C. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=2.	34
Figuur 19: Transfer 1: Productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) op dag 55 van het experiment bij zowel pH 6 als pH 7 De incubatie gebeurde bij 28°C. De foutvlaggen zijn de standaarddeviatie met n=2.	35
Figuur 20: Transfer 2: Productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) op dag 43 (met BES) of 47 (zonder BES) bij pH 6 en pH 7. De standaarddeviaties bij Roest + Fe (+ BES) worden berekend met n=2.	36
Figuur 21: De totale productie van zowel H ₂ , CH ₄ als acetaat (meq/L) tijdens het volledige experiment bij incubatie op 28°C. De standaarddeviatie wordt weergegeven met n=2.	37
Figuur 22: Transfer 3: Productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) van transfer 3 na 14 dagen incubatie bij 28°C.	38
Figuur 23: Totale productie van H ₂ , CH ₄ en acetaat in meq/L gedurende het volledige experiment.	38
Figuur 24: Overzicht van de aanrijking van Roest + Fe pH 6. De transfers vonden plaats op dag 35, 71 en 104. Het gehalte aan acetaat wordt weergegeven gedurende het volledige experiment.	39
Figuur 25: Totaal gehalte aan geproduceerde H ₂ , CH ₄ en acetaat (meq/L) in de verschillende proefopzetten. De standaarddeviatie wordt weergegeven met n=2.	40
Figuur 26: (A) Elektronverbruik en productvorming gedurende het experiment voor <i>S. sphaeroides</i> . De resultaten zijn het gevolg van 3 replicaten (Nevin <i>et al.</i> , 2011). (B) Elektronverbruik en productvorming gedurende het experiment voor <i>C. ljungdahlii</i> . De resultaten zijn het gevolg van 3 replicaten (Nevin <i>et al.</i> , 2011).	44

Lijst met tabellen

Tabel 1: Overzicht van de verschillende abiotische opstellingen.	26
Tabel 2: Overzicht van de verschillende proefopstellingen binnen het <i>Clostridium ljungdahlii</i> experiment.	28
Tabel 3: Overzicht van de verschillende opstellingen bij het <i>Sporomusa sphaeroides</i> experiment.	30
Tabel 4: Samenstelling water Coupure op 12/11/2015.	31
Tabel 5: Overzicht van de verschillende opstellingen van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen bij 15°C.....	31
Tabel 6: Overzicht van de verschillende opstellingen van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen bij 28°C.....	33
Tabel 7: Overzicht van de verschillende opstellingen van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen (transfer 1) bij 28°C. De stalen werden opgevolgd (transfer 2 en 3).	34
Tabel 8: Overzicht van de verschillende opstellingen voor het testen van de corrosiesnelheid van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen bij 28°C. Er werden geen abiotische testen uitgevoerd.	40
Tabel 9: Bekomen en verwachte hoeveelheid Fe(II) na 110 dagen incubatie.	41
Tabel 10: vergelijking van de bekomen en verwachte hoeveelheid Fe(II) bekomen na extractie.....	41
Tabel 11: Gemiddelde productiesnelheden (meq/dag) van de opstellingen met BES van transfer 2 gedurende de eerste 14 dagen van het experiment.....	46

Inleiding

Door de groeiende wereldbevolking en de stijgende levensstandaard is er een almaar groter wordende behoefte aan energie. De olievoorraden beginnen te slinken, kerncentrales krijgen meer tegenkanting en de opwarming van de aarde kan al een tijdje niet meer genegeerd worden. Naast het gebruik van alternatieve energiebronnen zoals wind-, water- en zonne-energie wordt ook gezocht naar efficiëntere manieren om de opgewekte energie op te slaan. De bestaande batterijen bieden tot op de dag van vandaag onvoldoende opslagruimte om de energieoverschotten op te slaan om energietekorten te overbruggen. De productie van biobrandstoffen maakt het mogelijk om energie op een eenvoudige manier te transporteren. Een andere mogelijkheid bestaat erin om elektrische energie om te zetten naar chemische energie in de vorm van biobrandstof en andere organische componenten. Dit kan gedaan worden met behulp van micro-organismen, vooral acetogene bacteriën zijn interessant. Hierbij wordt koolstofdioxide omgezet tot acetaat of een andere organische molecule door acetogene bacteriën. De omzetting van koolstofdioxide naar acetaat is een natuurlijk fenomeen dat voorkomt onder anaerobe condities. Deze acetogene bacteriën leven voornamelijk op corroderende oppervlakken. De grote hoeveelheden koolstofdioxide die geproduceerd worden in de industrie, zouden op deze manier hergebruikt kunnen worden. Naast het rechtstreekse gebruik van acetaat wordt acetaat ook gebruikt als grondstof voor de productie van andere organische moleculen zoals melkzuur.

Deze omzetting van elektrische energie naar chemische energie zou niet alleen stroomtekorten helpen overbruggen, het is ook een ecologisch en ethisch verantwoorde manier om biobrandstof te maken. Tegenwoordig gaat de productie van biobrandstof gepaard met de productie van voedingsgewassen die op hun beurt niet kunnen gebruikt worden voor menselijke consumptie. Microbiële electrosynthese biedt de mogelijkheid om biobrandstof te produceren zonder gebruik te maken van landbouwgronden en voeding. Deze vorm van energie omzeilt de schadelijke milieueffecten die gepaard gaan met intensieve landbouw en het energieverlies die nodig is voor de productie van tussenproducten.

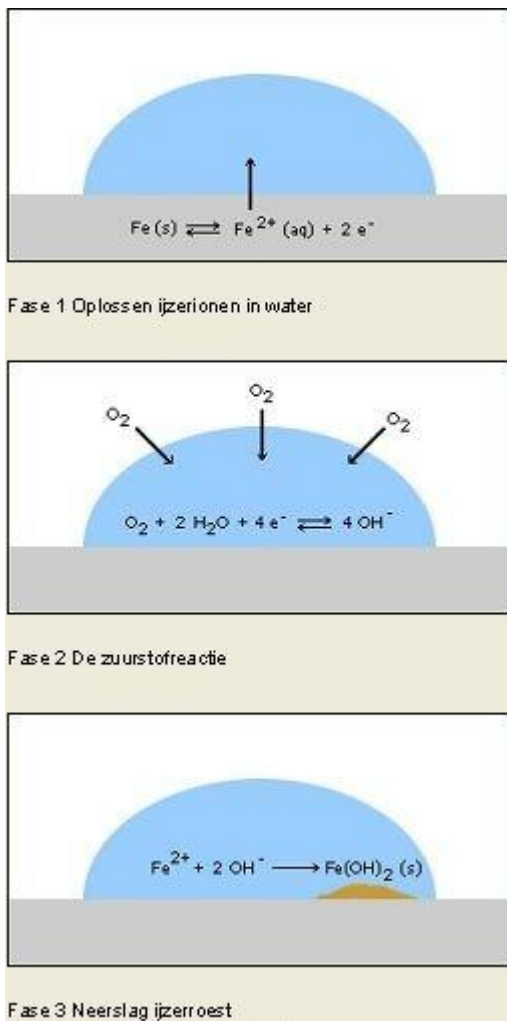
De meeste studies maken gebruik van waterstof als elektrondonor voor de aanrijking of isolatie van acetogene culturen. Indien deze bacteriën later gebruikt worden voor microbiële electrosynthese (MES) kan de overgang naar een vaste elektrondonor moeilijkheden met zich meebrengen. Hierom wordt in dit onderzoek gebruik gemaakt van $\text{Fe}(0)$ als enige elektrondonor waardoor de overgang naar MES vlotter zou kunnen verlopen.

Literatuurstudie

Deel 1: Microbiële corrosie

1. Corrosie

Corrosie is het chemisch oxideren van metalen door elementen uit de omgeving. Dit gaat gepaard met de omzetting van het metaal in een oxide, hydroxide of zout. Corrosie kan verschillende vormen aannemen. De indeling kan gebeuren op basis van de aard en de omgevingscondities (droge of natte corrosie, aeroob of anaeroob) of het mechanisme verantwoordelijk voor corrosie (direct of indirect, abiotisch of biotisch) (Gellings *et al.*, 1985).



Figuur 1: Het roesten van ijzer onder aerobe en vochtige omstandigheden (www.aljevragen.nl)

De best gekende vorm van corrosie is natte corrosie onder aerobe omstandigheden. Het metaal wordt aangetast in een waterig milieu of door een vochtfilm in aanwezigheid van zuurstof. Dit proces omvat drie stappen (Figuur 1). In een eerste fase gaat ijzer in oplossing door de vorming van Fe(II). De elektronen blijven aanwezig in het metaal waardoor deze een negatieve lading krijgt. In een tweede fase worden hydroxylgroepen gevormd door de reductie van zuurstof. Als laatste fase reageren de eerder gevormde ijzerionen met de hydroxylgroepen tot ijzerhydroxiden en ijzeroxiden. Fe(II) is onstabiel onder aerobe omstandigheden waardoor deze verder geoxideerd worden naar Fe(III). De gekende bruine roestkleur is afkomstig van de gevormde Fe(III)oxides en hydroxides, die typisch neerslaan.

Metalen kunnen ook aangetast worden door een gas, zoals bijvoorbeeld zuurstof, in droge condities. Op het metaaloppervlak wordt dan een metaaloxide gevormd. Deze vorm van corrosie gaat enkel door bij hoge temperaturen.

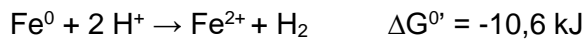
Anaerobe corrosie is het proces waarbij metalen corroderen onder anaerobe omstandigheden. Deze vorm van corrosie verloopt zeer traag (lage ΔG). De Gibbs vrije energie (ΔG) is een thermodynamische

eigenschap die de maximale hoeveelheid nuttig werk dat kan verricht worden uit een specifieke chemische reactie of de minimale hoeveelheid werk die moet geleverd worden om een specifieke chemische reactie te laten verlopen, weergeeft. Indien de Gibbs vrije energie negatief is, verloopt de reactie spontaan. Wanneer de Gibbs vrije energie een positieve waarde aanneemt, moet extra energie worden toegevoegd om de reactie te laten verlopen. In de

afwezigheid van zuurstof, worden protonen afkomstig van de dissociatie van water gebruikt als elektronacceptor. Fe(0) wordt geoxideerd naar Fe(II) (anodische reactie) (1) met vorming van H₂ (kathodische reactie) (2).



Met E₀' ten opzichte van de standaard waterstofelektrode (SHE).



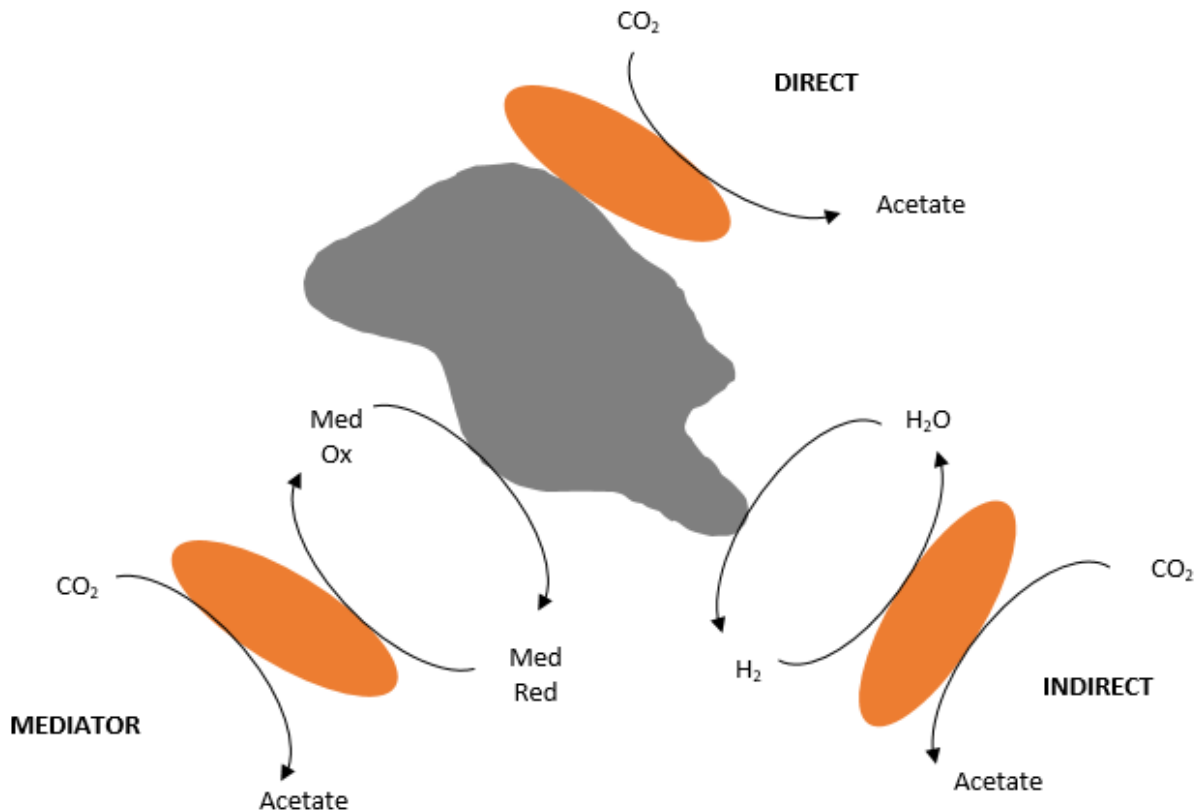
Het gevormde Fe(II) slaat meestal neer (vb. als FeCO₃) waardoor de concentratie van Fe(II) laag blijft (Enning *et al.*, 2014).

De economische impact van corrosie is niet te onderschatten. Zo goed als alle voorzorgen die genomen worden tegen het vormen van corrosie brengen extra kosten met zich mee. Vele industriële sectoren zoals bijvoorbeeld de olie-, auto- en vliegtuigindustrie, de scheepvaart, hebben grote kosten door toedoen van corrosie. Indien men enkel rekening hoefde te houden met het fabricageproces en de sterkte van het materiaal zou men in vele gevallen kiezen voor ongelegeerd staal. Door de snelle aantasting van het staal is deze optie bijna onmogelijk. Corrosievrije legeringen zijn echter duur. Hierdoor wordt bij vele materialen die op grote schaal gebruikt worden gewerkt met materialen die toch enigszins aan corrosie onderhevig zijn, bijvoorbeeld 12% Cr-staal en 25% Cr, 20% Ni-staal. Bij het berekenen van de corrosiekosten wordt onderscheid gemaakt tussen directe en indirecte kosten. De directe kosten zijn de kosten die gepaard gaan met onderhoud en inspectie, het toepassen van beschermingsmethoden, vervangen van constructies en het toepassen van duurdere constructiematerialen. Onder indirecte kosten worden verstaan de kosten voor het stilleggen van de installatie tijdens reparaties of onderhoud (productieverlies), verlies van product door lekkages, verlies aan nuttig effect van de installatie, verontreiniging en dus onbruikbaarheid van producten, ... De jaarlijks wereldwijde kosten van corrosie worden geraamd op 3% van de BBP van de wereld, wat ongeveer neerkomt op € 1 930 117 miljoen. (<http://www.nace.org/uploadedFiles/Publications/ccsupp.pdf>). Andere bronnen spreken zelfs van 4 à 5% (Gellings *et al.*, 1987). Hiernaast mag ook niet vergeten worden dat vervanging van materialen veel grondstoffen en energie vergt. Corrosiebestrijding is dus één van de middelen om tot een energie- en grondstofbesparing te komen. Het falen van installaties en/of voertuigen brengt verder ook schade aan het milieu en de mens met zich mee.

Corrosie kan versterkt worden door micro-organismen. Biocorrosie is een complex type van omgevingsgeassisteerde corrosie. Dit fenomeen wordt verder besproken in het volgende onderdeel. Deze vorm van corrosie komt voor op verschillende metalen en legeringen zoals ijzer, staal, koper, titanium (Roa *et al.*, 2012). Ongeveer 10% van de schade aangebracht door corrosie is afkomstig van microbiële activiteit (Ushiyama *et al.*, 2010). Het aandeel van biocorrosie in de schade veroorzaakt door anaerobe corrosie is nog hoger. De schade aangericht door biocorrosie op brandstofpijpleidingen loopt jaarlijks op tot 2 miljard US\$ (Koch *et al.*, 2002).

2. Mechanismen van microbiële corrosie (biocorrosie)

Biocorrosie is het fenomeen waarbij micro-organismen chemische corrosie versnellen. Het fenomeen vindt vooral plaats onder anoxische omstandigheden. Verschillende micro-organismen zijn hiervoor verantwoordelijk zoals sulfaatreducerende, nitraatreducerende en acetogene bacteriën en methanogenen (Lee *et al.*, 2003).



Figuur 2: Verschillende methoden van elektrontransfer van ijzerpartikel naar micro-organisme. De indirecte methodes via H₂ vorming door elektrolyse van water of via een mediator ofwel elektron shuttle. De directe methode via elektronopname aan het ijzerpartikel.

Biocorrosie kan via verschillende mechanismen plaatsvinden, nl. corrosie via mediëring, via een directe elektrische methode en via een indirecte chemische methode (Figuur 2; Enning *et al.*, 2014).

Bij 'chemically microbially influenced corrosion' (CMIC) worden anorganische componenten (o.a. FeS en H₂S) gevormd die verantwoordelijk zijn voor corrosie. Intracellulaire oxidatie van organische componenten door bijvoorbeeld sulfaatreducerders is gekoppeld aan de generatie van deze (an)organische componenten. Wanneer deze componenten diffunderen uit de cel reageren ze met het aanwezige Fe(0). In eerste instantie wordt de anodische reactie gestimuleerd waardoor de reactie aan het metaaloppervlak sneller doorgaat. Wanneer het ijzeroppervlak bedekt is met de (an)organische componenten, wordt de kathodische reactie belangrijker (Enning *et al.*, 2014).

Abiotische corrosie in anaerobe condities leidt tot de vorming van waterstof. Dit waterstof wordt op zijn beurt gebruikt door verschillende groepen micro-organismen. De vorming van waterstof

is een indirecte methode maar aangezien de abiotische vorming van waterstof een traag proces is, leidt deze methode waarschijnlijk niet tot een versnelling van corrosie (Enning *et al.*, 2014).

Biocorrosie via mediëring is een ander indirect mechanisme. Hierbij worden verschillende elektro-actieve componenten en elektronshuttles ingezet als elektrondonor of elektronacceptor. De micro-organismen maken van deze mediators gebruik bij de corrosie van ijzer. De mediators kunnen geproduceerd worden door de bacterie (vb. riboflavine, pyocyanine) maar kunnen ook natuurlijke verbindingen (vb. cobalt sepulchrates) of artificiële componenten (vb. methyl viologen) zijn.

'Electrical microbially influenced corrosion' (EMIC) gaat gepaard met het verwijderen van elektronen zonder vorming van tussenproducten. De onttrokken elektronen worden onmiddellijk opgenomen in het metabolisch proces van de bacterie. De trage abiotische vorming van waterstof wordt omzeild waardoor de corrosie sneller verloopt. Deze directe manier is nog niet volledig opgehelderd maar zou het meest efficiënt en snelst kunnen zijn.

Dit mechanisme gaat gepaard met de vorming van grote hoeveelheden anorganische corrosieproducten. Volgens Enning *et al.* (2012) is slechts 4% (wt/wt) van deze corrosieproducten biomassa. De overige producten zijn anorganische Fe(II) mineralen en andere neergeslagen producten.

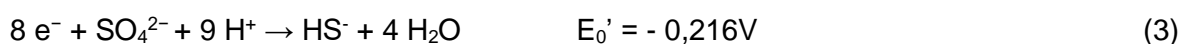
3. Micro-organismen betrokken bij microbiële corrosie

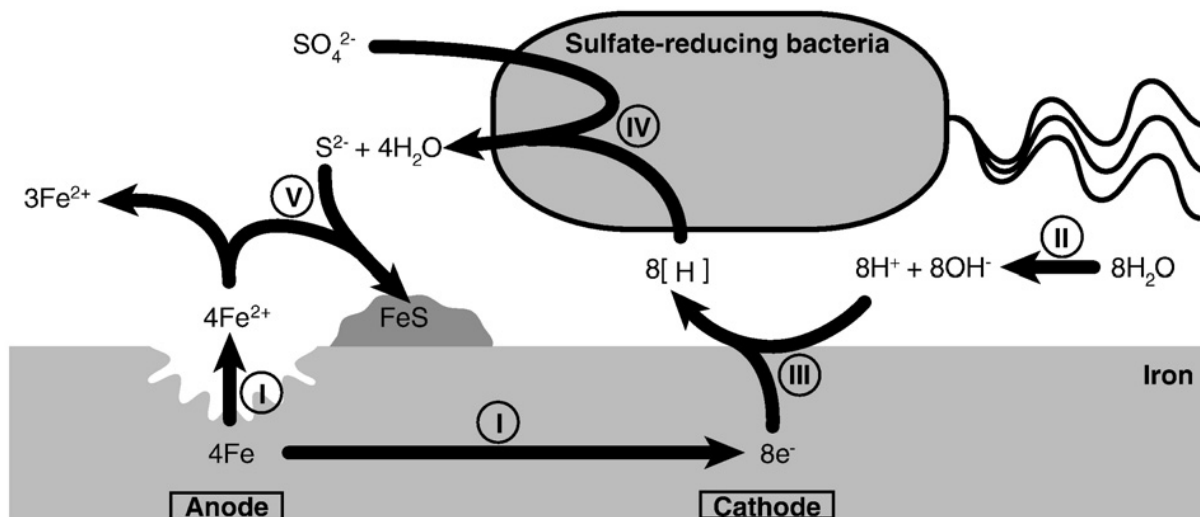
3.1 Sulfaatreducerders

Sulfaatreducerende bacteriën (SRB) zijn de best onderzochte micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor corrosie. Twee verklaringen staan hiervan aan de basis. In eerste instantie vindt in anoxische sulfaatrijke middelen veel corrosie plaats. Ten tweede produceren sulfaatreducerende bacteriën grote hoeveelheden sulfiden die op hun beurt geassocieerd worden met anaerobe corrosie (Enning *et al.*, 2014).

Twee vormen van corrosie worden toegepast door sulfaatreducerende bacteriën, nl. CMIC en EMIC (Enning *et al.*, 2014). De verschillende mechanismen worden voorgesteld in Figuur 3.

CMIC bij SRB gaat gepaard met de reductie van sulfaat tot waterstofsulfide onder anaerobe omstandigheden. De benodigde elektronen zijn afkomstig van organische moleculen (vb. suikers, lactaat,...) of waterstof dat aanwezig is door fermentatiereacties in bodems en sedimenten. Deze intracellulaire reductie zorgt voor de vorming van sulfiden. Alle sulfaatreducerende bacteriën zorgen voor de productie van waterstofsulfide waardoor ze indirect instaan voor anaerobe corrosie.





Figuur 3: Schematische voorstelling van ijzercorrosie onder anaerobe omstandigheden door SRB via CMIC (Mori *et al.*, 2010). I, Oplossen van Fe; II, waterdissociatie; III, protonreductie; IV, sulfaatreductie; V, sulfidevorming.

Het indirect mechanisme via waterstof verloopt waarschijnlijk trager dan wanneer een direct mechanisme gebruikt wordt. Mori *et al.* (2010) toont aan dat de waterstofconsumerende micro-organismen (behalve *M. maripaludis* Mic1c10) geen aanzienlijk verschil in corrosie weergeven in vergelijking met de abiotische controle.

Niet alle SRB groeien even snel wanneer ijzer de enige elektrondonor is als wanneer ook waterstof voorhanden is. Snelgroeïende SRB die leven op ijzer kunnen specifieke enzymen bezitten die in staat zijn om elektronen te onttrekken van ijzer (Uchiyama *et al.*, 2010).

Dinh *et al.* (2004) isoleerden stam IS4 (*Desulfobacterium*) en IS5 (*Desulfovibrio*). De aanrijking gebeurde met ijzer als enige elektrondonor en zeesediment als inoculum. Hierbij werd enkel IS5 aangerijkt in aanwezigheid van acetaat als koolstofbron. Een derde stam, HS2 (*Desulfovibrio*) werd aangerijkt met een waterstofrijke, acetaatbevattend medium. Om de directe corrosie van Fe(0) te meten werd de sulfaatreductie gevolgd. De sulfaatreductie bij stam IS5 was tweemaal trager dan stam IS4, maar sneller dan bij HS2. De hoge graad en snelheid van sulfaatreductie door de stammen IS4 en IS5 kan niet verklaard worden door een meerconsumptie van chemisch gevormd waterstof. Bij de culturen met stam IS4 was het gehalte aan geaccumuleerd waterstof hoog. Hierdoor kan waterstof geen limiterende component zijn. De hoge snelheid van sulfaatreductie laat vermoeden dat de micro-organismen gebruik maken van een efficiëntere manier. Een mogelijke verklaring is een elektronopname via celoppervlak geassocieerde redox-actieve componenten. Hierdoor kan Fe(0) sneller gebruikt worden voor de reductie van sulfaat.

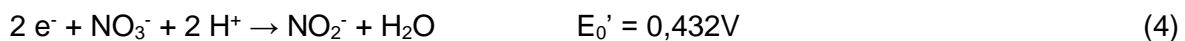
Zoals gesuggereerd door Dinh *et al.* (2004) is EMIC het proces waarbij de sulfaatreducerende bacteriën ijzer onmiddellijk gebruiken als elektrondonor door een directe opname van elektronen via oxidatie van ijzer onder anaerobe omstandigheden. Hierdoor wordt geen waterstof gevormd waardoor de corrosie sneller doorgaat. Door EMIC ontstaat op het ijzer een zwarte korst. Deze korst vormt geen probleem voor verdere corrosieprocessen omdat deze een grote conductiviteit vertoont waardoor sulfaatreducerende bacteriën, aanwezig op het

oppervlak, ook kunnen instaan voor het verder corroderen van het ijzer. De elektronen migreren van het ijzer doorheen de korst naar de sulfaatreducerende bacteriën (Enning *et al.*, 2012).

3.2 Nitraatreduceerders

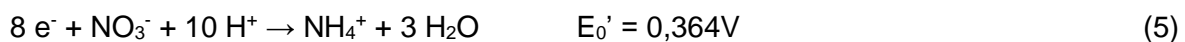
lino *et al.* (2015) toonden aan dat *Prolixibacter* sp. onder anaerobe omstandigheden Fe(0) oxideren naar zowel Fe(II) als Fe(III) met de vorming van FePO₃ en FeCO₃. Hiervoor werd *Prolixibacter* sp. geïsoleerd uit ruwe olie afkomstig uit Akita, Japan. Hierbij werd 0,5 mL staal opgegroeid in Sw medium en enkele malen getransfereerd zodat *Prolixibacter* geïsoleerd kon worden.

Volgende reactie (4) gaat door voor de oxidatie van Fe(0) naar Fe(II) met vorming van nitriet.



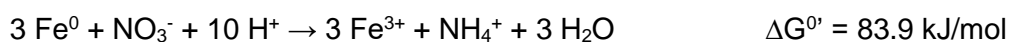
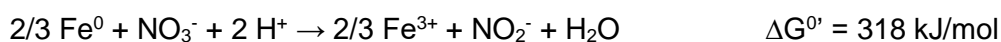
Via verdere oxidatie wordt Fe(III) bekomen.

De mogelijkheid bestaat er ook in dat ammonium gevormd wordt in plaats van nitriet (Cheng *et al.*, 1997).



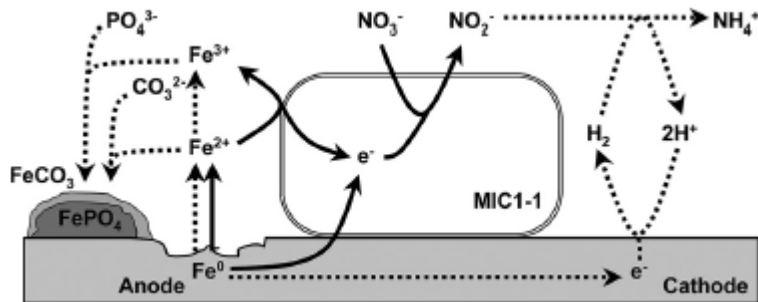
Rakshit *et al.* (2005) toont aan dat Fe²⁺ met behulp van nitraat kan geoxideerd worden naar Fe³⁺ met de vorming ammoniumionen.

Samengevat verloopt de reductie van nitraat tot nitriet of ammonium en de oxidatie van Fe(0) naar Fe(III) als volgt:



De nitraatreduceerders omvatten een grote hoeveelheid aan micro-organismen. Sommige NRB, waterstoflievende bacteriën, oxideren Fe(0) om nitraat om te vormen tot nitriet met behulp van waterstof als elektrondonor, waardoor een indirecte stimulatie ontstaat voor de corrosie van Fe(0). Andere NRB, zoals *Prolixibacter* sp. doen aan directe stimulatie van ijzercorrosie door opname van elektronen van het elektrodeoppervlak. Deze bacteriën kunnen geen waterstof gebruiken maar hun corrosie is zes keer sneller dan de abiotische waterstofproductie. *Prolixibacter* sp. MIC1-1 is in staat om Fe(0) te oxideren in de aanwezigheid van citraat of een andere koolstofbron. Er moet opgemerkt worden dat de aanwezigheid van nitraat (als elektronacceptor) verplicht is (lino *et al.*, 2015). Het gehalte aan ijzer dat verbruikt werd door het micro-organisme is zes maal groter dan bij de aseptische controle. Andere species binnen het genus *Prolixibacter* (o.a. *P. bellavariivorans* JCM 13498^T) zijn niet in staat om Fe(0) te oxideren. Hierbij verloor het metaaloppervlak zijn glans niet. Er ontstond wel een vorming van FePO₄ op het oppervlak, bedekt met FeCO₃. Er kan dus besloten worden dat het gebruik van Fe(0) als elektrondonor geen algemeen kenmerk is voor

het genus (Iino *et al.*, 2015). Het aantal mol ijzer verbruikt door *Prolixibacter* sp. MIC1-1 komt overeen met 2/3 van gehalte aan Fe(0) verbruikt door *Methanococcus maripaludis* KA1 (Uchiyama *et al.*, 2010) en 1,8 maal dat van *Mariprofundus* sp. stam GSB2 (McBeth *et al.*, 2011).



Figuur 4: Hypothetisch model van Fe(0) corrosie door *Prolixibacter* sp. MIC1-1. Volle lijnen: biotische stappen, stippellijnen: abiotische stappen (Iino *et al.*, 2015).

Een eerste mogelijkheid die de corrosie van Fe(0) door waterstoflievende NRB verklaart is via het indirect mechanisme met waterstofproductie (kathodische depolarisatie). Ten tweede stimuleren waterstoflievende NRB de corrosie van Fe(0) door de productie van nitriet (CMIC). *Prolixibacter* sp. MIC1-1 behoort

niet tot de waterstoflievende NRB. Hierdoor is het mogelijk dat het micro-organisme via een directe methode Fe(0) corrodeert door directe opname van elektronen van het kathodeoppervlak (Figuur 4) (Iino *et al.*, 2015).

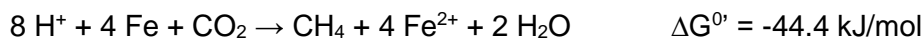
3.3 Methanogenen

Methanogene archaea komen in grote aantallen voor in anaerobe ecosystemen. De meest voorkomende elektrondonor voor methanogenen is waterstof. Hierdoor ontstaat volgende reactie voor de productie van methaan.



Onder abiotische anaerobe omstandigheden worden elektronen afkomstig van het ijzer gebruikt om waterstofgas te produceren met behulp van protonen afkomstig uit water (Daniels *et al.*, 1987).

Een andere, biotische mogelijkheid bestaat erin om Fe(0) direct te gebruiken als elektrondonor waardoor volgende reactie doorgaat:



Dinh *et al.* (2004) deden onderzoek naar methanogenen en hun functie in ijzercorrosie. Culturen uit sediment afkomstig uit de Noordzee nabij Wilhelmshaven werd opgevoed onder anaerobe condities bij 28°C in anoxisch zeewatermedium met 0,1 mM sulfaat. Ijzergranules werden toegevoegd als enige elektrondonor. De productie van methaan verloopt sneller bij het geïsoleerde *Methanobacterium*achtige archaea waarbij Fe(0) verbruikt wordt dan bij waterstofverbruikende methanogenen. Hierdoor wordt een directe elektronopname eerder gesuggereerd dan een indirecte waterstofconsumptie. Stam IM1, die gelijkenissen vertoont met zowel *Methanobacterium* als *Methanobeivibacter* groeit traag met waterstof en

koolstofdioxide in de afwezigheid van Fe(0). Indien Fe(0) aanwezig is wordt de methaanproductie opgedreven. Dit ging gepaard met het gebruik van waterstofgas gevormd aan de kathode (4 mol H₂ voor 1 mol CH₄) (Dinh *et al.*, 2004).

Mori *et al.* (2010) isoleerden verschillende methanogenen uit de genera *Methanococcus*, *Methanoplanus* en *Methanobacterium* uit olie-installaties. De isolatie gebeurde met behulp van waterstof als elektrondonor. Er werd geconcludeerd dat *Methanococcus maripaludis* Mic1c10 Fe(0) corrodeert onafhankelijk van het aanwezige waterstof. Wanneer waterstof al aanwezig was door auto-oxidatie van ijzer, werd dit gebruikt door de micro-organismen. Hierdoor wordt de vorming van een tussenproduct, een hydrogenase gesuggereerd dat het aanwezige ijzer corrodeert. De corrosie zal waarschijnlijk niet tot stand gekomen zijn door de productie van zuren. Hiervoor veranderde de zuurtegraad van het HEPES-gebufferde medium niet genoeg. (Mori *et al.*, 2010).

Uchiyama *et al.* deden in 2010 onderzoek naar 2 verschillende stammen van *Methanococcus maripaludis*, nl. de nieuw geïsoleerde KA1 en gekende JJ^T. Deze stammen werden bekomen via een sludge sample afkomstig uit een tank ruwe olie. Deze studie toont aan dat stam KA1 een hoge capaciteit vertoont op het vlak van ijzercorrosie. Dit in tegenstelling tot de gekende stam JJ^T, die niet corrosief is. Stam JJ^T toont grote gelijkenissen in vergelijking met de controle. De hoeveelheid cellen van stam JJ^T kent een kleine toename en er is een productie van methaan. Toch verloopt de omzetting van Fe(0) naar Fe(II) aan dezelfde snelheid als bij de controle. De methaanproductie en aangroei van de populatie kan dus een gevolg zijn van het gebruik van waterstof gegenereerd door abiotische oxidatie van ijzer. Stam KA1 vertoont een hogere productie van methaan. Het celgehalte lag 40 maal hoger dan dat van stam JJ^T. De productie van Fe(II) uit Fe(0) was een achtvoud van stam JJ^T en de controle. Indien enkel Fe(0) gebruikt wordt als elektrondonor verloopt volgende reactie: $8\text{H}^+ + 4\text{Fe} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 4\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$. Uchiyama *et al.* ondervonden dat deze stoichiometrische vergelijking enkel toepasbaar is op stam JJ^T. Stam KA1 produceerde een lagere hoeveelheid Fe²⁺. Dit kan mogelijk verklaard worden door de vorming van een neerslag (FeCO₃) op het oppervlak van de ijzergranulen. Uchiyama *et al.* besluiten dat de groei van stam JJ^T in de aanwezigheid van Fe(0) berust op het gebruik van abiotisch geproduceerde waterstof. Maar deze consumptie is niet groot genoeg om ijzer te corroderen. De mogelijkheid bestaat erin dat KA1 een mechanisme bezit om elektronen te onttrekken aan de kathode of aan Fe²⁺ door vorming van FeCO₃ waardoor het evenwicht van de reactie verschoven wordt (Uchiyama *et al.*, 2010).

Het wildtype MM901 (*Methanococcus maripaludis*) vormt 10 maal sneller methaan in aanwezigheid van Fe(0) dan de abiotische controles (Lohner *et al.*, 2014). Indien gewerkt werd met de gemanipuleerde stam MM1284 die alle katabolische en een anabolisch hydrogenase mist, is de methaanproductie meer dan 1 orde lager in vergelijking met het wildtype MM901. Deze resultaten wijzen op een hydrogenase afhankelijk mechanisme met betrekking tot elektronopname bij *M. maripaludis* (Lohner *et al.*, 2014).

Volgens onderzoek uitgevoerd door Deutzmann *et al.* (2015) is een indirecte elektronopname mogelijk door de aanwezigheid van enkele redox-actieve enzymen zoals hydrogenase en formaathydrogenase die de vorming van kleinere componenten katalyseren. Deze componenten, zoals H₂ of formaat functioneren op hun beurt als oplosbare elektrondonors binnen het microbieel katabolisme. De redox-actieve enzymen kunnen voorkomen in het medium, worden geadsorbeerd of interageren met de kathode. Het methanogene micro-organisme *M. maripaludis* vertoont een elektronopname met behulp van een hydrogenase-afhankelijk mechanisme (Deutzmann *et al.*, 2015). Deutzmann *et al.* test de corrosie door te kijken naar het gebruikte medium waarin de redox-actieve enzymen zich bevinden. Er werd duidelijk dat een versnelling met waterstof plaatsvond.

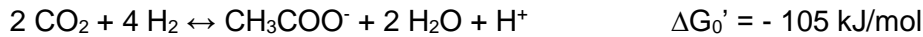
3.4 Andere: *Geobacter*

Geobacter species zijn in staat om organische componenten te oxideren tot de vorming van koolstofdioxide met tussenkomst van extracellulaire elektronacceptoren zoals Fe(III) en Mn(IV). De mogelijkheid van *Geobacter* species om elektronen uit te wisselen met elektroden biedt verschillende mogelijkheden in de productie van bio-energie en bioremediatie (Bond & Lovley, 2003). *Geobacter sulfurreducens* maakt gebruik van cytochromen als condensatoren zodat respiratie in afwezigheid van exogene elektronacceptoren kan doorgaan. Vooral het gebruik van microbiële nanowires (pilusstructuren) voor extracellulaire elektrontransfer en de vorming van conductieve biofilms biedt grote mogelijkheden in de electrosynthese (zie deel 2) (Lovley *et al.*, 2011).

Mehanna *et al.* (2009) toont aan dat in aanwezigheid van *G. sulfurreducens* de potentiaal van roestvrij staal t.o.v. een Ag/AgCl-elektrode stijgt van 840±80 mV naar 1009±20 mV. In een medium met een laag gehalte aan elektrondonoren kan *G. sulfurreducens* elektronen opnemen van staal met een potentiaaltoename van 443 mV. Hierdoor is het risico op corrosie groter. De corrosie-activiteit van *G. sulfurreducens* hangt sterk af van de ouderdom van de opgebouwde biofilm (Mehanna *et al.*, 2009). Hiernaast werd ook onderzoek gedaan naar het effect van *G. sulfurreducens* op verschillende soorten staal. Er wordt gewerkt met 'mild steel', 'ferritic stainless steel' en roestvrij staal. De verandering in potentiaal hangt de eerste uren voornamelijk af van de hoeveelheid bacteriën maar de finale potentiaal wordt vooral gekenmerkt door het soort staal. De mogelijkheid van *G. sulfurreducens* biofilms om acetaat te oxideren bij hoge potentiaal, verandert het gedrag van de gevormde biofilm. Hierdoor vertraagt de vorming van putcorrosie en treedt repassivatie sneller op. Mehanna *et al.* demonstreerde dus dat *G. sulfurreducens* een grote rol speelt in de controle van het elektrochemisch gedrag bij verschillende soorten staal, die verschillende mechanismen vertonen bij verschillende potentialen. Bij minder gelegeerd staal wordt het corrosiegedrag veranderd en bij gelegeerd staal wordt de resistentie tegen putcorrosie verminderd (Mehanna *et al.*, 2009).

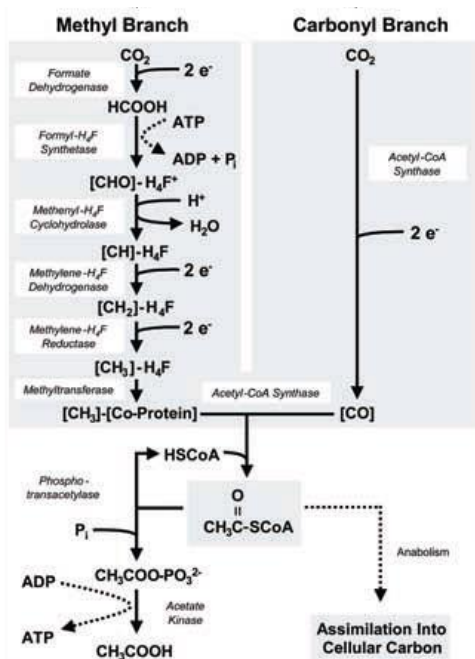
3.5 Acetogene bacteriën

Acetogene bacteriën maken gebruik van de Wood-Ljungdahl pathway voor de reductie van koolstofdioxide en de vorming van acetaat. Hierbij wordt typisch H₂ gebruikt als elektrondonor (Ragsdale & Pierce, 2008).



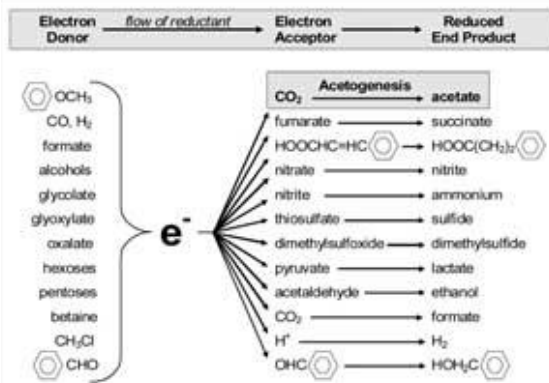
Acetogenen zijn anaerobe micro-organismen die verspreid zijn over 22 verschillende genera. Het is een uiteenlopende soort met verschillende morfologische, nutritionele en fysiologische kenmerken.

De Wood-Ljungdahl pathway (Figuur 5) is een reductief proces waarbij koolstofdioxide gefixeerd wordt. De Wood-Ljungdahl pathway bestaat uit twee delen waarbij Wood focuste op de vorming van carbonyl uit koolstofdioxide terwijl Ljungdahl zich concentreerde op de reductie van koolstofdioxide tot de vorming van een methyleenheid. Deze twee eenheden smelten samen tot de vorming van acetyl-CoA. Acetyl-CoA synthase katalyseert de synthese van acetyl-CoA en de reductie van CO₂ naar CO (Drake *et al.*, 2008). Acetogene bacteriën hebben zeer diverse omgevingen waardoor de acetyl-CoA pathway aangepast is zodat de bacterie in al deze verschillende omgevingen kan overleven.



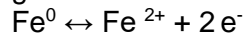
Zoals eerder vermeld is er een grote diversiteit binnen de acetogenen. Hierdoor maken ze gebruik van een brede range van elektrondonors en elektronacceptoren (Figuur 6). Acetogene bacteriën zijn hierdoor in staat om verschillende biologische cyclussen te koppelen. Sommige terminale elektronacceptoren kunnen gelijktijdig gebruikt worden. Naast acetaat kunnen acetogenen een heel gamma aan eindproducten voortbrengen (Drake *et al.*, 2008).

Figuur 5: Acetyl-CoA Wood-Ljungdahl pathway gebruikt door acetogene bacteriën (Drake *et al.*, 2008). Afkortingen: H4F = tetrahydrofolaat, HSCoA = coenzyme A, P1 = anorganisch fosfaat, Co-Protein = corrinoïd enzym, ATP = adenosine 5'-triphosphate.

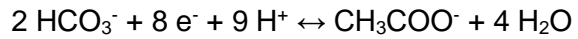


Figuur 6: Mogelijke elektrondonors en elektronacceptoren van acetogene bacteriën (Drake *et al.*, 2008).

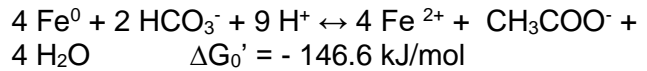
De oxidatie van Fe(0) wordt gekoppeld aan acetogenese waardoor volgende reactie gevormd kan worden (Kato *et al.*, 2015):



$$E_0' = -0.47\text{V}$$



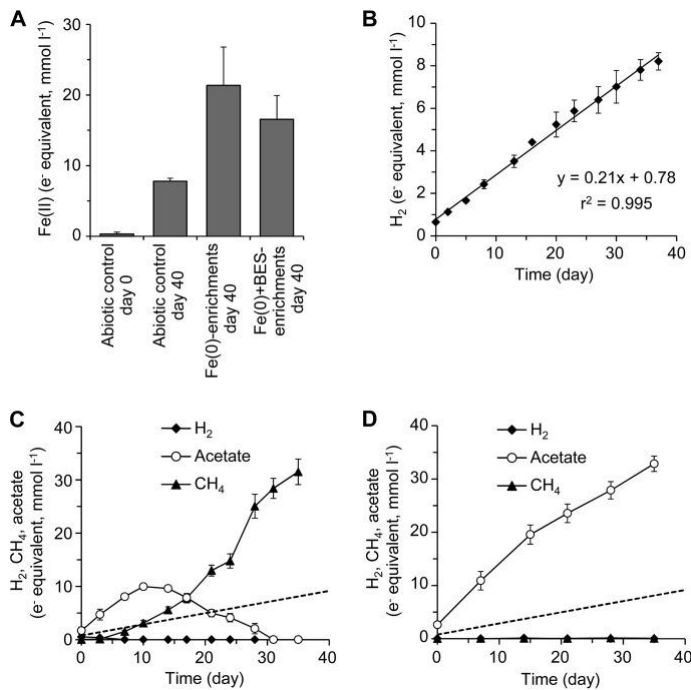
$$E_0' = -0.28\text{V}$$



Sommige acetogene bacteriën kunnen de biocorrosie verrichten onder anaerobe omstandigheden. Kato *et al.* (2015) onderzocht verschillende micro-organismen geïsoleerd uit de

bodem van een rijstveld. Hierbij werd gebruik gemaakt van sulfaatvrij waterig medium waarbij Fe(0) granulen aanwezig waren als enige elektrondonor. Als elektronacceptor was enkel CO₂ en H⁺ beschikbaar. De anaerobe condities werden gewaarborgd door gebruik te maken van een N₂/CO₂ gasatmosfeer. Sommige aanrijkingen werden gedaan in de aanwezigheid van BES om de specifieke aanrijking van acetogenen te bekomen. De productie van CH₄, acetaat en H₂ werd gedurende de cultivatieperiode gemeten. Het werkingsmechanisme die de organismen gebruiken is tot nu toe onbekend. De studie toonde aan dat de groei van micro-organismen, afkomstig van de milieustalen waarbij Fe(0) gebruikt werd als elektrondonor, doorgaat in Fe(0) aanrijkingen. Hierbij worden de meeste reducerende equivalenten gehaald uit Fe(0) oxidatie. Tijdens de eerste 10 dagen was de acetaatproductie het grootste metabolisch proces bij de aanrijkingen zonder BES. Nadien nam de productie van methaan de bovenhand. Wanneer gekeken wordt naar de resultaten van de aanrijking met BES, stijgt de acetaatproductie gedurende het volledige experiment van 40 dagen.

Naast de analyse van milieu-aanrijkingen wordt ook gewerkt met pure culturen. Kato *et al.* toont aan dat de groei van *Sporomusa sphaeroides* mogelijk is wanneer Fe(0) gebruikt wordt als enige elektrondonor. De resultaten geven weer dat er zowel acetaat als H₂ geproduceerd wordt. De studie toonde aan dat het gehalte Fe(II) gegenereerd door *Sporomusa sphaeroides* significant hoger was dan de abiotische controles. Hierdoor kan gezegd worden dat *S. sphaeroides* de mogelijkheid bezit om corrosie te induceren bij het gebruik van Fe(0) als elektrondonor bij acetogenese (Figuur 7).



Figuur 7: Geproduceerde metabolieten door de aangerijkte culturen. (A) Generatie van Fe(II) uit Fe(0) granulen door de aangerijkte culturen en de abiotische controles. (B) Generatie van H₂ in de abiotische controles met Fe(0) granulen. (C en D) Acetaat, CH₄ en H₂ productie in de aanwezigheid van Fe(0). (C) Fe(0) + BES. (D) Aanrijkingen. (Kato *et al.*, 2015).

In tegenstelling tot Kato *et al.*, concludeert Deutzmann *et al.* (2015) dat er geen significante stijging van Fe(0) corrosie waar te nemen is door *Sporomusa sphaeroides*. Een mogelijke verklaring hiervoor is de afwezigheid van een vooraf gemaakte biofilm, die wel in de andere studies aanwezig was (Deutzmann *et al.*, 2015).

Andere bacteriën binnen *Sporomusa* zijn ook onderzocht door Kato *et al.* Na de aanrijking van de milieustalen werden enkele acetogene bacteriën geïsoleerd met Fe(0) als elektrondonor. Stalen van zowel de aanrijking met als zonder BES werden geïnoculeerd in gellan gum-solidified freshwater basal medium met lactaat, ethanol, methanol of H₂/CO₂ als koolstofbron. *Sporomusa sp.* GT1 die een dichte verwantschap bezit met *S. sphaeroides* vertoont gelijklopende resultaten. Daarentegen was de acetaatproductie van *S. ovata* maar iets hoger dan de abiotische corrosie. Een significant verschil voor Fe(II) productie was afwezig volgens Kato *et al.*

Een eenduidige verklaring voor het werkingsmechanisme van acetogenen is er nog niet. Er is zowel sprake van een directe als van een indirecte weg. Bij *Sporomusa sphaeroides* is zowel elektrisch microbiële beïnvloede corrosie als electrosynthese bewezen omdat het gehalte aan Fe(II) significant hoger lag bij dit organisme dan bij de abiotische controle. Daarnaast was het gehalte aan geproduceerde acetaat 8 maal hoger dan bij de abiotische corrosie.

Naast *Sporomusa sp.* worden ook andere acetogenen onderzocht zoals *Acetobacterium carbinolicum* en *Acetobacterium woodii*. Hierbij stelt Kato *et al.* vast dat er geen significante verschillen zijn bij zowel de generatie van Fe(II) als het aantal elektronequivalenten (mmol/L) geproduceerd acetaat ten opzichte van de abiotische controles. Een kleine maar niet significante verhoging van de acetaatproductie is wel waarneembaar. Volgens Kato *et al.* is

hierdoor de groei van *Acetobacterium spp.* op Fe(0) niet mogelijk. Nevin *et al.* (2011) heeft *A. woodii* getest op elektroden en hierbij werd geconcludeerd dat *A. woodii* niet in staat was om elektronen te accepteren van een elektrode. *A. woodii* bezat de mogelijkheid om CO₂ te reduceren met H₂ als elektrondonor in de kathodekamer, maar was niet in staat om te metaboliseren indien H₂ niet voorhanden was.

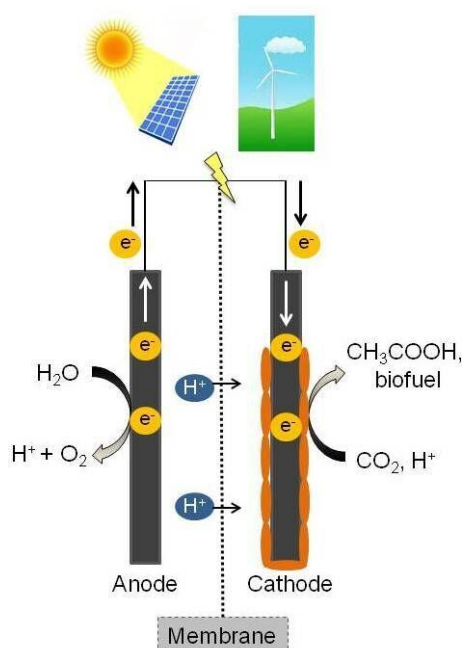
Deel 2: Microbiële electrosynthese

1. Principe

Microbiële electrosynthese (MES) is het proces waarbij micro-organismen gebruik maken van elektronen afkomstig van elektroden om koolstofdioxide te reduceren tot producten bestaande uit meerdere koolstofatomen. Het gebruik van elektroden als elektronacceptor bij micro-organismen is al uitvoerig onderzocht. Het onderzoek omtrent het gebruik van de elektrode als elektrondonor is minder gekend. Eerdere studies toonden aan dat acetaatproductie door *Clostridium ljungdahlii* mogelijk is (Nevin *et al.*, 2011).

Microbiële electrosynthese gaat door in bio-elektrochemische systemen (BES). Deze bestaan uit twee elektroden, de anode en de kathode waaraan respectievelijk de oxidatie en de reductie plaatsvindt, die eventueel gescheiden worden door een membraan. Er zijn twee mogelijke vormen van BES. Microbiële brandstofcellen stellen elektrische energie beschikbaar, terwijl bij microbiële elektrolysecellen stroom wordt toegediend (Rabaey & Rozendal, 2010). De biokatalysatoren (enzymen, organellen of volledige cellen) zijn meestal geïmmobiliseerd op het elektrode-oppervlak.

MES biedt zoals elke techniek verschillende voordelen maar ook enkele nadelen. Een groot voordeel aan het gebruik van MES is dat CO₂ wordt verwijderd en gebruikt wordt voor de productie van verbindingen met een hogere waarde. Met deze techniek wordt elektrische energie omgezet naar chemische energie. Elektriciteitsoverschotten kunnen via deze weg benut worden. Een nadeel van MES is dat voorlopig enkel korte ketenverbindingen geproduceerd worden zoals acetaat, butyraat (Ganigue *et al.*, 2015), butanol (Nevin *et al.*, 2011),...



Figuur 8: Overzicht van microbiële electrosynthese. De oranje vormen op de kathode geven de bacteriën weer.

Electrosynthese kan via verschillende mechanismen gebeuren. Een indirecte methode maakt gebruik van een oplosbare component of een gas (meestal waterstof geproduceerd door elektrolyse van water) om elektronen te transporteren van een elektrode naar het micro-organisme. Thrash en Coates toonden in 2008 aan dat elektroden op een lage potentiaal (-400 mV vs. SHE) waterstof produceren onder abiotische condities. Het geproduceerde waterstof kan door verschillende bacteriën gebruikt worden om koolstofdioxide om te zetten naar acetaat.

Naast het gebruik van waterstof kunnen ook elektron shuttles gebruikt worden bij een indirect mechanisme. Verschillende elektro-actieve componenten zoals quinonen (Thrash *et al.*, 2007) en humuscomponenten (Lovley, 1996, 1999) kunnen dienst doen als elektronshuttles. De micro-

organismen zijn in staat deze componenten te oxideren of te reduceren zonder afbraak. Op deze manier migreren deze componenten constant tussen de elektroden en de micro-organismen en fungeren dus als “shuttles”. Deze mediators kunnen aanwezig zijn in het milieu of worden geproduceerd door het micro-organisme zelf. Eventueel worden ook artificiële mediators toegevoegd aan het milieu (Thrash & Coates, 2008).

Naast een indirecte methode zijn ook aanwijzingen voor het bestaan van een directe methode. Hierbij wordt geen gebruik gemaakt van een mediator of een gas. Er is een directe interactie tussen de elektrode en de micro-organismen. Hierbij wordt een enkele laag van bacteriële cellen waargenomen die zich op het oppervlak van de elektroden bevinden (Thrash & Coates, 2008). Het exacte mechanisme van deze directe oxidatie met behulp van elektroden is nog niet achterhaald.

2. *Geobacter* als modelorganisme

Zoals reeds vermeld bezit *Geobacter* een speciaal mechanisme om elektronen te transporteren. Hierbij maakt het gebruik van microbiele nanowires. Deze pilusstructuren hebben een uitstekend geleidend vermogen. De pili zijn in staat om elektronen te transporteren over een lange afstand (> 1 cm). Het is bekend dat *Geobacter* die zich op de elektroden bevindt, organische componenten kan oxideren met directe elektronentransfer naar de elektroden (Lovley *et al.*, 2012). *Geobacter* kan ook een elektrode als elektronendonor gebruiken tijdens microbiële respiratie of een elektrode gebruiken als elektronacceptor voor de oxidatie van organische componenten naar koolstofdioxide (Lovley *et al.*, 2011). Al deze bevindingen zijn vooral van toepassing op anoden, voor kathoden is de werking nog niet duidelijk.

Geobacter transfereert elektronen naar elektroden via een combinatie van lange afstand elektrontransport door dikke, conductieve biofilms en korte afstand elektrontransfer tussen de conductieve biofilm en de elektrode met behulp van een extracellulair c-type cytochrom. Deze c-type cytochromen dienen als geleiders van elektronen naar de elektronenacceptoren (Bretschger *et al.*, 2010). De directe opname van de elektronen gebeurt met behulp van de cytochromen waarna het transport gebeurt door de pili.

Korte afstand elektrontransfer gebeurt met behulp van cytochromen. *Geobacter sulfurreducens* bezit een breed gamma aan c-type cytochromen. Veel van deze cytochromen zijn gelegen aan de buitenkant van het celmembraan en staan in elektrochemisch contact met de elektroden (Busalmen *et al.*, 2008). Wanneer de cytochromen dicht genoeg tegen de elektrode aanliggen is directe elektrontransfer mogelijk van cytochrom naar elektrode waardoor een elektrische stroom ontstaat (Dumas *et al.*, 2008).

Wanneer gewerkt wordt met een hogere stroomdichtheid kan een multilaag ontstaan aan de elektrode om bij te dragen aan de stroomproductie. De cellen zijn op deze manier niet meer in direct contact met de elektroden waardoor een ander mechanisme aangewend wordt. Dit lange afstand elektrontransport gebeurt via conductieve pili en door vorming van conductieve biofilms (Malvankar *et al.*, 2011). De hoge geleidbaarheid van deze biofilms is te danken aan

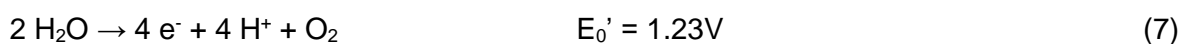
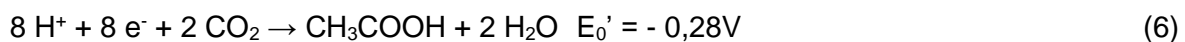
een densus netwerk van pili. De pili van *Geobacter sulfurreducens* zijn 3-5 nm dik en kunnen tot 10-20 µm lang worden. Verschillende *Geobacter* species hebben pili maar enkel de pili van *Geobacter sulfurreducens* vertonen conductiviteit (Lovley *et al.*, 2012). Men kan dus stellen dat *Geobacter sulfurreducens* een groot voordeel vertoont op het vlak van interactie met de extracellulaire omgeving.

Geobacter sulfurreducens is in staat om fumaraat, nitraat (Gregory *et al.*, 2004), uranium (Gregory *et al.*, 2005) en gechloteerde componenten (Strycharz *et al.*, 2010) te reduceren met een elektrode als enige elektrondonor. Hieruit kan geconcludeerd worden dat *Geobacter* de mogelijkheid bezit om via directe elektrontransfer van elektroden naar microben te werken (Lovley *et al.*, 2012). Dit gaat gepaard met de vorming van dunnere biofilms. Een direct mechanisme is aannemelijk aangezien *Geobacter* sp. nitraat kan reduceren tot nitriet met elektroden als enige elektrondonor. De stoichiometrie van nitraatconsumptie en nitrietaccumulatie kwamen overeen met de benodigde elektronen van de elektrode. De cellen van *G. metallireducens* die in direct contact stonden met het elektrode-oppervlak waren verantwoordelijk voor de reductie van nitraat. De cellen van *G. sulfurreducens* die in direct contact stonden met de elektrode waren in staat om fumaraat te reduceren tot succinaat. Deze resultaten toonden voor de eerste keer aan dat elektroden kunnen dienen als directe elektrondonor bij anaerobe respiratie (Gregory *et al.*, 2004).

3. Acetogenen voor microbiële electrosynthese

Acetogene bacteriën kunnen koolstofdioxide reduceren met de vorming van acetaat en andere koolstofbevattende producten met waterstofgas als elektrondonor (Drake *et al.*, 2008). De productie van acetaat via deze methode is weliswaar niet praktisch door de grote vraag aan energie-input en dure katalysatoren (Aulenta *et al.*, 2008). De productie via directe elektronentoevoer met behulp van elektroden zou geschikter kunnen zijn (Nevin *et al.*, 2010).

Nevin *et al.* onderzocht in 2010 de mogelijkheid om *Sporomusa ovata* te voeden met elektronen afkomstig van een elektrode. Er werd gewerkt met een tweekamersysteem gescheiden door een membraan. Aan de kathode wordt een biofilm gevormd door *Sporomusa ovata* waar reactie (6) doorgaat terwijl in de anodekamer reactie (7) doorgaat.



In een verdere studie in 2011 stelt Nevin *et al.* dat ook andere *Sporomusa* sp., nl. *S. sphaeroides* en *S. silvacetica* ook stroom consumeren en biofilms vormen op de kathode. Hierbij werd koolstofdioxide gebruikt als de enige elektronacceptor. *S. sphaeroides* vormt acetaat wanneer stroom geconsumeerd werd. Er werd aangetoond dat 84%±26% van de geconsumeerde elektronen teruggevonden werden in de productie van acetaat. De snelheid waarmee *S. sphaeroides* stroom verbruikt is twintig maal lager dan het eerder bestudeerde *S. ovata*. Bij *S. silvacetica* werd slechts een elektronterugwinning van 48%±6% geconstateerd

voor zowel de productie van acetaat als 2-oxobutyraat. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de productie van nevenproducten. Het stroomverbruik van *S. silvacetica* was beter dan *S. sphaeroides* maar is nog altijd 10% lager dan *S. ovata*.

Clostridium ljungdahlii vertoont een elektronherwinning van $82\% \pm 10\%$ voor de productie van formaat en 2-oxobutyraat en $88\% \pm 2\%$ voor de productie van acetaat. De vorming van een biofilm werd ook vastgesteld op de kathode. *Clostridium acetivum* vertoont een lage elektronherwinning ($53\% \pm 4\%$) bij zowel de vorming van acetaat als 2-oxobutyraat. Dit is ook te wijten aan de hoge productie van nevenproducten. *Moorella thermoacetica* produceert voornamelijk acetaat ($85\% \pm 7\%$).

Deze studie toont aan dat bovenstaand mechanisme via een direct proces verloopt. Acetogene bacteriën hebben >400 ppm waterstof (0,065 meq/L) nodig om de acetogenese te laten doorgaan (Nevin *et al.*, 2011). Er werden lage steady-state concentraties (10-100ppm H₂) vastgesteld terwijl de cellen stroom consumeerden. *Acetobacterium woodii* is in staat om koolstofdioxide te reduceren met waterstof als elektrondonor, maar was niet in staat om de kathode als elektrondonor te gebruiken.

Onderzoeksdoelstellingen

In deze masterproef wordt gezocht naar acetogene bacteriën die ijzer corroderen en hun toepassingen in microbiële electrosynthese. Er wordt zowel gewerkt met pure culturen als met milieustalen. Het onderzoek focust zich op de homo-acetogene bacteriën *Clostridium ljungdahlii* en *Sporomusa sphaeroides*. De milieustalen zijn afkomstig van fietsen die al enige tijd in het water liggen. Naast schraapsel van de fietsen wordt ook sediment onderzocht. De stalen worden enkele keren getransfereerd om het verloop van de culturen te volgen. Verschillende condities worden onderzocht door te werken met verschillende temperaturen, zuurtegraad en grootte van de ijzerpartikels. Volgende onderzoeksvragen stellen zich:

Kunnen de gekende homo-acetogene bacteriën C. ljungdahlii en S. sphaeroides nulwaardig ijzer oxideren?

Kato *et al.* (2015) onderzocht reeds de mogelijkheid van *S. sphaeroides* om Fe(0) te oxideren. Hieruit werd geconcludeerd dat de oxidatie van Fe(0) gepaard gaat met de productie van enkele metabolieten. Nevin *et al.* (2011) deed onderzoek naar de mogelijkheid van *C. ljungdahlii* om acetaat te produceren met behulp van een elektrode als elektrondonor. Hierdoor bestaat er een mogelijkheid dat nulwaardig ijzer ook een geschikte elektrondonor is voor *C. ljungdahlii*.

Kan een milieustaal aangerijkt worden met ijzeroxiderende bacteriën?

Aangezien dit onderzoek focust om acetogene bacteriën wordt geprobeerd om de milieustalen aan te rijken met ijzeroxiderende acetogenen. Het milieustaal bevat naast de acetogenen waarschijnlijk tal van andere bacteriën. Met behulp van een aangepast medium voor de aanrijking van acetogenen en eventuele andere addities wordt dit vermeden.

Is er een effect te merken in verband met de exacte locatie van de staalname?

De milieustalen zijn allemaal afkomstig van de Coupure. Er werden stalen genomen van het schraapsel van een fiets, het sediment van de onmiddellijke omgeving van de fiets en een stukje spaak. De fiets is geen solide stuk ijzer maar een legering, hierdoor kan het zijn dat de spaak en het schraapsel een andere bacteriële groei vertonen. Het sediment bevat waarschijnlijk ook andere bacteriën.

Is er een effect van de pH?

De milieustalen worden aangerijkt bij pH 6,2 en pH 7,2 door toevoeging van respectievelijk MES (1 M) en MOPS (1 M). Er wordt nagegaan indien deze verschillende condities een invloed hebben op de groeisnelheid en de productie van de verschillende metabolieten.

Is er een effect van de partikelgrootte van Fe(0)?

De productiesnelheid van acetaat, waterstof en methaan wordt getest met 2 ijzerpartikels met verschillende grootte. Er wordt gebruik gemaakt van ijzerpoeder (puress powder, <212µm, Reidel-de Haën) en ijzerpartikels (Iron granules 1-2mm 99,98%, Alfa Aesar). Ook het effect van de hoeveelheid Fe(0) wordt getest door met 2g en 4g te werken.

Wat is de beste manier om Fe(II)/Fe(III) te bepalen?

Verskillende manieren worden uitgetest om het gehalte aan geoxideerd ijzer te bepalen. Er wordt gebruik gemaakt van de 1,10-phenantroline methode, ferrozine methode en ICP. Als extractiemiddel wordt gewerkt met een oplossing van HCl (2M) en hexamethyltetraamine (10% wt/vol).

Materiaal en methoden

1. Cultuurmedia

De gebruikte media worden bereid in Schott flessen. Het medium wordt gekookt en vervolgens afgekoeld onder N₂/CO₂ (90/10%) atmosfeer. Nadat het medium verdeeld is over de verschillende penicillineflesjes (waarin Fe(0) al aanwezig is) en werden afgesloten met behulp van zachte butyl-rubberen stoppers en afgeklemd met een metalen cap, worden de gasfasen in de flesjes verwisseld voor een N₂/CO₂ (90/10%) atmosfeer en vervolgens geautoclaveerd. Nadien worden eventueel nog enkele steriele maar niet autoclaveerbare componenten toegevoegd. De ijzerdeeltjes worden voor autoclaving toegevoegd aan de penicillineflesjes om steriele omstandigheden te verkrijgen en de groei van andere micro-organismen te voorkomen. Indien nodig werd, na alle toevoegingen en inoculatie, de gasfase in de flesjes verwisseld voor een H₂ atmosfeer.

DSMZ 879 medium voor *Clostridium ljungdahlii*

Voor de experimenten met *C. ljungdahlii* werd DSMZ 879 gebruikt. Er werd MgCl₂ gebruikt in plaats van MgSO₄ om een teveel aan sulfaat te vermijden. Resazurine werd niet toegevoegd omdat dit een potentiële elektronshuttle is. Een MES buffer (1 M) werd gebruikt om de pH stabiel te houden.

DSMZ 311 medium voor *Sporomusa* (betaïne)

Voor de *Sporomusa*-experimenten werd DSMZ 311 gebruikt. Hierbij werd MgSO₄ vervangen door MgCl₂ om een groot gehalte aan sulfaat te vermijden. Het medium werd gebufferd met MOPS (1 M) (pH 7). Resazurine werd niet toegevoegd omdat dit een potentiële elektronshuttle is. Betaïne, cysteïne en gistextract werden toegevoegd om betere groeicondities te verkrijgen.

DSMZ 879 aangepast medium voor de aanrijking van acetogenen

De milieuexperimenten maakten gebruik van een aangepast DSMZ 879 medium. Er wordt gewerkt met 2 buffers, MES (1 M) en MOPS (1 M) voor respectievelijk pH 6 en 7. In sommige proefopstellingen wordt gewerkt met BES (0,5 M) om de vorming van methanogenen tegen te gaan.

2. Micro-organismen

De gebruikte bacteriën *Clostridium ljungdahlii* en *Sporomusa sphaeroides* werden bekomen via respectievelijk de stockcollectie van CMET en DSMZ.

De milieustalen werden met behulp van de Gentse brandweer gehaald uit de Coupure. Hierbij werden stalen genomen van het sediment uit de dichte omgeving van een fiets. Er werd ook gewerkt met roest en een spaak afkomstig van een fiets die al geruime tijd in het kanaal lag. Er werd een stock aangemaakt van zowel de originele stalen als de transfers. Hiervoor werden

lege penicillineflesjes geautoclaveerd waarna vervolgens 100 μL DMSO en 900 μL staal werd toegevoegd. De flesjes worden bewaard bij -80°C .



Figuur 9: Opduiken van milieustalen in Coupure ter hoogte van de Hospitaalstraat op 12 november 2015.

3. Experimentele opstellingen

De batchtesten werden uitgevoerd in penicillineflessen van 60 of 120 mL gevuld met respectievelijk 20 en 40 mL medium. Indien nodig werd 2g Fe toegevoegd. Bij het abiotisch en *Sporomusa* experiment werd gewerkt met ijzerpoeder (puress powder, $<212\mu\text{m}$, Reidel-de Haën). Bij de andere experimenten werden ijzerpartikels (Iron granules 1-2mm 99,98%, Alfa Aesar) toegevoegd.

Het *Clostridium*, *Sporomusa* en abiotisch experiment worden uitgevoerd bij een temperatuur van 37°C . De milieustalen worden in tweevoud uitgevoerd, zowel bij 15 als bij 28°C . De abiotische stalen horende bij dit experiment worden bij 28°C uitgevoerd. De flesjes werden niet geïncubeerd op een schudplaat aangezien de onderzochte bacteriën hieraan gevoelig kunnen zijn.

De anaerobe kamer werd gebruikt voor het opstarten van de testen aangaande anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen. De milieustalen werden door de brandweer onder water genomen waarna de stalen zo snel mogelijk in de anaerobe kamer (GP-Campus-T2+T2, Jacomex, TCPS NV, Rotselaar, België) werden overgebracht. Door gebruik te maken van de anaerobe kamer werden de anaerobe omstandigheden van de milieustalen gewaarborgd. De anaerobe kamer wordt onder een N_2/CO_2 (90/10, v/v%) atmosfeer gebracht en werkt met een overdruksysteem (100 Pa) zodat het binnendringen van lucht onmogelijk wordt. Met behulp van een sluis wordt het nodige materiaal binnengebracht.

4. Analytische methoden

4.1 Fysicochemische parameters

De zuurtegraad wordt bepaald met een Consort multi-parameter analyser C3020. De pH-meter wordt regelmatig gekalibreerd aan de hand van kalibratie-oplossingen van pH 4 en 7.

De optische densiteit wordt gemeten met een OD-meter (Dr. Lange; ISIS 9000; MDA protometer). Hierbij wordt gebruik gemaakt van golflengtes van 500, 565 en 610 nm.

4.2 Gasbepalingen

Staalname gebeurde met behulp van steriele spuitjes en naalden, voorgespoeld met N₂. De stoppers werden eerst steriel gemaakt door ontsmetting met ethanol en afvlaming.

Bij de analyse van gas worden stalen genomen van 2 mL. Om de druk constant te houden wordt eerst 2 mL N₂ toegevoegd aan de serumflessen. De gasstalen werden tijdelijk bewaard door middel van een naald die in een stopper werd geprikt. Hierdoor werd gasuitwisseling tussen de staalname en de analyse miniem. Analyse van H₂ en CH₄ gebeurt met behulp van de Compact GC (Global Analyser Solutions, Breda, Nederland), uitgerust met een Molsieve 5A pre-column en Porabond column (CH₄, O₂, H₂ and N₂) en een Rt-Q-bond pre-column en column (CO₂, N₂O and H₂S). Gasconcentraties worden bepaald aan de hand van een detector gebaseerd op thermale conductiviteit.

4.3 Bepaling van vluchtige vetzuren

Staalname gebeurde met behulp van steriele spuitjes en naalden, voorgespoeld met N₂. De stoppers werden eerst steriel gemaakt door ontsmetting met ethanol en afvlaming.

Staalname voor analyse met behulp van IC gebeurt aan de hand van steriele anaerobe naalden waarbij 1,5 mL vloeistoffase wordt genomen. Na het meten van de optische densiteit en de zuurtegraad worden de stalen gefilterd met behulp van 0.20 µm filters. Om neerslagvorming van Fe(II) te bevorderen wordt 50 µL gefilterd NaOH toegevoegd aan 950 µL staal. Nadat de precipitatie volledig is doorgegaan bij 4 °C, worden de stalen gecentrifugeerd (Eppendorf Centrifuge 5430, 14000 rpm, 5-7 min) waarna het supernatant wordt geanalyseerd voor de bepaling van vluchtige vetzuren. De neerslag voor analyse wordt aangeraden om de kolom niet te beschadigen. Indien de precipitatie vooraf niet is gebeurd, kan neerslag ontstaan in de kolom.

De bepaling van acetaat gebeurt met behulp van 930 Compact IC Rex (Metrohm, Zwitserland) ionchromatografie met inline bicarbonaatverwijdering (MCS). De scheiding van de verschillende componenten werd uitgevoerd met een Metrosep kolom voor organische zuren (250/7.8) bij 35°C na een Metrosep guard kolom voor organische zuren (4.6). Als eluent werd gebruik gemaakt van 1 mM H₂SO₄ aan 0,5 mL/min. Detectie gebeurde aan de hand van een 850 IC conductiviteitsdetector en werd verbeterd met behulp van een chemische suppressie module waardoor protonen vervangen werden door Li⁺ (MSM met 0,5 M LiCl). Tussen de verschillende analyses werd de naald gereinigd met aceton. De ondergrens voor kwantificering bedraagt 1 mg/L (Gildemyn et al., 2015).

Alcoholen werden geanalyseerd met behulp van 930 Compact IC Flex (Metrohm, Zwitserland) ionchromatografie. De scheiding verloopt bij 35°C door een Metrosep Carb 2 (250/4.0) kolom te plaatsen na een Metrosep Trap 1 100/4.0 guard kolom. Als eluent wordt gebruik gemaakt van 20 mM NaOH aan 0,8 mL/min. De detectie wordt gedaan met een IC amperometrische detector (cyclus: 300 ms 0,05V, 50 ms 0,55V, 200 ms -0,1V). Tussen de verschillende analyses werd de naald gereinigd met aceton. De ondergrens voor kwantificering bedraagt 1 mg/L (Gildemyn *et al.*, 2015).

MES en MOPS hebben een retentietijd van respectievelijk 18,9 min en 21,04 min bij de analyse van organische zuren. Er is geen interferentie met de te analyseren componenten. Bij de alcoholanalyse wordt geen signaal bekomen.

4.4 Bepaling van kationen en anionen in waterstaal

De samenstelling van het water van de Coupure wordt geanalyseerd met behulp van ionchromatografie. De bepaling van natrium, ammonium, kalium, magnesium en calcium gebeurt met een 761 Compact Ion Chromatograph (Metrohm, Zwitserland) uitgerust met een detector gebaseerd op geleidbaarheid. De bepaling van chloride, nitriet, nitraat, sulfaat en fosfaat gebeurt op eenzelfde manier.

4.5 IJzerbepaling

Het gehalte aan opgelost ijzer wordt bepaald met behulp van de vorming van een gekleurd complex met 1,10-phenantroline. De absorptie van dit complex wordt gemeten bij 510 nm en is proportioneel aan de Fe(II) concentratie. Het totaal gehalte wordt gemeten na Fe(III)reductie met behulp van ascorbinezuur tot Fe(II). Hierdoor kan het Fe(III) gehalte berekend worden via het verschil tussen het totaal gehalte en de hoeveelheid Fe(II). De opstelling van een ijklijn werd gedaan aan de hand van een ijzersulfaatoplossing. Hiervoor werd een verdunningsreeks gemaakt. Het lineaire gebied strekt zich uit van 0 tot 0,3 mM. In eerste instantie werd een ijklijn aangemaakt met behulp van FeS maar aangezien dit te moeilijk was om een homogene oplossing te verkrijgen werd overgeschakeld naar FeSO₄·7H₂O.

Het protocol (ISO 6332) werkt met verschillende reagentia, nl. 1,10-phenantroline (1 g/L), acetaat/azijnzuur buffer (62,5 g acetaat en 175 mL azijnzuur aanlengen tot 250 mL). Het ascorbinezuur wordt in poedervorm toegevoegd. Voordien gebeurt een extractie met behulp van een oplossing van HCl (2 M) en hexamethyltetraamine (10% wt/vol). Hierbij wordt een gelijke hoeveelheid extractiemiddel toegevoegd aan het medium. Er wordt rekening gehouden met deze verdunning in de berekeningen. De extractie blijft enkele dagen onaangeroerd tot een kleurloze oplossing bekomen wordt.

De OD wordt gemeten ten opzichte van een blanco (demiH₂O) bij 500 nm. Aan 800 µL staal wordt 200 µL 1,10-phenantroline en 200 µL acetaat/azijnzuur buffer toegevoegd. Na toevoeging van ascorbinezuur wordt de OD bij dezelfde golflengte gemeten.

Naast de ijzerbepaling met 1,10-phenantroline werd ook een methode geprobeerd met ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazin-p,p' disulfonic acid monosodium salt hydrate). Volgens het protocol (Veloza, 2013) moest 100 µL 0,01M ferrozine toegevoegd worden aan 900 µL staal (voordien extractie via 2 M HCl en 10 % hexamethyltetraamine) en 15-50 µL 5 M NH₄Ac-buffer. Aangezien de zuurtegraad van de buffer niet werd aangepast naar 9,5 met behulp van 30% NH₄OH werden deze verhoudingen aangepast. Er werd gewerkt met 100 µL 0,01 M ferrozine, 800 µL staal en 100 µL buffer. Een standaardreeks voor het opstellen van een ijklijn werd gemaakt met Mohr's salt ((NH₄)₂(SO₄)₂Fe).

Aangezien de ferrozinemethode geen gelijklopende resultaten opleverde met de 1,10-phenantrolinemethode werd een extra ijzerbepaling uitgevoerd met ICP (labo Analytische en fysische chemie). De bekomen resultaten voldeden ook niet aan de verwachte waarden waardoor uiteindelijk teruggegrepen werd naar de eerste methode met 1,10-phenantroline.

5. Berekeningen

5.1 Standaarddeviatie

De standaarddeviatie σ is een maat voor de spreiding van een variabele. De standaarddeviatie wordt berekend aan de hand van volgende formule, waarbij \bar{x} het gemiddelde en n het aantal getallen waarvan de standaarddeviatie wordt berekend, voorstelt.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

De trend tussen de verschillende duplicaten wordt op deze manier weergegeven.

5.2 Elektronequivalenten

Om alle producten goed te kunnen vergelijken en om de stroom van de elektronen te kunnen volgen wordt gebruik gemaakt van elektronequivalenten.

De geproduceerde hoeveelheid acetaat (mg/L) wordt omgezet naar meq/L via volgende berekening:

$$\frac{\# \text{ mg/L}}{59 \text{ g/mol}} * 8 e$$

De omzetting van Fe(0) naar Fe(II) gaat gepaard met 2 elektronequivalenten.

De Compact GC geeft resultaten weer in volume %. De omzetting naar µmol gebeurt als volgt:

$$\frac{\text{Volume \%}}{100 * 24,466 \text{ L/mol}} * V_{\text{headspace}} * 1000 * 1000$$

Waarbij gebruik wordt gemaakt van de algemene gaswet en wordt veronderstelt dat men werkt onder normaalomstandigheden.

Een verdere omzetting naar meq/L verloopt via volgende berekening:

$$\frac{\# \mu\text{mol}}{1000 * V_{\text{liquid}}} * 2 e \quad \text{Voor H}_2$$

$$\frac{\# \mu\text{mol}}{1000 * V_{\text{liquid}}} * 8 e \quad \text{Voor CH}_4$$

Het volume van de vloeistof- en de gasfase is in L.

5.3 IJzergehalte

De hoeveelheid Fe die omgezet werd naar Fe(II) in meq/L wordt berekend aan de hand van onderstaande redenering:

$$\frac{\text{Absorbantie bij } 500\text{nm}}{6,536} = \# \text{ mM}$$

Hierna wordt de verdunning ingecalculeerd en wordt vermenigvuldigd met twee om het aantal elektronen in rekening te brengen.

$$\# \text{ mM} * \text{verdunning} * 2e = \# \text{ meq/L}$$

Resultaten

1. Abiotische corrosie van Fe(0) onder anaerobe omstandigheden

Twee verschillende ijzerproducten worden getest in een abiotische proefopzet. Hierbij wordt gebruik gemaakt van ijzerpoeder (puress powder, <math><212\mu\text{m}</math>) en ijzerpartikels (Iron granules 1-2mm 99,98%, Alfa Aesar) in PBS buffer (Bijlage 1). In beide gevallen wordt gewerkt met 2g Fe(0). Hieruit blijkt dat abiotische corrosie een grotere vrijstelling van meq vertoont bij het gebruik van poeder ($6,08 \pm 0,30$ meq/L) dan bij partikels ($2,86 \pm 0,51$ meq/L) (Figuur 7). De corrosie gaat langer door indien gewerkt wordt met poeder in plaats van partikels. Er wordt een plateau gevormd na respectievelijk 45 en 20 dagen. De maximale corrosiesnelheid is hoger bij het gebruik van poeder (0,098 meq/dag) dan bij partikels (0,0725 meq/dag). Hierbij wordt respectievelijk 2,74 mg/dag en 2,02 mg/dag Fe(0) verwijderd.

Naast de abiotische testen met PBS buffer werden ook abiotische testen uitgevoerd in DSMZ 879 medium voor *Clostridium ljungdahlii*, DSMZ 311 medium voor *Sporomusa* (betaine) en DSMZ 879 aangepast medium voor de aanrijking van acetogenen. Bij DSMZ 311 wordt gewerkt met 2g poeder, terwijl in de andere opstellingen gebruik gemaakt wordt van 2g partikels. De abiotische testen met DSMZ 311 medium vertoont een grotere H₂ productie ($17,66 \pm 0,85$ meq/L na 41 dagen) dan alle andere proefopstellingen.

De corrosiesnelheid voor de verschillende opstellingen is het laagste bij de abiotische testen die gepaard gaan met de milieustalen. De abiotische corrosie verloopt sneller bij pH 6 dan bij pH 7 en beter bij 28°C dan bij 15°C. De gemiddelde corrosiesnelheid is 0,01 meq/dag bij 15°C pH 7, 0,02 meq/dag voor 28°C pH 7, 0,03 meq/dag voor 15°C pH 6 en 0,06 meq/L bij 28°C pH 6. Dit komt overeen met een theoretische Fe(0) verwijdering van respectievelijk 0,37 mg/dag, 0,62 mg/dag, 0,89 mg/dag en 1,70 mg/dag.

De abiotische corrosie is een tienvoud sneller bij DSMZ 311 *Sporomusa* (betaine) (0,4296 meq/dag of 12,00 mg/dag Fe(0) verwijdering) dan bij DSMZ 879 *C. ljungdahlii* (0,0427 meq/dag of 1,19 mg/dag Fe(0) verwijdering).

Tabel 1: Overzicht van de verschillende abiotische opstellingen.

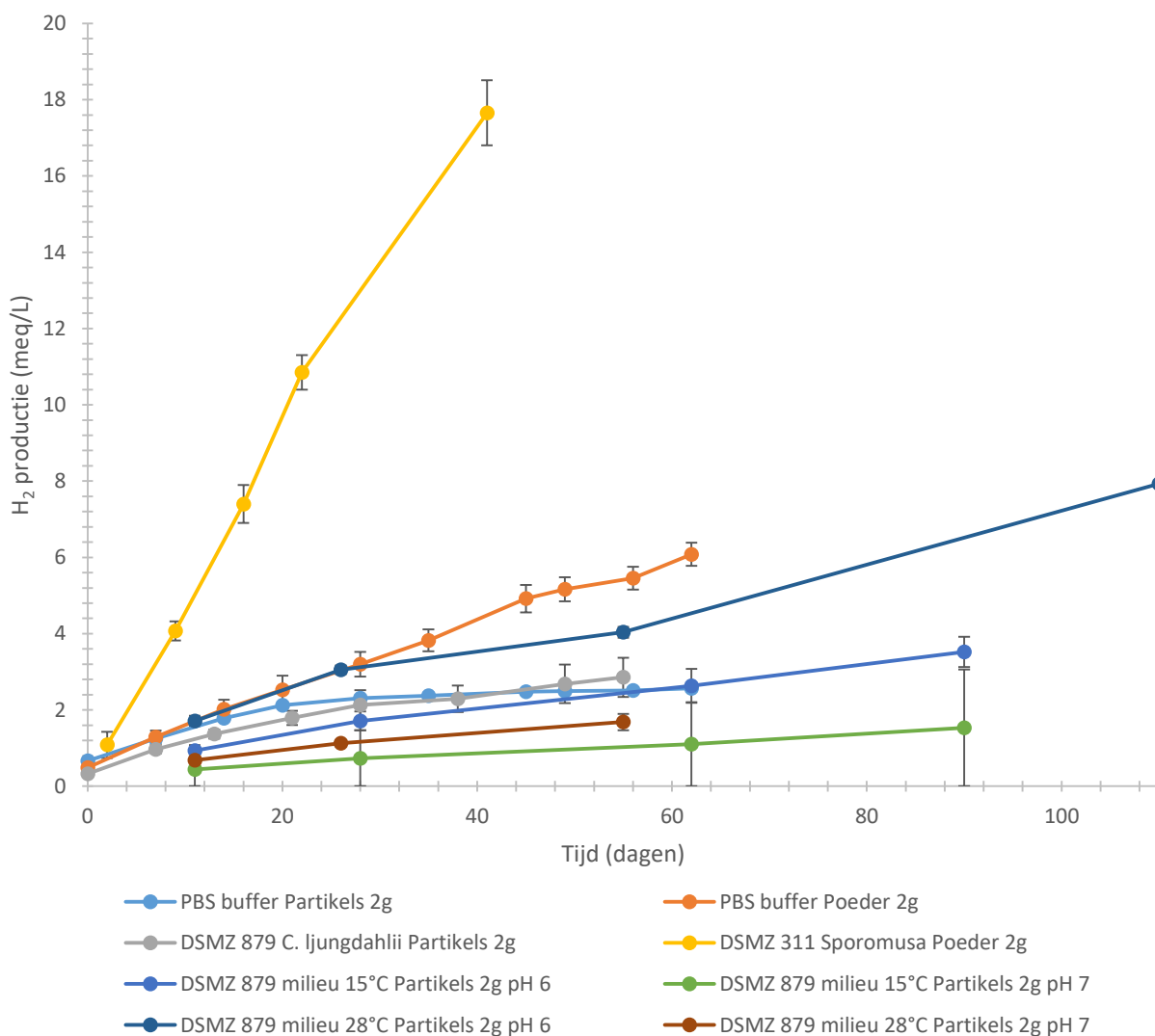
Opstelling	Herhalingen	Gemiddelde corrosiesnelheid (meq/dag)	Theoretische Fe(0) verwijdering (mg/dag)
PBS partikels 2g	3		2,02
PBS poeder 2g	3	0,09	2,74
DSMZ 879 <i>C. ljungdahlii</i> partikels 2g	3	0,04	1,19
DSMZ 311 <i>Sporomusa</i> poeder 2g	3	0,4	12,00
DSMZ 879 milieu 15°C partikels 2g	2 (zowel bij pH 6 als bij pH 7)	0,03 (pH 6) 0,01 (pH 7)	0,89 (pH 6) 0,37 (pH 7)

DSMZ 879 milieu 28°C
partikels 2g

2 (zowel bij pH 6 als bij
pH 7)

0,06 (pH 6)
0,02 (pH 7)

1,70 (pH 6)
0,62 (pH 7)



Figuur 10: H₂ productie van de abiotische proefopstellingen met verschillende media. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=3. De datapunten zijn het gemiddelde van 3 replicaten.

2. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van pure culturen

2.1 *Clostridium ljungdahlii* experiment

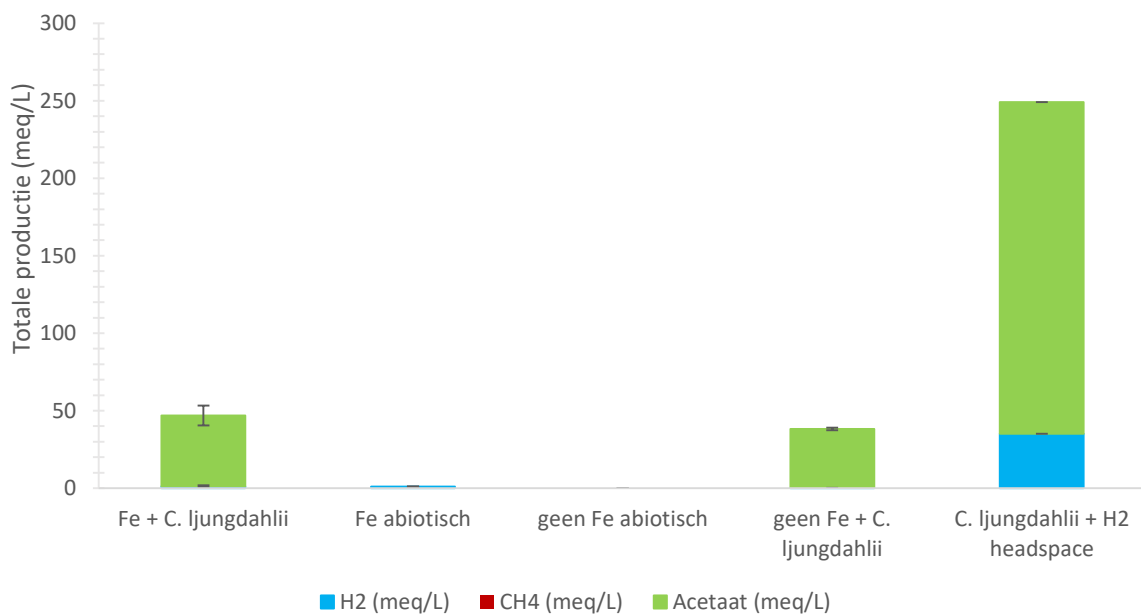
Tijdens dit experiment wordt nagegaan of *Clostridium ljungdahlii* in staat is om acetaat te produceren met Fe(0) als enige elektrondonor. De testen worden uitgevoerd in een DSMZ 879 medium.

Tabel 2: Overzicht van de verschillende proefopstellingen binnen het *Clostridium ljungdahlii* experiment.

Opstelling	Herhalingen
Fe en <i>C. ljungdahlii</i>	3
Fe abiotisch	3
Abiotisch zonder Fe	2
<i>C. ljungdahlii</i> zonder Fe	2
<i>C. ljungdahlii</i> met H ₂ in gasfase	2

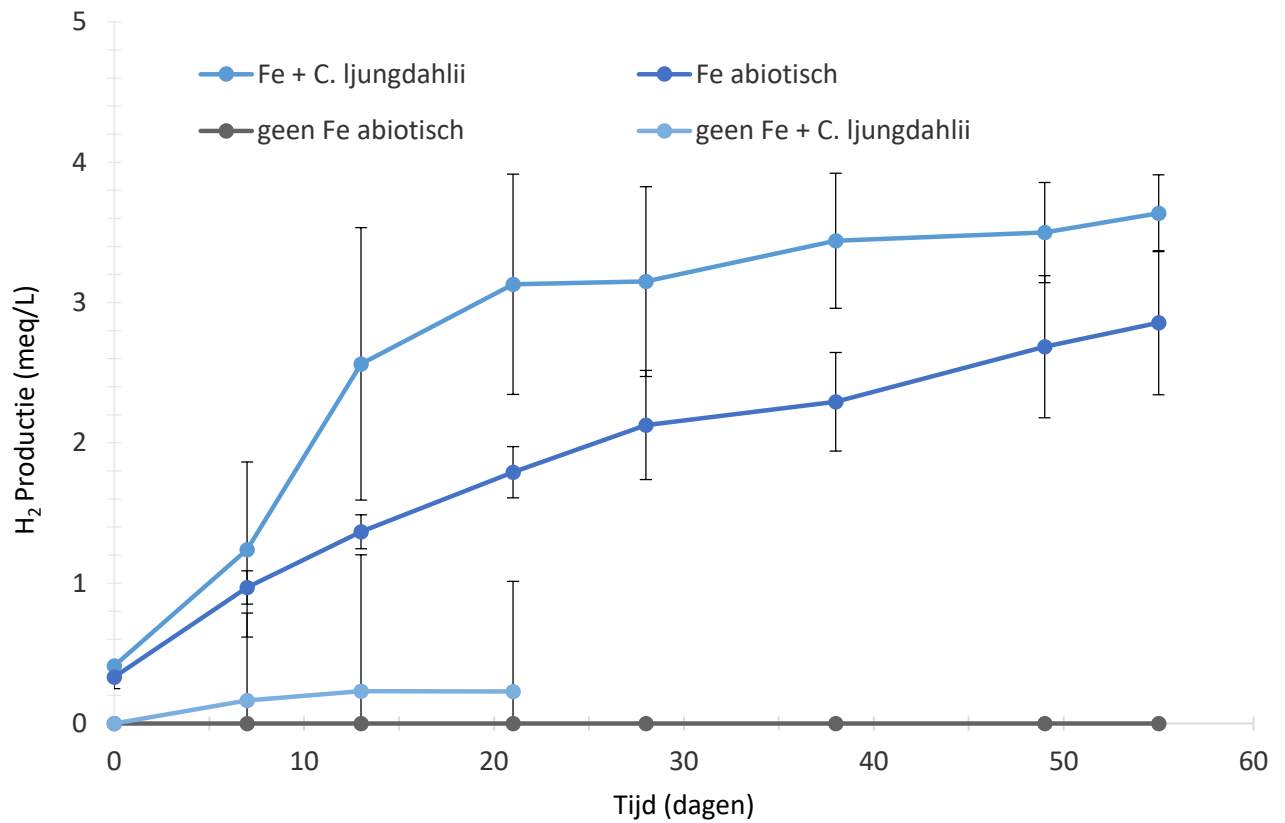
Het gebruikte ijzer is in poedervorm (puress powder, <212µm), er wordt 2g Fe gebruikt per 40 mL medium. MES werd in deze proef enkel toegevoegd aan Fe + *Clostridium ljungdahlii* en Fe abiotisch. Gedurende het experiment wordt het gehalte aan H₂ en acetaat gemeten. Hiernaast worden de pH en de druk ook bijgehouden.

Productie van methaan is afwezig aangezien de groei van *C. ljungdahlii* niet gepaard gaat met methaanvorming en besmetting met methanogenen voorkomen werd. De starthoeveelheid H₂ in de gasfase kwam overeen met 2,5 g/L Fe(0) (90,43 meq/L). Alle flesjes werden verticaal geïncubeerd. *C. ljungdahlii* produceerde meer acetaat in de aanwezigheid van waterstof in de gasfase (213,95 meq/L) in vergelijking tot Fe(0) als elektrondonor (45,72 ± 6,36 meq/L) of zonder Fe(0) (38,10 ± 0,79 meq/L) (Figuur 11).

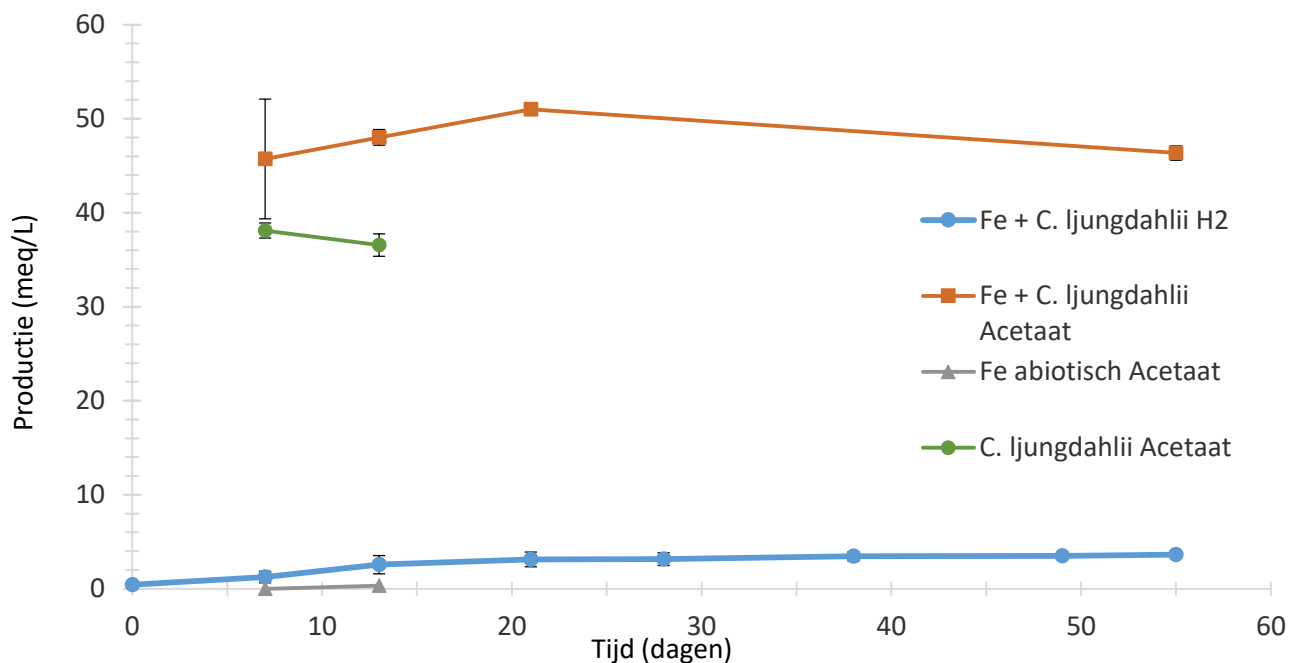


Figuur 11: Productie van H₂, CH₄ en acetaat in meq/L op dag 7 van het experiment bij Fe + *C. ljungdahlii*, Fe abiotisch, geen Fe abiotisch, geen Fe + *C. ljungdahlii* en *C. ljungdahlii* + H₂ headspace. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=2.

Gedurende het volledige experiment is een logaritmische stijging van H₂ waarneembaar tot na 55 dagen een waarde van 3,64 ± 0,27 meq/L bereikt wordt bij Fe + *C. ljungdahlii*. Dit vertoont geen grote verschillen met Fe abiotisch (2,86 ± 0,51 meq/L). De proefopstelling geen Fe + *C. ljungdahlii* bekommt een plateau bij 0,23 ± 0,02 meq/L na 13 dagen incubatie (Figuur 12).



Figuur 12: Productie van H₂ (meq/L) gedurende 55 dagen. De foutvlaggen stellen de standaarddeviatie voor met n=2.



Figuur 13: Productie van H₂ en acetaat (meq/L) gedurende 55 dagen. De foutvlaggen stellen de standaarddeviatie voor met n=2. De gehalte aan acetaat bij *C. ljungdahlii* + H₂ in de headspace is op dag 1 gelijk aan 188,82 meq/L en op dag 7 gelijk aan 213,95 meq/L.

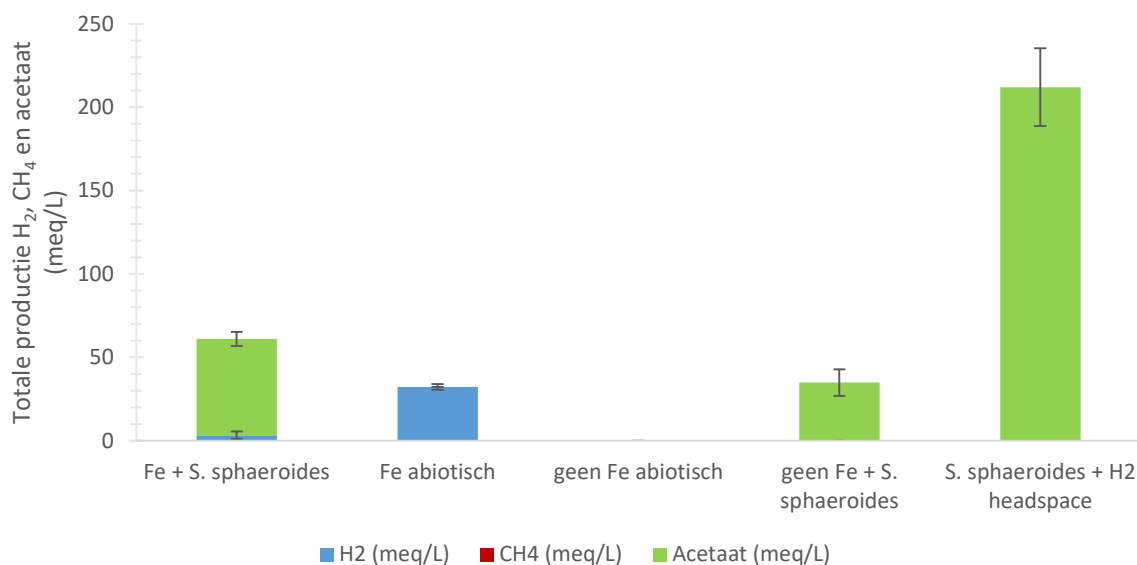
2.2 *Sporomusa sphaeroides* experiment

Bij het *Sporomusa* experiment wordt een proef gemaakt met 5 verschillende opstellingen. In tegenstelling tot het *Clostridium* experiment wordt gebruik gemaakt van ijzerpoeder in plaats van partikels. Aangezien de grotere oppervlakte-volumeratio mogelijks betere resultaten zou opleveren. Het gehalte aan H₂, CH₄ en acetaat wordt gemeten.

Tabel 3: Overzicht van de verschillende opstellingen bij het *Sporomusa sphaeroides* experiment.

Opstelling	Herhalingen
Fe en <i>S. sphaeroides</i>	3
Fe abiotisch	3
Abiotisch zonder Fe	2
<i>S. sphaeroides</i> zonder Fe	2
<i>S. sphaeroides</i> met H ₂ in gasfase	2

Productie van methaan is afwezig omdat de groei van *S. sphaeroides* niet gepaard gaat met methaanvorming. *S. sphaeroides* produceerde meer acetaat in de aanwezigheid van waterstof ($211,95 \pm 32,34$ meq/L) in vergelijking tot Fe(0) als elektron donor ($57,72 \pm 4,18$ meq/L) of zonder Fe(0) ($34,33 \pm 0,79$ meq/L). De productie van H₂ is bij de abiotische opzet met Fe ($32,27 \pm 1,67$ meq/L) hoger dan bij Fe + *S. sphaeroides* ($3,33 \pm 2,26$ meq/L) (Figuur 14). De gemiddelde productiesnelheid van *S. sphaeroides* in de aanwezigheid van Fe(0) als enige elektrondonor ($1,63$ meq/dag) is een drievoud hoger dan bij de abiotische controle ($0,43$ meq/dag).



Figuur 14: Productie van H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) bij Fe + *S. sphaeroides*, Fe abiotisch, geen Fe abiotisch, geen Fe + *S. sphaeroides* en *S. sphaeroides* + H₂ in headspace op dag 155 van het experiment. De standaarddeviatie wordt berekend met n=3 voor Fe + *S. sphaeroides*, Fe abiotisch en n=2 voor geen Fe abiotisch, geen Fe + *S. sphaeroides* en *S. sphaeroides* + H₂ in headspace.

Op het einde van het experiment werden sporen van ethanol, 1,2-propaandiol en 1,3-propaandiol teruggevonden.

3. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen

De milieustalen afkomstig van de Coupure (t.h.v. Hospitaalstraat) worden bij verschillende temperaturen geïncubeerd. Hierdoor kan de groei en productie bij 15°C en 28°C vergeleken worden. Bij zowel de initiële proefopstellingen als de transfers wordt gewerkt met ijzerpartikels. De testen worden uitgevoerd in DSMZ 879 medium, aangepast voor de aanrijking van acetogenen. Om een beter zicht te krijgen op de condities waarvan de milieustalen afkomstig zijn werd het water van de Coupure geanalyseerd met behulp van ionchromatografie. De pH was 7,17 en de geleidbaarheid bedroeg 1081 µS/cm. De luchttemperatuur op het moment van staalname bedroeg 15,4°C.

Tabel 4: Samenstelling water Coupure op 12/11/2015.

		mg/L	mM
Kation	Na ⁺	69,83	3,04
	Ca ²⁺	145,94	3,65
	Mg ²⁺	15,15	0,62
	K ⁺	16,49	0,42
Anion	Cl ⁻	86,97	2,45
	NO ₂ ⁻	0,43	0,01
	NO ₃ ⁻	25,65	0,41
	PO ₄ ³⁻	0,32	0,004
	SO ₄ ²⁻	101,57	1,06

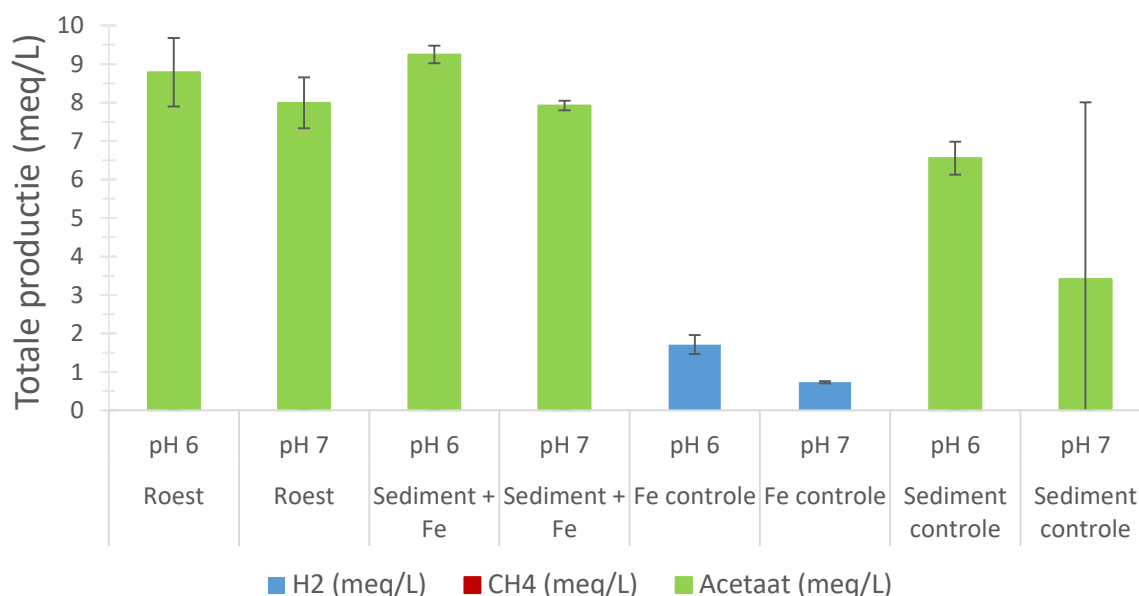
3.1 Proefopzet bij 15°C

De proef wordt uitgevoerd bij pH 6 en 7.

Tabel 5: Overzicht van de verschillende opstellingen van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen bij 15°C.

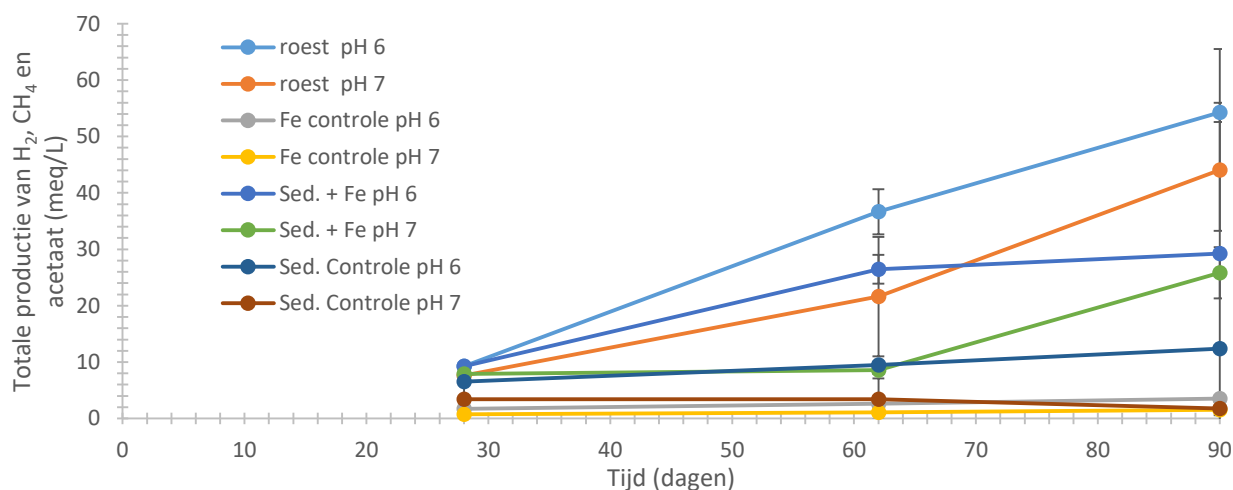
Opstelling	Herhalingen (bij pH 6 en 7)
Roest	2
Sediment en Fe	2
Fe controle	2
Sediment controle	2

Een hoeveelheid H₂ is enkel aanwezig in de Fe controles, hierbij is het gehalte groter bij pH 6 (1,71 ± 0,25 meq/L) dan bij pH 7 (0,73 ± 0,03 meq/L). Methaanproductie is bij alle proefopstellingen op dag 28 van het experiment afwezig. De acetaatproductie is hoger indien Fe(0) aanwezig is als enige elektrondonor (Sediment + Fe pH 6 (9,25 ± 0,23 meq/L), en pH 7 (7,92 ± 0,13 meq/L)) in vergelijking met de sediment controle pH 6 (6,56 ± 0,43 meq/L) en pH 7 (3,42 ± 4,59 meq/L)) (Figuur 15).



Figuur 15: Productie van H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) na 28 dagen incubatie bij 15°C. De standaarddeviatie (n=2) wordt weergegeven aan de hand van de foutvlaggen.

De totale productie is het hoger bij Roest +Fe (pH 6 ($54,26 \pm 1,70$ meq/L) en pH 7 ($44,04 \pm 10,75$ meq/L)) dan bij Sediment + Fe (pH 6 ($29,24 \pm 36,26$ meq/L) en pH 7 ($25,82 \pm 4,56$ meq/L)). Het gebruik van Fe(0) als elektrondonor zorgt voor een hogere productie in vergelijking met de controles zonder Fe(0). Indien geen Fe(0) gebruikt wordt, is de productie met sediment 3,5 keer hoger bij pH 6 ($12,41 \pm 1,07$ meq/L) terwijl bij pH 7 ($1,75 \pm 1,18$ meq/L) de totaalproductie gelijk is aan de productie met Fe(0) (Figuur 16).



Figuur 16: Totale productie van H₂, CH₄ en acetaat in meq/L gedurende het volledige experiment bij incubatie op 15°C startende van pH 6 of pH 7. De standaarddeviatie wordt weergegeven met n=2.

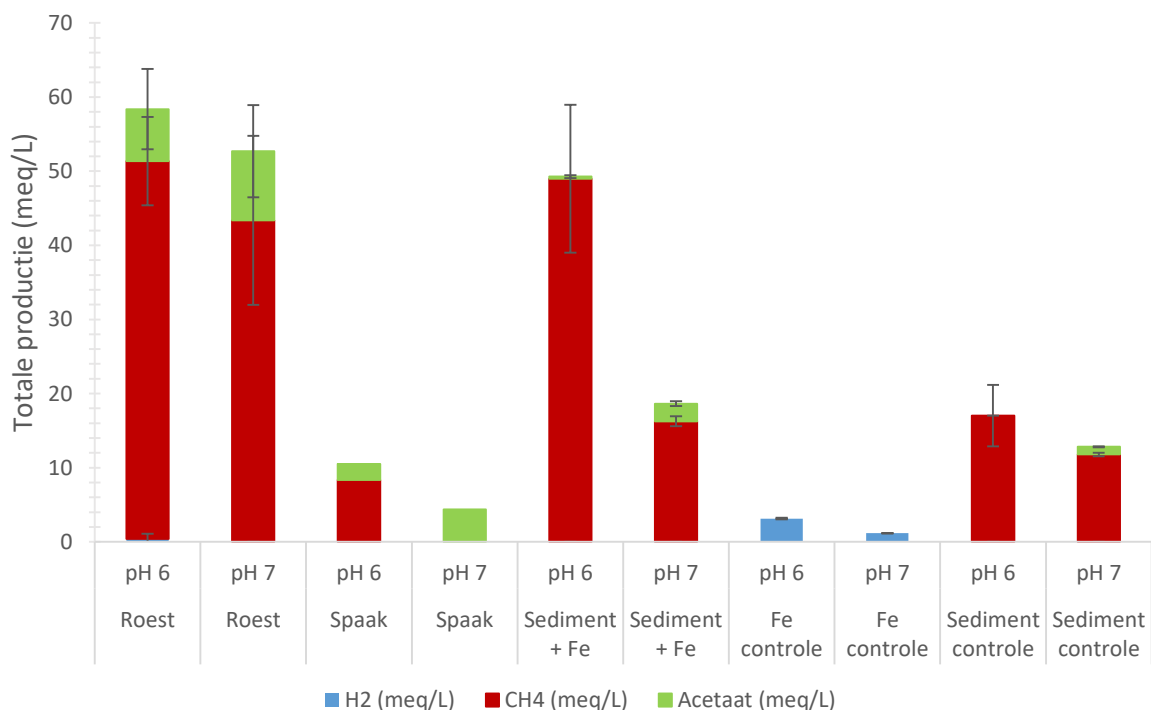
3.2 Proefopzet bij 28°C

De proef wordt uitgevoerd bij pH 6 en 7.

Tabel 6: Overzicht van de verschillende opstellingen van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen bij 28°C.

Opstelling	Herhalingen (bij pH 6 en 7)
Roest	2
Spaak	1
Sediment en Fe	2
Fe controle	2
Sediment controle	2

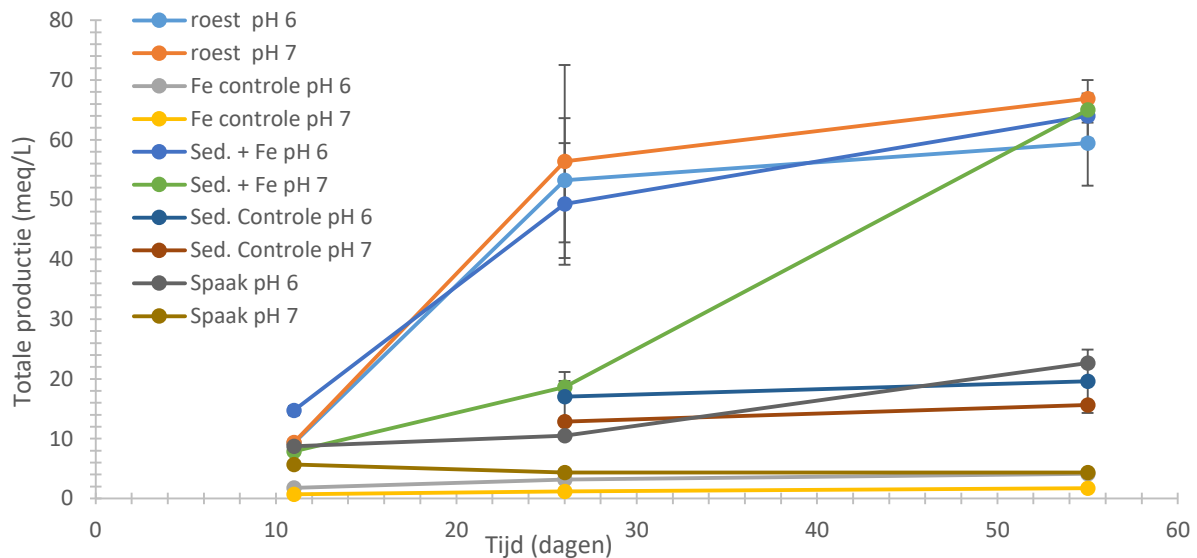
De groei van de milieustalen bij 28°C gaat gepaard met een hoge methaanproductie. De hoogste methaanproducties zijn waarneembaar bij pH 6 (Roest (50,93 ± 5,97 meq/L), Spaak (8,34 meq/L), Sediment + Fe (48,99 ± 9,98 meq/L) en Sediment controle (17,02 ± 4,15 meq/L)) in vergelijking met pH 7 (Roest (43,36 ± 0,14 meq/L), Spaak (4,15 meq/L), Sediment + Fe (16,26 ± 0,67 meq/L) en Sediment controle (11,78 ± 0,23 meq/L)) (Figuur 17). Wanneer echter gekeken wordt naar het volledige experiment wordt duidelijk dat de totale productie bij Roest + Fe en Sediment + Fe pH 6 wordt ingehaald door de respectievelijke proefopzet bij pH 7 (Figuur 18).



Figuur 17: De totale productie van H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) op dag 26 bij incubatie bij 28°C. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=2, behalve bij de spaak waar n=1.

Indien Fe(0) aanwezig is als enige elektrondonor zoals bij roest pH 6 (59,43 ± 7,11 meq/L), roest pH 7 (64,00 ± 3,07 meq/L), sediment + Fe pH 6 (64,33 ± 3,78 meq/L) en sediment + Fe

pH 7 ($65,02 \pm 2,16$ meq/L) ligt de totale productie aanzienlijk hoger dan indien Fe(0) afwezig is zoals sediment controle pH 6 ($34,33 \pm 5,28$ meq/L) en pH 7 ($34,33$ meq/L). De totale productie bij spaak pH 6 ($22,66$ meq/L) is meer dan vijf maal hoger dan de abiotische Fe controle pH 6 ($4,15 \pm 0,14$ meq/L) terwijl spaak pH 7 ($4,36$ meq/L) 2,5 keer hogere waarden weergeeft als zijn abiotische Fe controle pH 7 ($1,73 \pm 0,22$ meq/L) (Figuur 18).



Figuur 18: De totale productie van H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) gedurende het volledige experiment bij incubatie bij 28°C. De foutvlaggen geven de standaarddeviatie weer met n=2.

3.3 Transfers

De transfers zijn afkomstig van de proefopzet van 28°C en worden opgedeeld naarmate BES aan- of afwezig was. Na 34 dagen werd een eerste transfer gedaan. Na 37 dagen werden de stalen zonder BES getransfereerd, na 48 dagen de milieustalen met BES. Een derde transfer vond plaats na 34 dagen (zonder BES) of 39 dagen (met BES). De productie gedurende het volledige experiment kan gevonden worden in bijlage (Appendix 7).

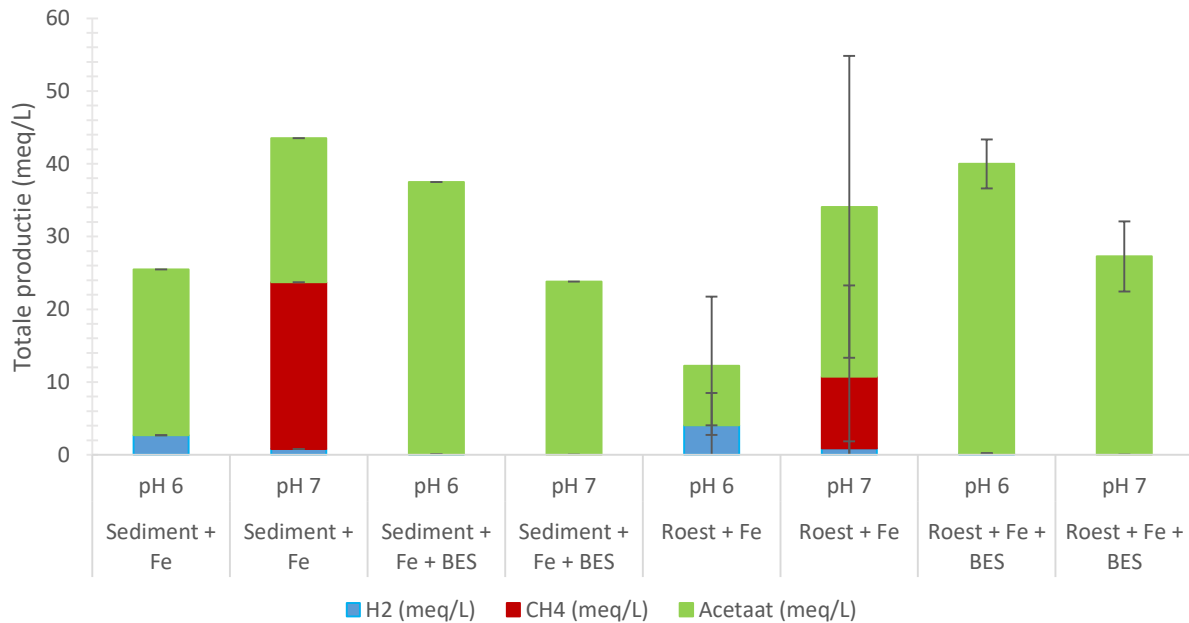
Tabel 7: Overzicht van de verschillende opstellingen van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen (transfer 1) bij 28°C. De stalen werden opgevolgd (transfer 2 en 3).

Opstelling transfers	Herhalingen (bij pH 6 en 7, in aan- en afwezigheid van BES)
Roest	2
Sediment en Fe	1

3.3.1 Transfer 1

Wanneer gekeken wordt naar het gehalte aan acetaat is deze hoger indien BES wordt toegevoegd aan de verschillende proefopstellingen (Sediment + Fe pH 6 ($22,79$ meq/L) en pH 7 ($19,78$ meq/L), Roest + Fe pH 6 ($8,16 \pm 9,50$ meq/L) en pH 7 ($23,31 \pm 20,75$ meq/L)) dan wanneer BES niet wordt toegevoegd ((Sediment + Fe pH 6 ($37,43$ meq/L) en pH 7 ($23,80$ meq/L), Roest + Fe pH 6 ($39,82 \pm 3,37$ meq/L) en pH 7 ($27,26 \pm 4,80$ meq/L)).

Methaanproductie is enkel aanwezig bij pH 7 in de afwezigheid van BES (Sediment + Fe pH 7 (22,97 meq/L) en Roest + Fe pH 7 (9,85 ± 12,54)) (Figuur 19).

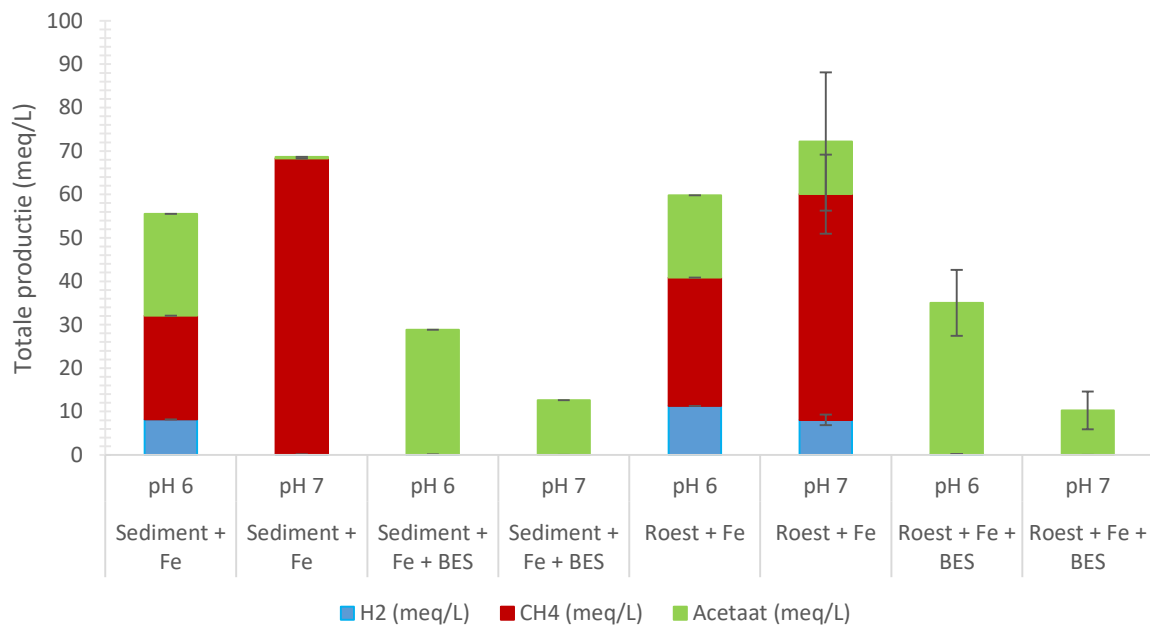


Figuur 19: Transfer 1: Productie van H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) op dag 55 van het experiment bij zowel pH 6 als pH 7 De incubatie gebeurde bij 28°C. De foutvlaggen zijn de standaarddeviatie met n=2.

De methaanproductie bij pH 6 (Sediment + Fe (23,87 meq/L) en Roest + Fe (29,55 meq/L)) is lager dan bij pH 7 (Sediment + Fe (68,13 meq/L) en Roest + Fe (52,01 meq/L)) indien BES niet aanwezig is. Het gehalte aan acetaat is groter wanneer de incubatie gestart wordt bij pH 6 dan bij pH 7, zowel in de aan- als de afwezigheid van BES.

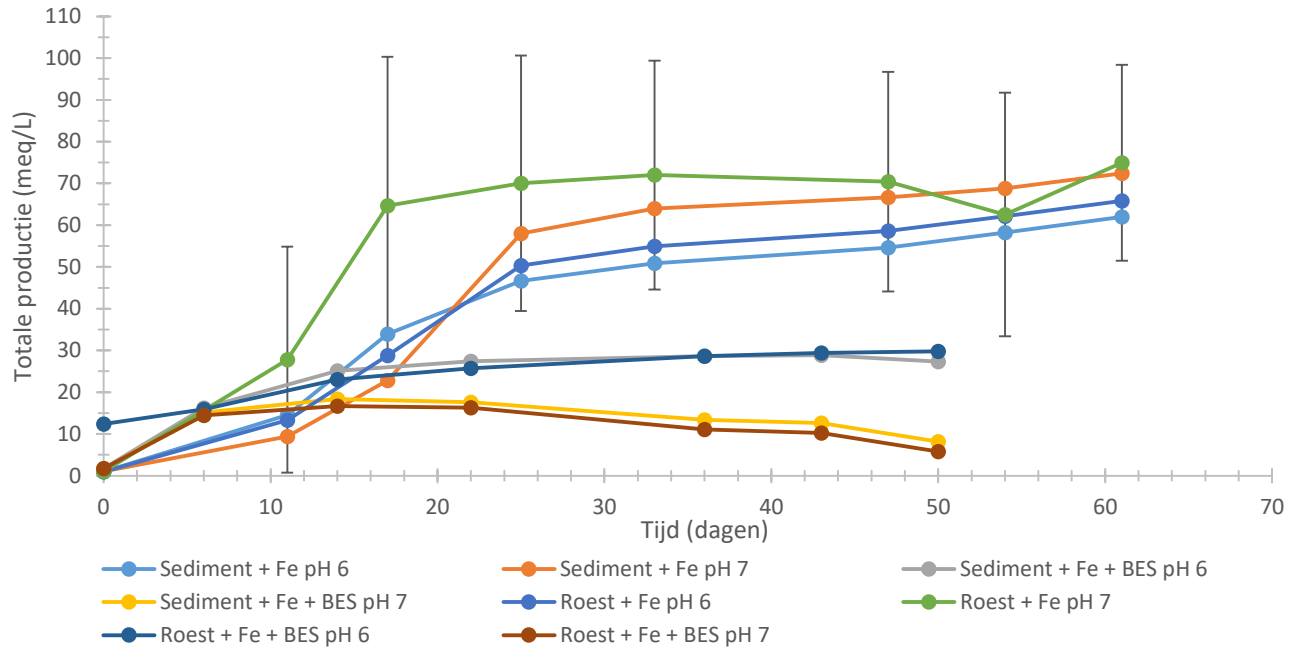
Het gehalte aan H₂ is in kleine mate aanwezig bij pH 7 (Sediment + Fe (0,15 meq/L), Roest + Fe (8,06 meq/L)) dan pH 6 (Sediment + Fe pH 6 (8,19 meq/L), Roest + Fe (11,29 meq/L)) indien BES niet werd toegevoegd. Wanneer BES wel werd toegevoegd aan de proefopstellingen in H₂ enkel aanwezig bij pH 6 (Sediment + Fe + BES pH 6 (0,06 meq/L), Roest + Fe + BES (0,14 ± 0,07 meq/L)) (Figuur 19).

3.3.2 Transfer 2



Figuur 20: Transfer 2: Productie van H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) op dag 43 (met BES) of 47 (zonder BES) bij pH 6 en pH 7. De standaarddeviaties bij Roest + Fe (+ BES) worden berekend met n=2.

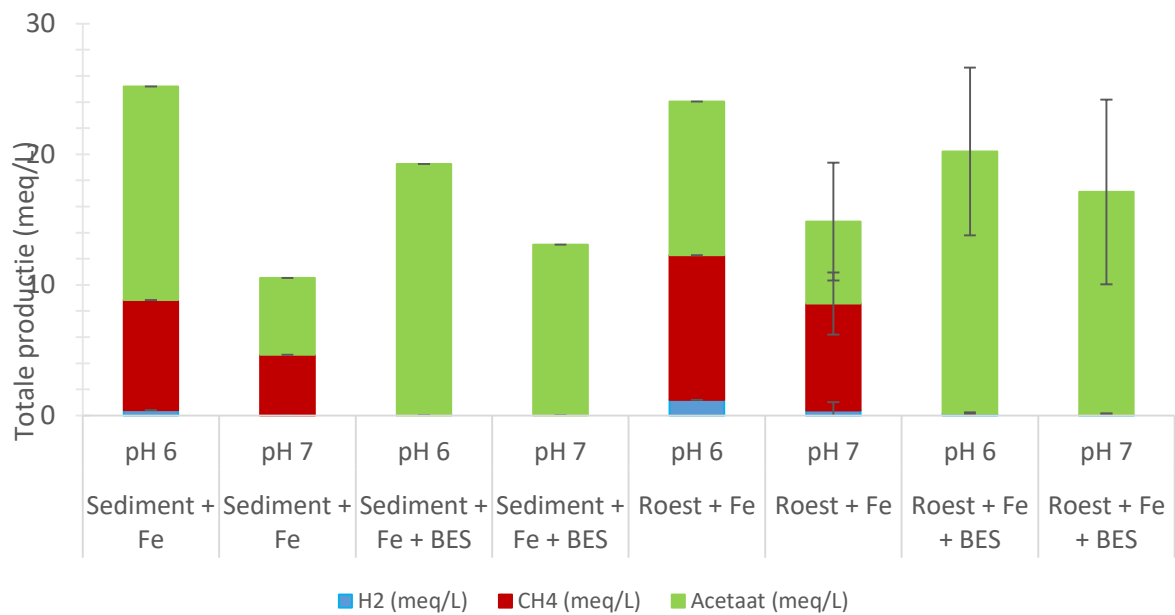
De totale productie is bij alle transfers het hoogst indien BES niet wordt toegevoegd. De verloren methaanproductie wordt niet gecompenseerd door een voldoende hoge acetaatproductie indien BES aanwezig is (Figuur 20). De totale productie met BES vormt een plateau na 14 dagen bij pH 7 (Sediment + Fe + BES (18,35 meq/L), Roest + Fe + BES (16,66 meq/L)) en 22 dagen bij pH 6 (Sediment + Fe + BES (27,38 meq/L), Roest + Fe + BES (25,70 meq/L)). In tegenstelling tot de andere transfers is, wanneer gewerkt wordt zonder BES, de productie het hoogst indien gestart wordt vanaf pH 7. De totale productie is hoger bij Roest + Fe (74,96 meq/L) dan bij Sediment + Fe (72,39 meq/L) (Figuur 21).



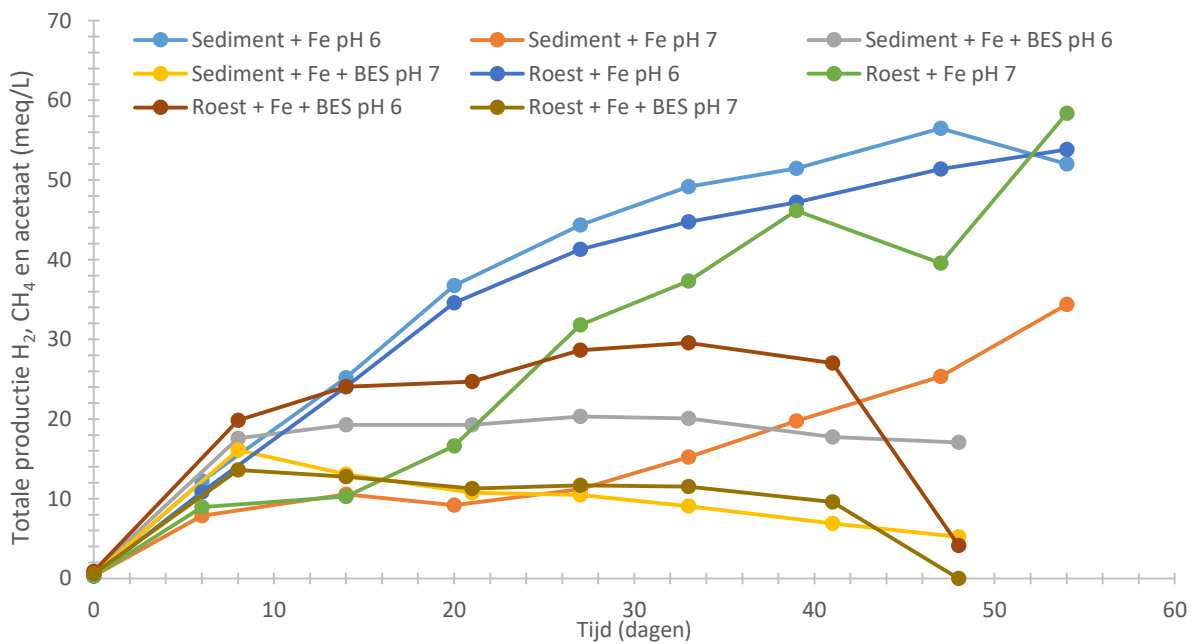
Figuur 21: De totale productie van zowel H₂, CH₄ als acetaat (meq/L) tijdens het volledige experiment bij incubatie op 28°C. De standaarddeviatie wordt weergegeven met n=2.

3.3.3 Transfer 3

De methaanproductie maakt een aanzienlijk deel uit van de totale productie indien BES niet wordt gebruikt. Het methaangehalte is hoger bij pH 6 (Sediment + Fe (8,42 meq/L), Roest + Fe (11,09 meq/L)) dan bij pH 7 (Sediment + Fe (4,66 meq/L), Roest + Fe (8,17 meq/L)). De acetaatproductie is groter in de aanwezigheid van BES en startende van pH 6 (Sediment + Fe (19,26 meq/L), Roest + Fe (20,07 meq/L)) dan pH 7 (Sediment + Fe (13,09 meq/L), Roest + Fe (17,06 meq/L)). Een kleine hoeveelheid H₂ is aanwezig bij Sediment + Fe pH 6 (0,42 meq/L) maar afwezig bij de andere opstellingen met sediment (pH7 en/of BES). H₂ is in grotere mate aanwezig in de afwezigheid van BES bij Roest + Fe pH 6 (1,19 meq/L), Roest + Fe pH 7 (0,40 ± 0,64 meq/L) in vergelijking zonder BES met respectievelijk 0,14 ± 0,11 meq/L en 0,06 ± 0,10 meq/L (Figuur 22).



Figuur 22: Transfer 3: Productie van H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) van transfer 3 na 14 dagen incubatie bij 28°C.



Figuur 23: Totale productie van H₂, CH₄ en acetaat in meq/L gedurende het volledige experiment.

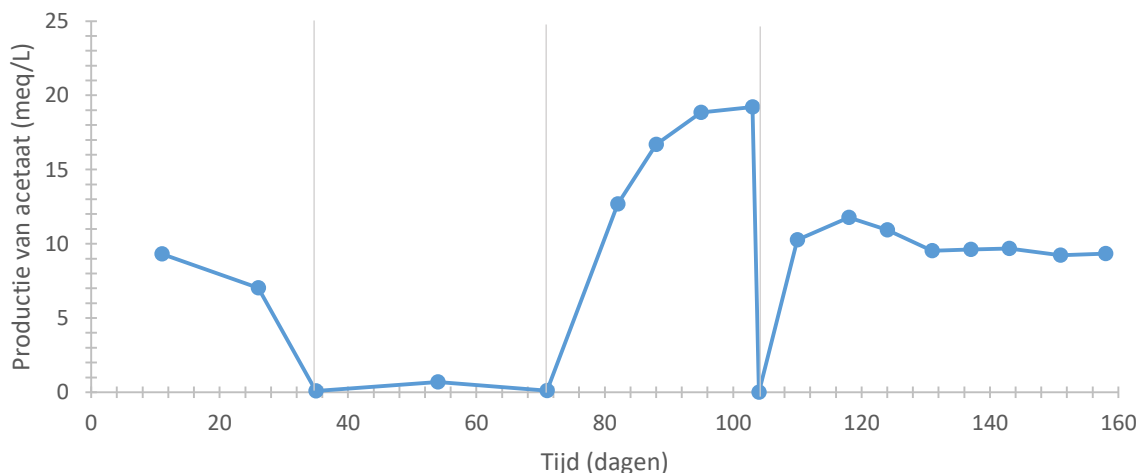
De totale productie van de verschillende componenten H₂, CH₄ en acetaat ligt lager indien gewerkt wordt met BES. Indien gestart wordt bij pH 6 is het totale gehalte hoger dan bij dezelfde proefopstelling bij pH 7 (Figuur 23).

3.3.4 Overzicht van de transfers

De verschillende transfers werden uitgevoerd om een performante cultuur te bekomen. Wanneer de verschillende transfers met BES vergeleken worden is geen grotere productiesnelheid zichtbaar naarmate het aantal transfers. Het gehalte aan geproduceerd acetaat vormt een plateau. Hierdoor werd bij transfer 1 de gasfase geflusht na 63 dagen incubatie. Dit gebeurde iets te laat waardoor de bacteriën zich niet meer konden herstellen en geen hogere acetaatgehaltes geproduceerd werden. Overentent gebeurt het beste na 1 maand incubatie.

Bij alle transfers is een pH stijging zichtbaar (Appendix 7). Indien gestart wordt bij pH 6,2 stijgt de pH naar 7,1, indien gestart wordt bij pH 7,2 stijgt de pH naar 7,7. Deze pH stijging gaat door bij alle transfers en bij alle proefopstellingen.

Globaal gezien kan gesteld worden dat de hoogste productie van acetaat wordt verkregen bij Roest + Fe + BES pH 6 en methaanproductie vooral aanwezig is bij Sediment + Fe pH 7. De totale productie is bij alle transfers het hoogst indien BES niet wordt toegevoegd. De verloren methaanproductie wordt niet gecompenseerd door een voldoende hoge acetaatproductie indien BES aanwezig is.



Figuur 24: Overzicht van de aanrijking van Roest + Fe pH 6. De transfers vonden plaats op dag 35, 71 en 104. Het gehalte aan acetaat wordt weergegeven gedurende het volledige experiment.

3.4 Testen productiesnelheid

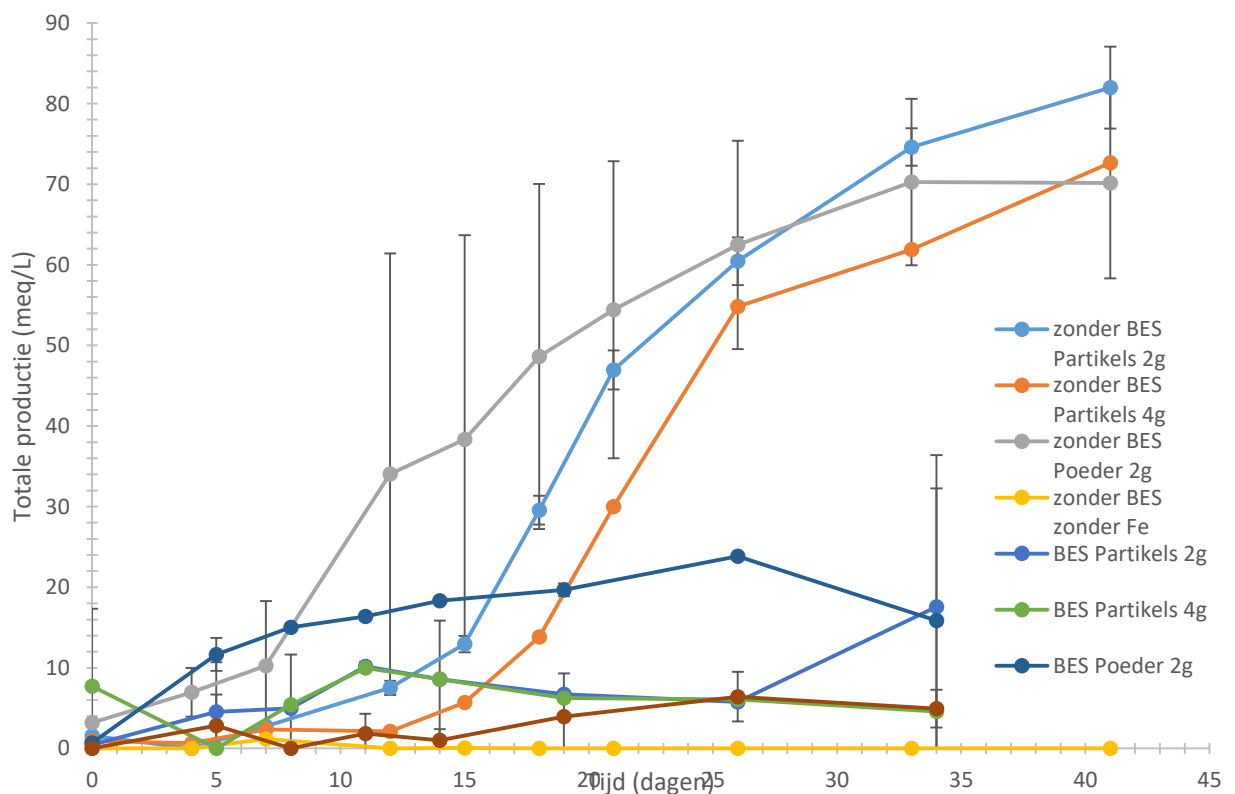
De productiesnelheid werd getest door twee culturen (0,5 mL) van milieustalen transfer 3 over te zetten. Hierbij wordt enkel bij pH 7 gewerkt. Dit omdat bij alle voorgaande transfers een stijging van pH 6 naar 7 waarneembaar was (Appendix 7). Er wordt gestart vanuit een roest incubatie van transfer 3 in de aan- of afwezigheid van BES. Bij de proefopzet zonder BES werd Roest 2 + Fe pH 7 overgezet, bij de opstelling met BES werd Roest 2 + Fe BES pH 7 overgezet. De analyse van zowel de gas- als de vloeistoffase gebeurt twee keer per week.

Tabel 8: Overzicht van de verschillende opstellingen voor het testen van de corrosiesnelheid van anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen bij 28°C. Er werden geen abiotische testen uitgevoerd.

Opstelling	Herhalingen (met en zonder BES)
Fe partikels 2g	2
Fe partikels 4g	2
Fe poeder 2g	2
Zonder Fe	2

De productie is hoger indien BES wordt toegevoegd aan de verschillende opzetten, net zoals bij de transfers te zien is. De totale productie is hoger indien gewerkt wordt met 2g partikels (82 ± 5 meq/L) dan 4g partikels (73 meq/L). De totale concentratie aan geanalyseerde producten is bij poeder 2g 70 ± 12 meq/L.

Wanneer de snelheden vergeleken worden, is de hoogste corrosiesnelheid verkregen bij de opstellingen zonder BES. De snelheden bij partikels 2g (5,67 meq/dag) en 4g (5,12 meq/dag) zijn ongeveer gelijk. De corrosiesnelheid in aanwezigheid van partikels is anderhalve keer hoger dan in de aanwezigheid van poeder (3,48 meq/dag) (Figuur 25). Naast acetaat werden in de vloeistoffase ook sporen van ethanol en 1,2-propaandiol gevonden.



Figuur 25: Totaal gehalte aan geproduceerde H₂, CH₄ en acetaat (meq/L) in de verschillende proefopzetten. De standaarddeviatie wordt weergegeven met n=2.

4. IJzerbepaling

4.1 *S. sphaeroides*

Na 110 dagen incubatie werd de ijzerbepaling uitgevoerd. Het gehalte aan Fe(II) werd bepaald aan de hand van de 1,10-phenantroline methode met een voorafgaande extractie met behulp van een oplossing van HCl (2 M) en hexamethyltetraamine (10% wt/vol). Hierbij wordt duidelijk dat de bekomen en verwachte waarden niet overeenkomen waardoor geen conclusies kunnen getrokken worden.

Tabel 9: Bekomen en verwachte hoeveelheid Fe(II) na 110 dagen incubatie.

	Bekomen gehalte aan Fe(II) (meq/L)	Verwachte gehalte aan Fe(II) (meq/L)
Fe + <i>S. sphaeroides</i>	0,703	61,05
Fe abiotisch	0,770	32,27

4.2 Testen productiesnelheid

Op het einde van het experiment (dag 41) werden de penicillineflesjes geopend en de extractie werd toegepast (Appendix 5). Na 10 dagen werd het gehalte aan Fe(II) bepaald met behulp van de 1,10-phenantroline methode. De bekomen resultaten liggen niet in de lijn van de verwachte resultaten. Er kunnen geen conclusies getrokken worden.

Tabel 10: vergelijking van de bekomen en verwachte hoeveelheid Fe(II) bekomen na extractie.

	Bekomen gehalte aan Fe(II) (meq/L)	Verwachte gehalte aan Fe(II) (meq/L)
Partikels 2g BES	0,74	17,58
Partikels 4g BES	0,44	4,59
Poeder 2g BES	0,17	15,87
Partikels 2g	0,64	81,99
Partikels 4g	0,23	72,67
Poeder 2g	2,06	70,14

Discussie

1. Abiotische corrosie van Fe(0) onder anaerobe omstandigheden

Bij de abiotische proefopzet met PBS waar de verschillende ijzervormen vergeleken werden, is gebleken dat het poeder zorgt voor een beduidend grotere en snellere waterstofproductie dan de partikels. Dit is mogelijks door de grotere oppervlakte-volume ratio. Hierdoor is in verhouding meer oppervlakte aanwezig waardoor er meer Fe kan geoxideerd worden en dus bijgevolg een grotere productie van H₂ mogelijk was. In de literatuur (Kato *et al.*, 2015) werd gewerkt met partikels waardoor het *Clostridium* experiment die op hetzelfde moment werd opgezet, uitgevoerd werd met partikels in plaats van poeder. Ook al bleek later dat de abiotische productie beter verloopt met poeder dan met partikels. Het milieu experiment werd ook uitgevoerd met partikels, in tegenstelling tot het *Sporomusa* experiment dat wel werd uitgevoerd met poeder. Aangezien gewerkt werd met andere ijzerdeeltjes is een vergelijking van beide opstellingen moeilijk te maken. De abiotische corrosie is een tienvoud sneller bij DSMZ 311 *Sporomusa* (betaïne) dan bij DSMZ 879 *C. ljungdahlii*.

De corrosiesnelheid voor de verschillende opstellingen is het laagste bij de abiotische testen die gepaard gaan met de milieustalen. De abiotische corrosie verloopt sneller bij pH 6 dan bij pH 7 en beter bij 28°C dan bij 15°C. Er is geen plateauvorming aanwezig. De hogere productie bij pH 6 kan mogelijks verklaard worden door de hogere aanwezigheid van H⁺ waardoor H₂ sneller gevormd wordt ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$; $E_0' = -0.41\text{V}$).

De resultaten van de abiotische testen komen overeen met de groei van de milieustalen. Aangezien de staalname in november gebeurde was het water van de Coupure ook koud. Hierdoor werd ervoor gekozen om op verschillende temperaturen te werken. Zowel bij 15°C als 28°C is een hogere productie bij pH 6 merkbaar. Gedurende het experiment stijgt de pH van 6,2 (MES) sneller dan bij de opstellingen startende van pH 7,2 (MOPS).

2. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van pure culturen

2.1 *Clostridium ljungdahlii* experiment

Indien Fe(0) voorhanden was als elektrondonor is gebleken dat de productie van H₂ sneller verloopt en hogere waarden bereikt. De waterstofgasproductie van Fe + *C. ljungdahlii* is hoger dan de abiotische controle. Dit zou een indicatie kunnen zijn voor het gebruik van een indirecte methode met H₂ productie als intermediair. Er wordt opgemerkt dat een hoge acetaatproductie aanwezig is indien Fe(0) niet voorhanden is voor *C. ljungdahlii*. Dit is waarschijnlijk door het rijke medium waarin gist extract zit of doordat via de overenting een fractie fructose aanwezig is. De gemiddelde snelheid van de acetaatproductie voor Fe + *C. ljungdahlii* bedraagt 0,40 meq/dag (2,59 mg/L*dag) gedurende de eerste 13 dagen van de incubatie. De productiesnelheid van H₂ van de abiotische controle van *C. ljungdahlii* is 0,0427 meq/dag (0,31 mg/L*dag). De productiesnelheid in de aanwezigheid van Fe(0) als elektrondonor is dus een tienvoud hoger.

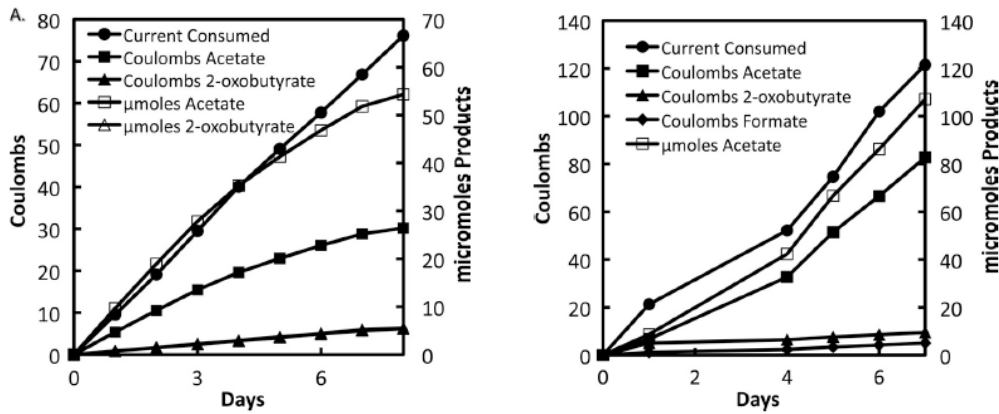
2.2 *Sporomusa sphaeroides* experiment

Door Kato *et al.* (2015) werd aangetoond dat de acetaatproductie van *S. sphaeroides* 8 keer hoger lag dan de abiotische controle. Het gehalte aan Fe(II) dat gegenereerd werd gedurende het experiment van Kato *et al.* (2015) was ook hoger dan het gehalte gegenereerd door de abiotische proefopstelling. Hierdoor werd aangenomen dat *S. sphaeroides* in staat is om te leven door gebruik te maken van Fe(0) als enige elektrondonor. De bekomen resultaten in deze testen kunnen dus ondersteund worden door de literatuur. Eerdere studies (Nevin *et al.*, 2011) toonden ook aan dat electrosynthese met behulp van *S. sphaeroides* hoge gehalten aan acetaat produceert. Hierbij werden $84 \pm 26\%$ van de geconsumeerde elektronen hergebruikt voor de productie van acetaat.

De productie van H₂ is bij de abiotische opzet met Fe ($32,27 \pm 1,67$ meq/L) hoger dan bij Fe + *S. sphaeroides* ($3,33 \pm 2,26$ meq/L). Dit kan een indicatie geven voor het gebruik van H₂ door *S. sphaeroides*. Waardoor kan verondersteld worden dat een indirecte methode gebruikt wordt voor de corrosie van Fe(0). Dit kan mede ondersteund worden door de grotere acetaatproductie in de aanwezigheid van een overmaat H₂ in de gasfase ($211,95 \pm 23,34$ meq/L). Hierbij werd meer dan een drievoud van de productie verkregen dan de proefopzet met Fe(0) als enige elektrondonor.

2.3 Vergelijking *C. ljungdahlii* en *S. sphaeroides*

Nevin *et al.* (2011) vergeleek de acetaatproductie tussen verschillende micro-organismen, o.a. *C. ljungdahlii* en *S. sphaeroides*. Hierbij werd een elektronhergebruik van maar liefst $84 \pm 26\%$ naar acetaat gevonden bij *S. sphaeroides* en $88 \pm 2\%$ bij *C. ljungdahlii*. Er dient gezegd te worden dat deze resultaten bekomen werden met het gebruik van elektroden als elektrondonor. Na 7 dagen electrosynthese was het gehalte aan acetaat dubbel zo hoog bij het gebruik van *C. ljungdahlii* (114 μ mol of 0,13 meq/dag) ten opzichte van *S. sphaeroides* (54 μ mol of 0,06 meq/dag). De elektronentoevoer van *C. ljungdahlii* (115 Coulomb) is na 7 dagen groter dan bij *S. sphaeroides* (60 Coulomb) (Figuur 26).



Figuur 26: (A) Elektronverbruik en productvorming gedurende het experiment voor *S. sphaeroides*. De resultaten zijn het gevolg van 3 replicaten (Nevin *et al.*, 2011). (B) Elektronverbruik en productvorming gedurende het experiment voor *C. ljungdahlii*. De resultaten zijn het gevolg van 3 replicaten (Nevin *et al.*, 2011).

Deze trend komt overeen met de bekomen resultaten in deze studie. De acetaatproductie bij *S. sphaeroides* vertoont een plateau na 41 dagen incubatie bij 50 meq/L. Bij *C. ljungdahlii* wordt deze waarde bereikt bij 21 dagen incubatie. De grootste productie van acetaat is aanwezig bij *C. ljungdahlii*. Dit ligt niet in lijn met de waterstofproductie bij de abiotische controles waardoor kan verondersteld worden dat de acetaatproductie niet afhankelijk is van de hoeveelheid geproduceerd waterstof. De abiotische proefopzet bij *S. sphaeroides* vertoonde een 10 keer snellere productie dan *C. ljungdahlii*. Er dient ook opgemerkt te worden dat de proefopzetten van *C. ljungdahlii* en *S. sphaeroides* doorgingen met verschillende media. Medium DSMZ 311 voor *Sporomusa* (betaine) is een rijker medium dan DSMZ 879 voor *C. ljungdahlii*.

3. Anaerobe corrosie van Fe(0) met behulp van milieustalen

3.1 Proefopzet bij 15°C

Waterstof is enkel aanwezig bij de abiotische controles. Hierdoor kan verondersteld worden dat het geproduceerde H₂, gevormd in de andere opstellingen, gebruikt wordt door de micro-organismen waardoor ze acetaat produceren via een indirect mechanisme. De proefopstellingen waarbij zowel Fe(0) als micro-organismen aanwezig waren, vertonen een groot gehalte aan geproduceerd acetaat (~ 59 mg/L). Bij de incubaties van Roest + Fe pH 6 is een stijging van methaan waar te nemen na de acetaataccumulatie. Bij dezelfde opstelling bij pH 7 blijft een stijging van het gehalte methaan en acetaat doorgaan. De opstellingen met sediment en ijzer vertonen ook eerst een acetaatproductie en nadien een methaanproductie. Indien BES toegevoegd zou worden aan de transfers, zou de methaanproductie niet meer doorgaan. De snelheid van acetaatproductie lag gedurende het volledige experiment hoger bij de incubaties dan bij de abiotische controle waardoor een acetaatproductie, gelinkt aan het gebruik van Fe(0) al enige elektrondonor kan aangenomen worden als hoofdzakelijk metabolisch proces.

De hoogste acetaatproductie was aanwezig indien gestart werd vanaf pH 6,2 (MES). Gedurende het experiment stijgt de pH naar 7,1. Dit komt overeen met de gemeten pH van het oorspronkelijk milieu waarin de micro-organismen uit afkomstig zijn. Indien gestart wordt bij pH 7,2 (MOPS) stijgt de pH naar 7,7. Een mogelijkheid bestaat erin dat de levensomstandigheden van de Coupure niet ideaal zijn voor de bacteriën. Het zou kunnen dat pH 7,17 (van de Coupure) niet overeenkomt met hun pH-optimum maar dat dit eerder ligt rond pH 6-6,5.

3.2 Proefopzet bij 28°C

Bij de proefopzet bij 28°C neemt de methaanproductie de overhand in alle opstellingen. Voornamelijk in de stalen met sediment. Het sediment is afkomstig van de nabijheid van de fietsen maar aangezien deze micro-organismen naast het ijzer van de fiets ook nog andere mogelijke elektrondonors in hun omgeving hadden, is de kans groter dat ze minder Fe(0) gebruiken als elektrondonor. Bij de roeststalen is de snelheid van acetaatproductie niet uitsluitend sneller dan de abiotische controles waardoor niet kan verondersteld worden dat Fe(0) gebruikt wordt als elektrondonor als hoofdzakelijk mechanisme in het metabolische proces. Een verdere aanrijking van de stalen was dus noodzakelijk om een beter zicht te krijgen op de situatie.

In tegenstelling tot de proefopzet bij 15°C, is de hoogste acetaatproductie aanwezig indien gestart werd vanaf pH 7,2 (MOPS). Gedurende het experiment stijgt de pH naar 8,9. De beginwaarde komt overeen met de gemeten pH van het oorspronkelijk milieu waarin de micro-organismen uit afkomstig zijn. Indien gestart wordt bij pH 6,2 (MES) stijgt de pH naar 7,3. Bij de proefopstelling bij 28°C is een grotere methaanproductie waardoor aangenomen kan worden dat het gehalte aan methanogene archaea groter is bij 28°C dan bij incubatie bij 15°C. Een andere mogelijkheid bestaat erin dat de methanogenen bij 28°C sneller werken dan bij 15°C. Methanogenese gaat gepaard met een grotere pH-stijging dan acetogenese en dit is merkbaar aan de resultaten.



3.3 Transfers

Vanaf de transfers werd BES toegevoegd aan de helft van de opstellingen. Hierdoor werd de accumulatie van methanogenen verhinderd. Aangezien het doel van dit onderzoek gericht is op acetaatproductie wordt vooral gekeken naar acetogenese in plaats van methanogenese.

Bij transfer 2 is de gemiddelde productiesnelheid gedurende de eerste 14 dagen (nadien is er sprake van plateauvorming) van de opstellingen met BES hoger (1,64 meq/dag bij Sediment + Fe+ BES pH 6, 0,77 meq/dag bij Roest + Fe + BES pH 6, 1,15 meq/dag voor Sediment + Fe

+ BES pH7 en 1,03 meq/dag bij Roest + Fe + BES pH 7) dan de respectievelijke abiotische proefopstelling (0,06 meq/dag bij pH 6 en 0,02 meq/dag bij pH 7). Deze bevindingen kunnen impliceren dat de acetaatproductie met Fe(0) als elektrondonor verantwoordelijk is voor het metabolisch proces van de aanwezige micro-organismen.

Tabel 11: Gemiddelde productiesnelheden (meq/dag) van de opstellingen met BES van transfer 2 gedurende de eerste 14 dagen van het experiment.

Proefopstelling	Gemiddelde productiesnelheid
Sediment + Fe+ BES pH 6	1,64 meq/dag
Sediment + Fe + BES pH7	1,15 meq/dag
Roest + Fe + BES pH 6	0,77 meq/dag
Roest + Fe + BES pH 7	1,03 meq/dag

Deze trend wordt ondersteund door de resultaten bekomen met transfer 3. De gemiddelde groeisnelheid gedurende de eerste 14 dagen is hoger wanneer gestart wordt bij pH 6 en is 25 keer sneller dan de abiotische controle. Bij pH 7 is de totale productie 4 keer sneller dan de abiotische proefopzet.

Kato *et al.* (2015) deed ditzelfde onderzoek met milieustalen afkomstig van rijstvelden. Deze micro-organismen vertoonden dezelfde trend in de acetaatproductie indien BES werd toegevoegd aan de opstelling. Door het toevoegen van BES aan de aanrijkingen, werd methanogenese teruggedrongen en steeg de acetaatproductie geleidelijk. Aangezien BES ervoor zorgt dat de groei van methanogene archaea tegengehouden wordt, stijgt het aandeel van de acetogenen bacteriën in de aanrijkingen. Door een groeiende hoeveelheid acetogenen is een grotere acetaatproductie mogelijk.

3.4 Testen productiesnelheid

De productiesnelheden zijn hoger indien gewerkt wordt zonder BES. Wanneer de verschillende hoeveelheden ijzer vergeleken worden zijn geen duidelijke verschillen merkbaar. Eerst is de totale productie met behulp van Fe(0) poeder hoger dan bij Fe(0) partikels. Maar na ongeveer 30 dagen wordt dit ingehaald door de partikels. Dat kan mogelijk te verklaren zijn door de koekvorming die optreedt bij het poeder. Door de koekvorming wordt het voordeel van de oppervlakte-volume ratio (zoals bij de abiotische testen) teniet gedaan. Dit is ook merkbaar wanneer gekeken wordt naar de productiesnelheid gedurende de eerste 14 dagen van het experiment is de productiesnelheid bij de opstelling met poeder hoger maar na 2 weken incubatie is de productiesnelheid in aanwezigheid van partikels anderhalve keer hoger dan in de aanwezigheid van poeder.

Indien BES niet wordt toegevoegd ligt de totale productie hoger door de vorming van methaan. De acetaatvorming is niet in staat dit verlies te compenseren wanneer BES wordt toegevoegd.

4. IJzerbepaling

4.1 *S. sphaeroides*

Zoals reeds aangegeven vertonen de resultaten die behaald werden met behulp van de 1,10-phenantroline methode, geen gelijkenissen met de verwachtingen. Nochtans werd hetzelfde protocol gebruikt zoals beschreven door Lovely *et al.* (1987) en gebruikt door Kato *et al.* (2015). Hierbij werd vastgesteld dat moeilijkheden zich vooral voordeden door koekvorming door de vorming van een biofilm op de ijzerdeeltjes. De korst plakte aan de penicillineflesjes waardoor volledige extractie waarschijnlijk niet haalbaar was. Een ander probleem stelde zich doordat in de aerobe omstandigheden het ijzer corrodeerde op de flesjes waardoor deze ook niet in oplossing raakten. Dit kan de lage bekomen waarden verklaren. Betere waarden kunnen mogelijks bekomen worden door de flesjes op een schudplaat te zetten gedurende de volledige extractie. Om ijzercorrosie in aerobe omstandigheden te vermijden kan het extractieproces ook uitgevoerd worden in een anaerobe kamer.

Deze proefopstelling is identiek aan de proefopstelling van *S. sphaeroides* beschreven in Kato *et al.* (2015). De geaccumuleerde hoeveelheid Fe(II) na 40 dagen bij Kato *et al.* (2015) is ongeveer 18 meq/L.

4.2 Testen productiesnelheid

Na analyse van het Fe(II)gehalte met behulp van de 1,10-phenantroline methode werd duidelijk dat de bekomen resultaten niet overeenkwamen met de verwachte waarde. Dit is waarschijnlijk het gevolg van een onvoldoende extractie. Extractie gebeurde aan de hand van 2 M HCl, die 0,67 M hexamethyleentetraamine bevatte. Deze extractie duurde ongeveer 10 dagen (tot een kleurloze vloeistof bekomen werd). Er was vooral een probleem door de koek die ontstond gedurende het experiment. Hierdoor werd een volledige extractie van Fe(II) bemoeilijkt door de biofilm die rond de partikels gevormd werd. Daarnaast stelde zich ook een probleem doordat roest zich vasthechtte aan de penicillineflesjes. Hierdoor waren onvoldoende ijzerpartikels echt in oplossing waardoor de analyse afwijkende resultaten gaf. Nadat de extractie al 6 dagen bezig was, werd besloten om de helft van de flesjes op de schudplaat te zetten zodat mogelijks een betere extractie zou verlopen. Na analyse werd een klein verschil merkbaar (variërend van 0,2 tot 1 meq/L) tussen de flesjes die wel dan niet op de schudplaat stonden de laatste 4 dagen. Extractie bij schudden vertoont betere resultaten.

Algemeen besluit

Kunnen de gekende homo-acetogene bacteriën C. ljungdahlii en S. sphaeroides nulwaardig ijzer oxideren?

Groei van beide bacteriën met als enige elektrondonor Fe(0) is mogelijk. Dit gaat gepaard met een productie van waterstof en acetaat. Bij *C. ljungdahlii* is de productiesnelheid maar liefst 10 keer sneller in de aanwezigheid van Fe(0) als elektrondonor in vergelijking met de abiotische proefopstelling. De gemiddelde productiesnelheid van *S. sphaeroides* in de aanwezigheid van Fe(0) als enige elektrondonor is een drievoud hoger dan bij de abiotische controle.

Kan een milieustaal aangerijkt worden met ijzeroxiderende bacteriën?

De opeenvolgende transfers tonen aan dat een aanrijking van ijzeroxiderende bacteriën mogelijk is. Door het toevoegen van BES aan de aanrijkingen, werd methanogenese teruggedrongen en steeg de acetaatproductie geleidelijk. Aangezien BES ervoor zorgt dat de groei van methanogene archaea tegengehouden wordt, stijgt het aandeel van de acetogenen bacteriën in de aanrijkingen. Door een groeiende hoeveelheid acetogenen is een grotere acetaatproductie mogelijk. De gemiddelde productiesnelheid van de opstellingen met BES is hoger dan de respectievelijke abiotische proefopstelling. Deze bevindingen kunnen impliceren dat de acetaatproductie met Fe(0) als elektrondonor verantwoordelijk is voor het metabolisch proces van de aanwezige micro-organismen.

Is er een effect te merken in verband met de exacte locatie van de staalname?

Globaal gezien kan gesteld worden dat de hoogste productie van acetaat wordt verkregen bij Roest + Fe + BES pH 6 en methaanproductie vooral aanwezig is bij Sediment + Fe pH 7. De totale productie is bij alle transfers het hoogst indien BES niet wordt toegevoegd. De verloren methaanproductie wordt niet gecompenseerd door een voldoende hoge acetaatproductie indien BES aanwezig is.

Is er een effect van de pH?

De hoogste totale productie komt voor indien gestart wordt bij pH 6,2 in plaats van 7,2. Naargelang het experiment loopt, stijgt de pH ook. Bij een lage pH is een hoger gehalte aan protonen aanwezig waardoor meer H₂ gegenereerd wordt. Indien de bacteriën gebruik maken van een indirect mechanisme met H₂ is de lage pH dus een voordeel.

Is er een effect van de partikelgrootte van Fe(0)?

Wanneer de verschillende hoeveelheden ijzer vergeleken worden zijn geen duidelijke verschillen merkbaar. Eerst is de totale productie met behulp van Fe(0) poeder hoger dan bij Fe(0) partikels. Maar na ongeveer 30 dagen wordt dit ingehaald door de partikels. Dat kan mogelijk te verklaren zijn door de koekvorming die optreedt bij het poeder waardoor het voordeel van de oppervlakte-volume ratio teniet gedaan. Indien BES niet werd toegevoegd ligt de totale productie hoger door de vorming van methaan. De acetaatvorming is niet in staat dit verlies te compenseren wanneer BES wordt toegevoegd.

Wat is de beste manier om Fe(II)/Fe(III) te bepalen?

Verschillende manieren werden uitgeprobeerd en hierbij ging een voorkeur uit naar de methode met 1,10-phenantroline. De resultaten komen nog niet overeen met de verwachte waarde maar dit is wellicht te wijten aan de onvolledige extractie. Indien de extractie verder geoptimaliseerd wordt, is een goede bepaling zeker mogelijk.

Toekomstperspectieven

Verder onderzoek is vereist om een grotere kennis op te doen van de verschillende mechanismen en om de optimale condities te kennen van de verschillende micro-organismen. Een uitgebreidere kennis van hun mechanismen biedt een bredere kijk op de mogelijke toepassingen. De testen dienen ook herhaald te worden vooraleer hun resultaten statistisch kunnen vergeleken worden.

Het DNA van de milieustalen afkomstig uit de Coupure werden nog niet onderzocht. Met het doel een DNA analyse uit te voeren werden regelmatig stalen genomen en bewaard in de diepvries. Hierdoor kan, in geval van goede resultaten gedurende de verschillende transfers en eventuele andere opstellingen, de identiteit van het micro-organisme achterhaald worden.

Voorlopig werd tijdens de proeven gewerkt met Fe(0) als elektrondonor. Aangezien deze manier van elektrondonatie mooie resultaten oplevert, bestaat er een mogelijkheid dat de opgegroeide culturen ook dienst kunnen doen in MES. Verder onderzoek dient gedaan te worden om te achterhalen indien de acetogene bacteriën die de mogelijkheid bezitten om ijzer te corroderen, ook in staat zijn om elektronen op te nemen aan een electrode.

Een verdere optimalisatie van de ijzerbepaling zou handig zijn om een beter inzicht te krijgen op de elektronenstroom.

Duurzaamheid

Na een volledig academiejaar enkele dagen per week in hetzelfde labo door te brengen leer je de werking goed kennen. Een onderzoekscentrum met een groot aantal researchers vraagt duidelijke afspraken en een goede naleving van deze regels.

Duurzaamheid kan je verhogen door minder verbruik. Een voorbeeld hiervan zou zijn om minder plastic materiaal onmiddellijk weg te gooien maar te wassen en te hergebruiken. Weegschuitjes kunnen in sommige gevallen hergebruikt worden, het verbruik van nieuwe handschoenen kan ingeperkt worden,... Ik deed bijvoorbeeld altijd handschoenen in een iets grotere maat aan waardoor het makkelijk was om ze na het afdoen (bijvoorbeeld omdat je even heen en terug naar een ander labo moest), opnieuw aan te krijgen.

De huidige TL-lampen zijn gemakkelijk te vervangen door LED-verlichting wat kan met het behoud van de huidige armaturen. Dit kan een vermindering van 75% van het huidige energieverbruik teweegbrengen. Door de verlichting op te delen kan het verbruik nog dalen. Bij een gedeeltelijk gebruik van het labo is het duurzamer om ook maar een gedeelte te verlichten.

Mijn volgende punt handelt over de volledige A-blok en niet enkel over CMET. Een groot verlies wordt gegenereerd door de slechte beglazing. Ik veronderstel dat, indien er nieuwe ramen gestoken worden, een groot deel van de verwarmingskosten zou wegvallen. Dit is niet enkel beter voor het milieu maar ook voor de economische doeleinden!

Het energieverbruik kan groener gemaakt worden door het plaatsen van zonnepanelen of zonnecellen op het dak. Dit kan gebruikt worden voor de werking van de frigo's, diepvriezers en andere elektrische toestellen.

Als laatste puntje wil ik nog aanhalen dat duurzaamheid niet enkel over energie maar ook over het comfort van de gebruiker gaat. In dit kader wil ik graag aanhalen dat een langere ketting voor de sleutel van de deur van de stock handig zou zijn. De ketting is net iets te kort om deze gemakkelijk te gebruiken.

Referentielijst

- Aulenta, F., Reale, P., Catervi, A., Panero, S., Majone, M., 2008. Kinetics of trichlorethene dechlorination and methane formation by a mixed anaerobic culture in a bio-electrochemical system. *Electrochimica Acta* 53, 5300–5305.
- Bengelsdorf, F.R., Straub, M., Durre, P., 2013. Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environmental Technology* 34, 1639-1651.
- Bond, D., Lovley, D.R., 2003. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied Environmental Microbiology* 69, 1548-1555.
- Bretschger, O., Gorby Y.A., Nealson K.H., 2010. Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application, hoofdstuk 5, pag. 81–100. *Integrated Environmental Technology Series*. IWA Publishing.
- Busalmen, J.P., Esteve-Nunez, A., Berna, A., Feliu, J.M., 2008. C-type cytochromes wire electricity-producing bacteria to electrodes. *Angewandte Chemie International Edition* 47, 4874–77.
- Callbeck, C. M., Agrawa, I A., Voordouw, G., 2013. Acetate production from oil under sulfate-reducing conditions in bioreactors injected with sulfate and nitrate. *Applied Environmental Microbiology*. 79, 5059–5068.
- Cheng, I.F., Muftikian, R., Fernando, Q., Korte, N., 1997. Reduction of nitrate to ammonia by zero-valent iron. *Chemosphere* 35, 2689–2695.
- Daniels, L., Belay, N., Rajagopal, B.S., Weimer, P.J., 1987. Bacterial methanogenesis and growth from CO₂ with elemental iron as the sole source of electrons. *Science* 237, 509-511.
- Deutzmann, J.S., Sahin, M., Spormann, A.M., 2015. Extracellular enzymes Facilitate Electron Uptake in Biocorrosion and Bioelectrosynthesis. *MBio* 2, 1-8.
- Dinh, H.T., Kuever, j., Mussmann, M., Hssel, A.W., Stratmann, M., Widdel, F., 2004. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature* 427, 829-832.
- Drake, H.L., Gossner, A.S., Daniel, S.L., 2008. Old acetogens, new light. In: Wiegel, J., Maier, R.J., Adams, M.W.W. (Eds.). *Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 100-128.
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008. Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta* 53, 2494-2500.
- Dobrindt, U., Blaut, M., 1996. Purification and characterization of a membrane-bound hydrogenase from *Sporomusa sphaeroides* involved in energy-transducing electron transport. *Archives of Microbiology* 165, 141-147.
- Enning, D., Garrelfs, J., 2014. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: New views of an old problem. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1226-1236.

- Enning, D., Venzlaff, H., Garrelfs, J., Dinh, H.T., Meyer, V., Mayrhofer, K., Hassel, A.W., Stratmann, M., Widdel, F., 2012. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. *Environmental Microbiology* 14, 1772-1787.
- Ganigue, R., Puig, S., Battle-Vilanova, P., Balaguer, M.D., Colprim, J., 2015. Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide. *Chemical communications* 51, 15, 3235-3238.
- Gellings, P.J., Ijsseling, F.P., 1985. *Corrosie en corrosiebestrijding*. Nederlands Corrosie Centrum (NCC).
- George, R., 2012. Current understanding and future approaches for controlling microbially influenced concrete corrosion: A review. *Concrete Research Letters*, 3(3).
- Gregory, K.B., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology* 6, 596-604.
- Gregory, K.B., Lovley, D.R., 2005. Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8943–47.
- Gildemyn, S., Verbeeck, K., Slabbinck, R., Andersen, S.J., PrévotEAU, A., Rabaey, K., 2015. Integrated Production, Extraction, and Concentration of Acetic Acid from CO₂ through Microbial Electrosynthesis, *Environmental Science & Technology Letters*.
- Hugenholtz, J., Ljungdahl, L.G., 1989. Electron-transport and electrochemical proton gradient in membrane-vesicles of *Clostridium thermoautotrophicum*. *Journal of Bacteriology* 171, 2873-2875.
- Iino, T., Ito, K., Wakai, S., Tsurumaru, H., Ohkuma, M., Harayama, S., 2015. Iron Corrosion Induced by Nonhydrogenotrophic Nitrate-Reducing *Prolixibacter* sp. Strain MIC1-1. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1839-1846.
- Kato, S., Yumoto, I., Kamagata, Y., 2015. Isolation of acetogenic bacteria that induce biocorrosion by utilizing metallic iron as the sole electron donor. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 67-73.
- Koch, G., Brongers, M., Thompson, N., Virmani, Y., Payer, J., 2002. Corrosion cost and preventive strategies in the united states. Technical report, Turner-Fairbank Highway Research Center.
- Kopke, M., Mihalcea, C., Liew, F.M., Tizard, J.H., Ali, M.S., Conolly, J.J., Is-Sinawi, B., Simpson, S.D., 2011. 2,3-Butanediol Production by Acetogenic Bacteria, an Alternative Route to Chemical Synthesis, Using Industrial waste Gas. *Applied Environmental Microbiology* 77, 5467-5475.
- Lee, A.K., Newman, D.K., 2003. Microbial iron respiration: impact on corrosion processes. *Applied Microbial Biotechnology* 62, 134-139.

- Liang, R., grizzle, R.S., Duncan, K.E., McInerney, M.J., Suflita, J.M., 2014. Roles of thermophilic thiosulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Frontiers in Microbiology* 5, 89.
- Lohner, S.T., Deutzmann, J.S., Logan, B.E., Leigh, J., Spormann, A.M., 2014. Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Isme Journal* 8, 1673-1681.
- Lovley, D.R., 2008. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current opinion in Biotechnology* 19, 564-571.
- Lovley, D.R., 2011. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environmental Microbiology Reports* 3, 27-35.
- Lovley, D.R., Philips, E.J., 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Applied Environmental Microbiology* 53, 1536-1540.
- Lovley, D.R., Ueki, T., Malvankar, N.S., Shrestha, P.M. Flanagan, K.A., Aklujkar, M., Butler, J.E., Giloteaux, L., Rotaru, A.E., Holmes, D.E., Franks, A.E., Orellana, R., Risso, C., Nevin, K.P., 2011. *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology and practical applications. *Advances in Microbial physiology* 59, 1-100.
- Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Leang, C., et al. 2011. Tunable metallic-like conductivity in nanostructured biofilms comprised of microbial nanowires. *National Nanotechnology*. 6, 573–79.
- McBeth, J.M., Little, B.J., Ray, R.I., Farrar, K.M., Emerson, D., 2011. Neutrophilic iron-oxidizing “Zetaproteobacteria” and mild steel corrosion in nearshore marine environments. *Applied Environmental Microbiology* 77, 1405–1412.
- Mehanna, M., Basseguy, R., Delia, M.-L., Bergel, A., 2009. Effect of *Geobacter sulfurreducens* on the microbial corrosion of mild steel, ferritic and austenitic stainless steels. *Corrosion Science* 51, 2596-2604.
- Mehanna, M., Basseguy, R., Delia, M.-L., Bergel, A., 2009. Role of direct microbial electron transfer in corrosion of steels. *Electrochemistry Communications* 11, 568-571.
- Mori, K., Tsurumaru, H., Harayama, S., 2010. Iron corrosion activity of anaerobic hydrogen-consuming microorganisms isolated from oil facilities. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110, 426-430.
- Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., Sneoyenbos-West, O.L., Lovley, D.R., 2011. Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2882-2886.

- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M., Lovley, D.R., 2010. Microbial electrosynthesis: Feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *Mbio* 1.
- Nielsen, P.H., 1991. Sulfur sources for hydrogen-sulfide production in biofilms from sewer systems. *Water Science and Technology* 23, 1265-1274.
- Rakshit, S., Matocha, C.J., Haszler, G.R., 2005. Nitrate reduction in the presence of wüstite. *Journal of Environmental Quality* 34, 1286–1292.
- Rabaey, K., Rozendal, R.A., 2010. Microbial electrosynthesis – revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology* 8, 706-716.
- Ragsdale, S.W., Pierce, E., 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784(12), 1873-1898.
- Rao, T., 2012. *Microbial Fouling and Corrosion: Fundamentals and Mechanisms*, chapter 6, pages 95–126. Springer US.
- Strycharz, S.M., Gannon, S.M., Boles, A.R., Nevin, K.P., Franks, A.E., Lovley, D.R., 2010. *Anaeromyxobacter dehalogenans* interacts with a poised graphite electrode for reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Environmental Microbiology. Rep.* , 289–294.
- Thrash, J.C., Coates, J.D., 2008. Review: Direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. *Environmental Science & Technology* 42, 3921-3931.
- Uchiyama, T., Ito, K., Mori, K., Tsurumaru, H., Harayama, S., 2010. Iron-corroding methanogene isolated from crude-oil storage tank. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1783-1788.
- Ueki, T., Nevin, K.P., Woodard, T.L., Lovley, D.R., 2014. Converting carbon dioxide to butyrate with an engineered strain of *Clostridium ljungdahlii*. *Mbio* 5,10.
- Veloza, A. M., 2013. Determination by ferrozine assay. Cohen Geochemistry Research Group, University of Leeds. (<https://www.youtube.com/watch?v=m3T6PTfVtx0>)
- Venzlaff, H., Enning, D., Srinivasan, J., Mayrhofer, K.J.J., Hassel, A.W., Widdel, F., Stratmann, M., 2013. Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria. *Corrosion science* 66, 88-96.

Appendices

Appendix 1: 1X Phosphate Buffered Saline (PBS buffer)

Per liter mQ:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

pH aanpassen naar 7,4 met HCl

Steriliseren met behulp van autoclaving

Dit wordt PBS 10 mM genoemd omdat de hoofdcomponent Na₂HPO₄ is. De buffer bevat 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ en 2 mM KH₂PO₄.

Appendix 2: DSMZ 879 aangepast medium voor de aanrijking van acetogenen

Per liter mQ:

Zoutstockoplossing (100 g/L NH ₄ Cl, 10 g/L KCl, 80 g/L NaCl, 10 g/L KH ₂ PO ₄)	10 mL
MgCl ₂ (from 7.7 g/L stock solution)	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (2 g/L stock solution)	10 mL
DL vitaminen	10 mL
HA sporenelementen	1 mL
HA tungstate-selenite oplossing	0.1 mL
Gistextract (granulated, Fisher Scientific, BP9727-500)	0.1 g

Medium koken en laten afkoelen onder N₂/CO₂ (90/10) atmosfeer.

Verdeel het medium over de verschillend flesjes en sluit met behulp van een zachte butyl-rubberen stopper. Flush.

Autoclaveer.

Voeg na autoclaving toe aan 100 mL medium:

- NaHCO₃: 1 mL van 0.2 M stockoplossing (anaeroob en geautoclaveerd) (finale concentratie 2 mM) voor pH 6.2
- Of
- NaHCO₃: 1.7 mL van 1.2M (100 g/L) NaHCO₃ (anaeroob en geautoclaveerd) (finale concentratie 20 mM) voor pH 7.2
- MOPS: 5 mL van 1 M stockoplossing (pH 7.2, anaeroob en filtergesteriliseerd), (finale concentratie: 50 mM, finale buffercapaciteit: 25 mM) voor pH 7.2
- Of
- MES: 5 mL van 1 M stockoplossing (pH 6.2, anaeroob en filtergesteriliseerd), (finale concentratie: 50 mM, finale buffercapaciteit: 25 mM) voor pH 6.2
- Eventueel BES: 0.4 mL van 0.5M oplossing (finale concentratie is 5 mM)

1 M MOPS ((3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (pH 7.2)

Weeg 20.9 g voor 100 ml oplossing

Oplossen in mQ

Gebruik 10M NaOH om verder op te lossen en de pH aan te passen naar 7,2

Breng finaal volume tot 100 mL

Bubble met N₂ en filtersteriliseer

1 M MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) (pH 6.2)

Weeg 19.5 g voor 100 ml oplossing

Oplossen in mQ

Gebruik 10M NaOH om verder op te lossen en de pH aan te passen naar 6,2

Breng finaal volume tot 100 mL

Bubble met N₂ en filtersteriliseer

0.5 M BES (2-bromoethanesulfonate)

Weeg 4.73 g voor 50 mL oplossing

Oplossen in mQ

Bubble met N₂ en filtersteriliseer

0.2 M NaHCO₃ stockoplossing

Weeg 1.68 g voor 100 mL oplossing

Oplossen in mQ

Bubble met N₂ /CO₂ en autoclaveer

1.2 M NaHCO₃ stockoplossing

Weeg 10 g voor 100 mL oplossing

Oplossen in mQ

Bubble met N₂ /CO₂ en autoclaveer

Appendix 3: DSMZ 311 medium voor *Sporomusa* (Betaïne)

Per liter mQ:

NaCl	2.25 g
NH ₄ Cl	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.35 g
KH ₂ PO ₄	0.23 g
Gistextract (granulated, Fisher Scientific, BP9727-500)	1 g
MgCl ₂ (7.7 g/L stockoplossing)	25 mL
(origineel protocol gebruikt MgSO ₄ , vervangen om een teveel aan sulfaat te vermijden)	
CaCl ₂ ·2H ₂ O (2 g/L stockoplossing)	125 mL
DL vitaminen	10 mL
HA sporenelementen	1 mL
HA tungstate-selenite oplossing	0.1 mL

Medium koken en laten afkoelen onder N₂/CO₂ (90/10) atmosfeer.

Verdeel het medium over de verschillend flesjes en sluit met behulp van een zachte butyl-rubberen stopper. Flush.

Autoclaveer.

Voeg na autoclaving toe aan 100 mL medium:

- Cysteïne HCl: 0.1 mL van 0.1 M stockoplossing pH 7 (15.76 g/L) (anaeroob en filtergesteriliseerd) (finale concentratie 1 mM)
- NaHCO₃: 1.7 mL van 1.2M (100 g/L) NaHCO₃ (anaeroob en geautoclaveerd) (finale concentratie 20 mM)
- Betaïne (=trimethylglycine): 0.5 mL van 100 g/L stockoplossing (anaeroob en filtergesteriliseerd) (finale concentratie 5 g/L)

Appendix 4: DSMZ 879 medium voor *Clostridium ljungdahlii*

Per liter mQ:

Zoutstockoplossing (100 g/L NH ₄ Cl, 10 g/L KCl, 80 g/L NaCl, 10 g/L KH ₂ PO ₄)	10 mL
MgCl ₂ (7.7 g/L stockoplossing)	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (2 g/L stockoplossing)	10 mL
DL vitaminen	10 mL
Sporenelementen 141	10 mL
Gistextract (granulated, Fisher Scientific, BP9727-500)	1 g
Na ₂ WO ₄ (0.25 g/L)	0.8 mL

Medium koken en laten afkoelen onder N₂/CO₂ (90/10) atmosfeer.

Verdeel het medium over de verschillend flesjes en sluit met behulp van een zachte butyl-rubberen stopper. Flush.

Autoclaveer.

Voeg na autoclavering toe aan 100 mL medium:

- NaHCO₃: 1 mL van 0.2 M stockoplossing (anaeroob en geautoclaveerd) (finale concentratie 2 mM)
- Cystein HCl: 1 mL van 0.1 M stockoplossing van pH 7 (15.76 g/L) (anaeroob en filtergesteriliseerd) (finale concentratie 1 mM)

Appendix 5: Fe(II)extractie

De ijzerextractie wordt uitgevoerd met behulp van een oplossing van 2M HCl met 0,67M hexamine (hexamethyleentetraamine). Aan het staal wordt een gelijke hoeveelheid extractiemiddel toegevoegd in de trekkast. De extractie verloopt tot een kleurloze oplossing overblijft. Dit kan zo'n 10 dagen in beslag nemen. Na de extractie wordt de 1,10-phenantroline methode toegepast om het gehalte Fe(II) te bepalen.

Appendix 6: Meting van opgelost ijzer (referentie: ISO 6332)

Basis van de meting:

Fe(II) vormt een gekleurd complex met 1,10-phenantroline. De absorptie van dit complex, gemeten bij 510 nm is proportioneel aan de Fe(II) concentratie.

Het totaal gehalte aan ijzer kan gemeten worden na Fe(III) reductie met ascorbinezuur tot Fe(II). De Fe(III) concentratie kan berekend worden als het verschil van het totaal gehalte aan ijzer en Fe(II).

Reagentia:

1,10-phenantroline: 1 g/L oplossing

acetaat/azijnzuur buffer: 62.5 g ammonium acetaat + 175 mL azijnzuur → aanlengen tot 250 mL

ascorbinezuur: vast, poeder

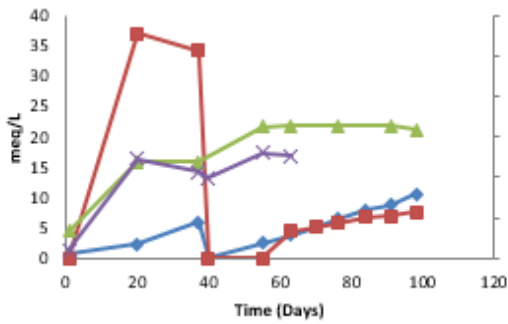
Meting:

- 1) Zet de spectrofotometer aan op een absorptie golflengte van 510 nm
- 2) Gebruik gedestilleerd water als blanco
- 3) Filter het staal
- 4) Staalbereiding: 8 mL staal + 2 mL 1,10-phenantroline + 2 mL acetaat/azijnzuur buffer
- 5) Meet het staal bij 510 nm → Fe(II) concentratie
- 6) Voeg 1-2 spatelpuntjes ascorbinezuur toe
- 7) Meet het staal bij 510 nm → totale ijzerconcentratie

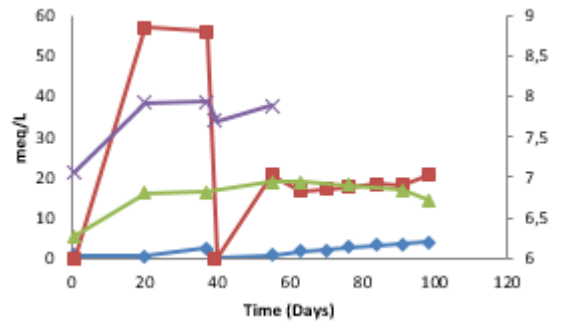
Appendix 7: Overzicht van de transfers bij 28°C

Transfer 1

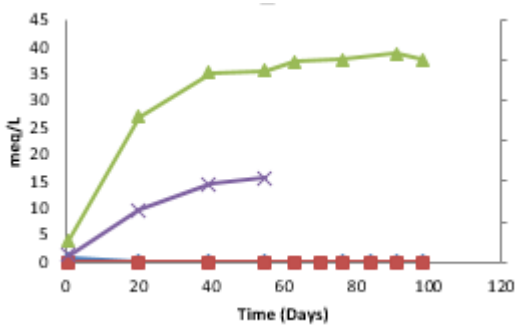
Legende: H₂ (blauw), methaan (rood), acetaat (groen), pH (paars)



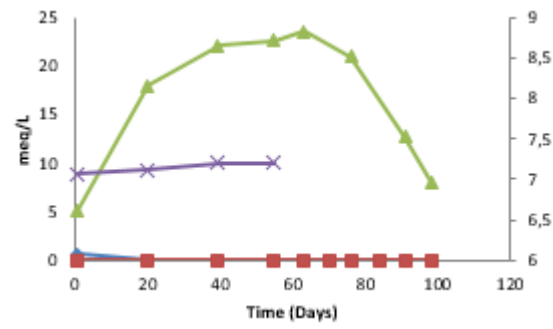
Figuur 28: Sediment + Fe pH 6



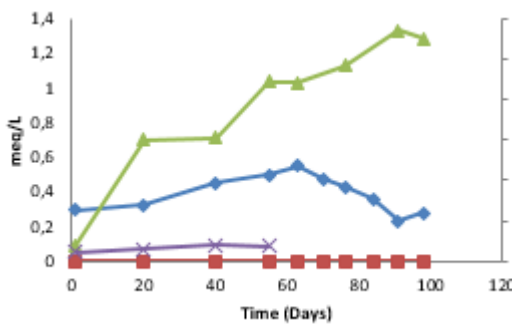
Figuur 27: Sediment + Fe pH 7



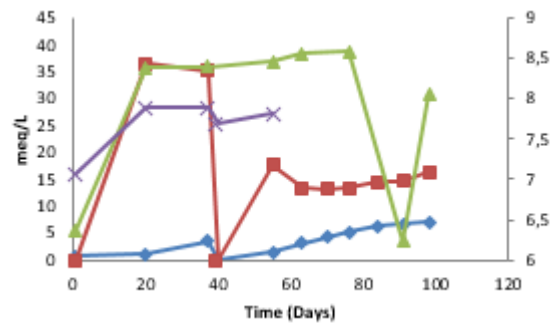
Figuur 33: Sediment + Fe + BES pH 6



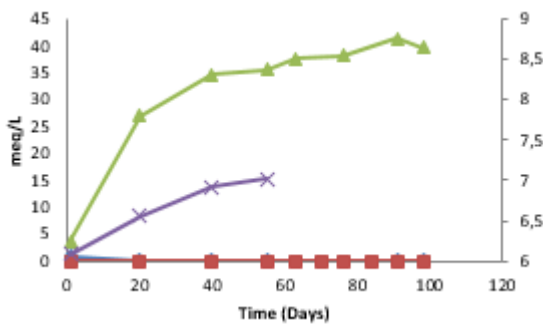
Figuur 32: Sediment + Fe + BES pH 7



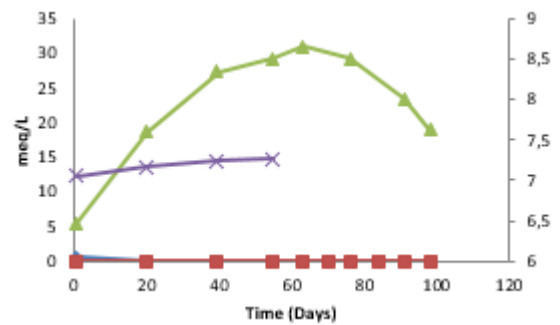
Figuur 34: Roest 1 + Fe pH 6



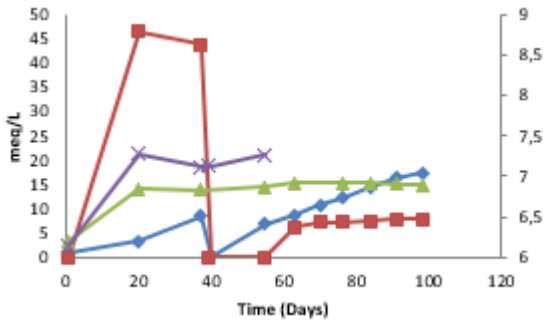
Figuur 31: Roest 1 + Fe pH 7



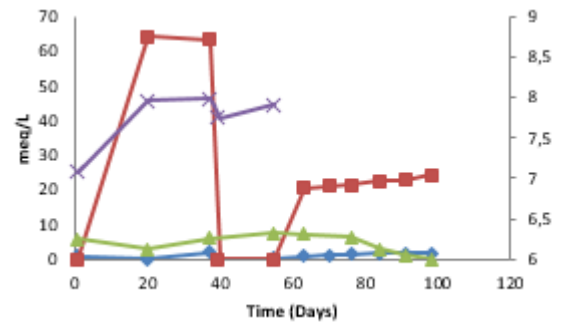
Figuur 30: Roest 1 + Fe + BES pH 6



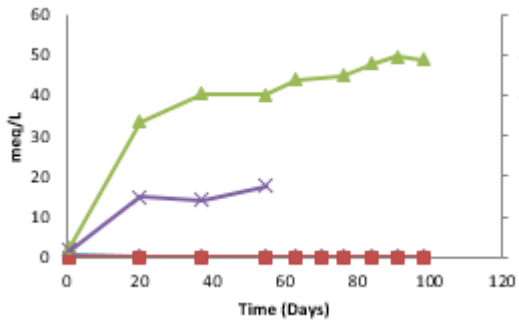
Figuur 29: Roest 1 + Fe + BES pH 7



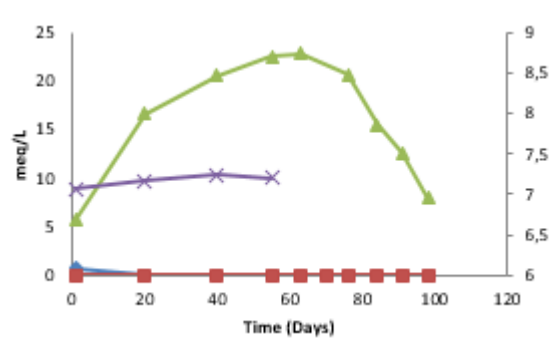
Figuur 38: Roest 2 + Fe pH 6



Figuur 37: Roest 2 + Fe pH 7

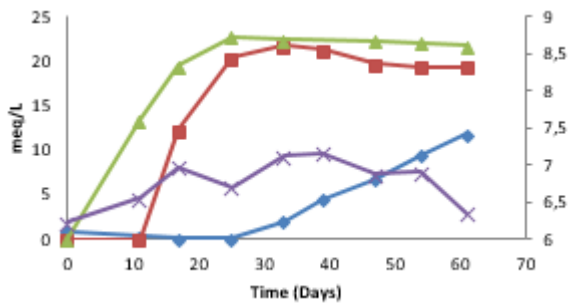


Figuur 35: Roest 2 + Fe + BES pH 6

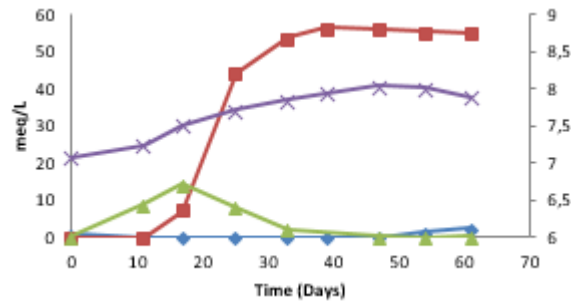


Figuur 36: Roest 2 + Fe + BES pH 7

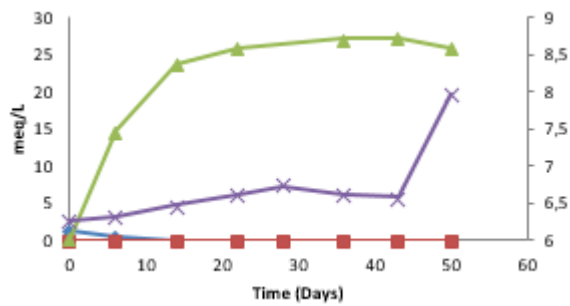
Transfer 2: H₂ (blauw), methaan (rood), acetaat (groen), pH (paars)



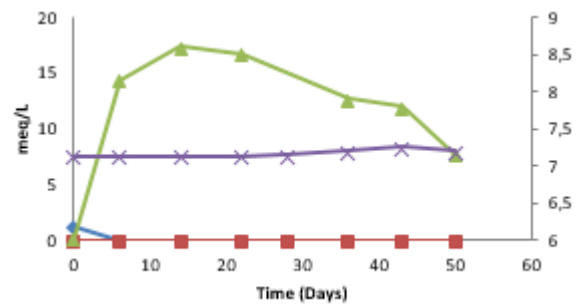
Figuur 42: Sediment + Fe pH 6



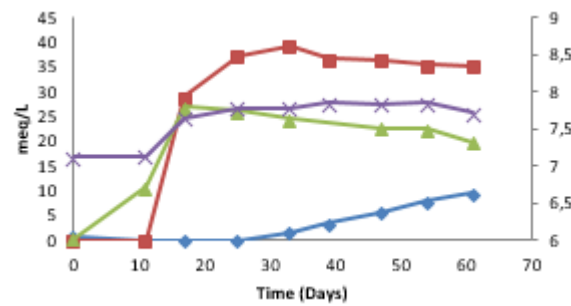
Figuur 41: Sediment + Fe pH 7



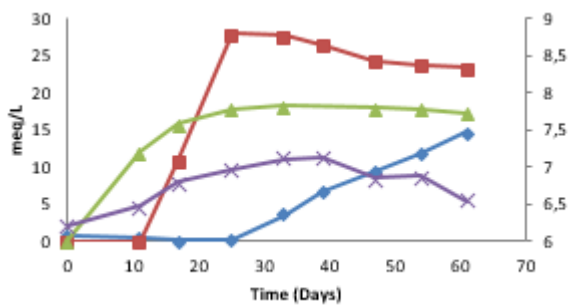
Figuur 40: Sediment + Fe + BES pH 6



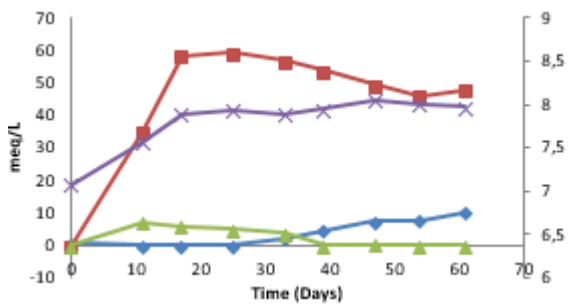
Figuur 39: sediment + Fe + BES pH 7



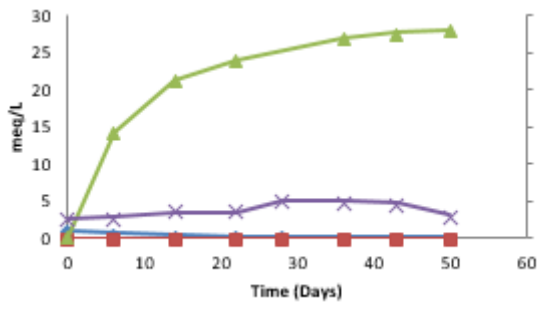
Figuur 45: Roest 1 + Fe pH 7



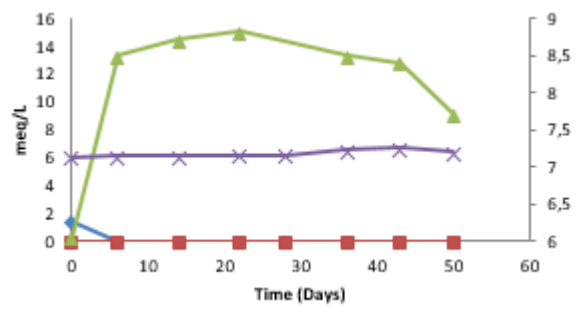
Figuur 44: Roest 2 + Fe pH 6



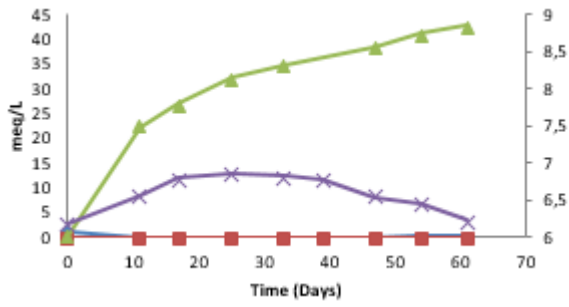
Figuur 43: Roest 2 + Fe pH 7



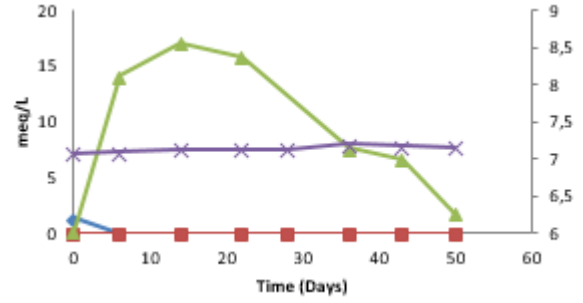
Figuur 48: Roest 1 + Fe + BES pH 6



Figuur 46: Roest 1 + Fe + BES pH 7

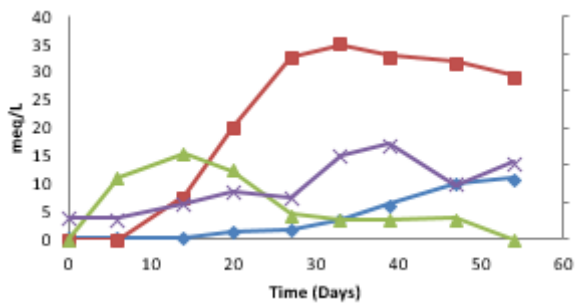


Figuur 49: Roest 2 + Fe + BES pH 6

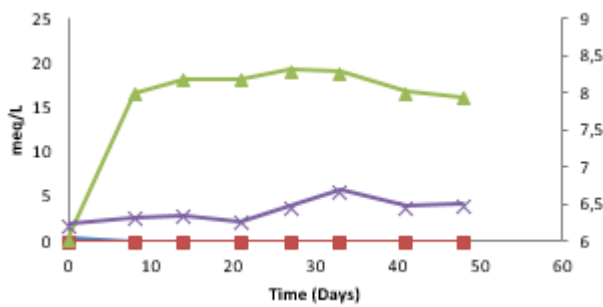


Figuur 47: Roest 2 + Fe + BES pH 7

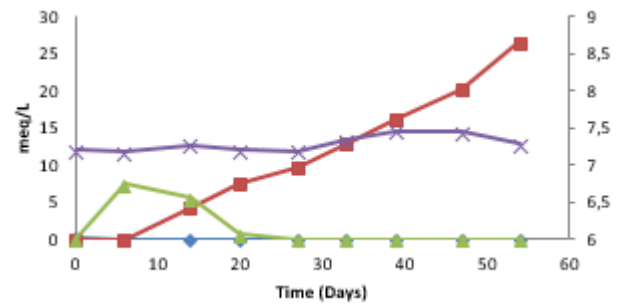
Transfer 3: H₂ (blauw), methaan (rood), acetaat (groen), pH (paars)



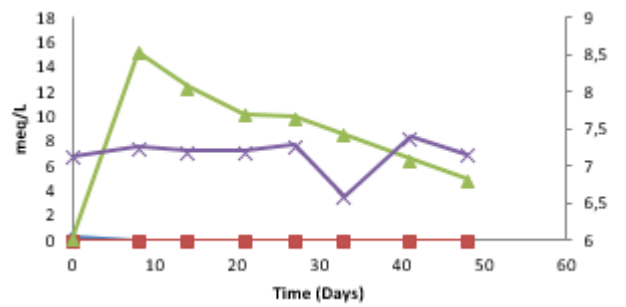
Figuur 53: Sediment + Fe pH 6



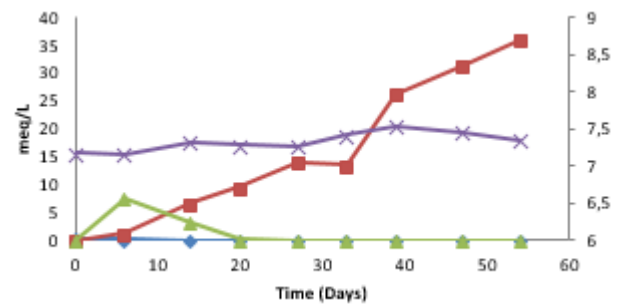
Figuur 54: Sediment + Fe + BES pH 6



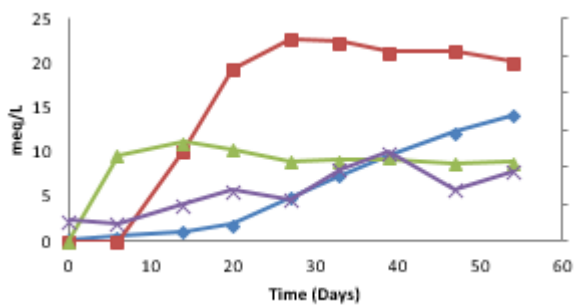
Figuur 50: Sediment + Fe pH 7



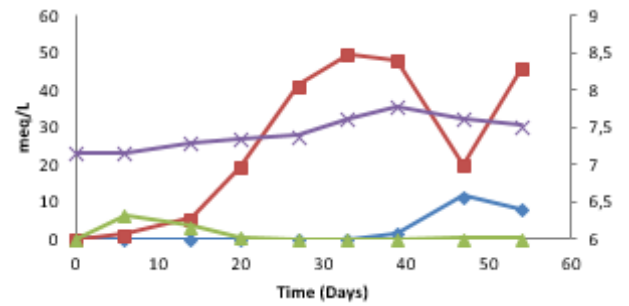
Figuur 52: Sediment + Fe + BES pH 7



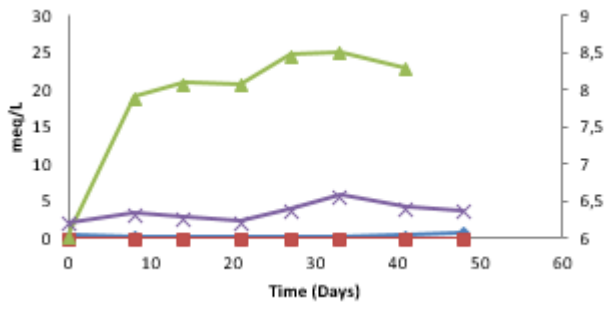
Figuur 51: Roest 1 + Fe pH 7



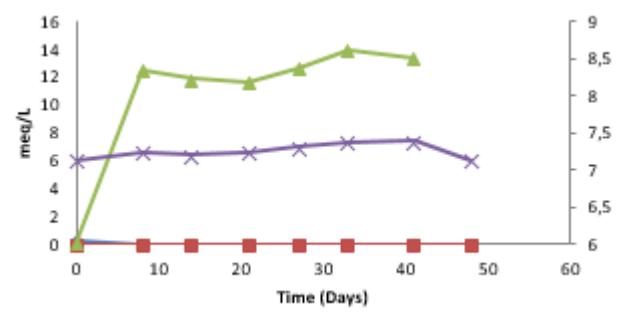
Figuur 55: Roest 2 + Fe pH 6



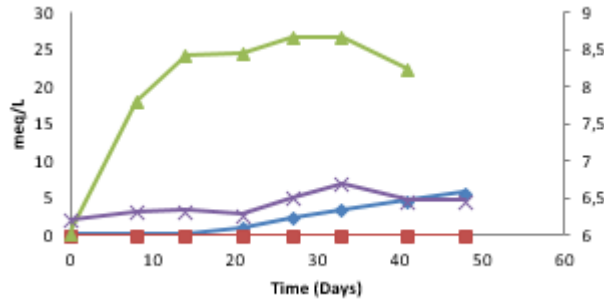
Figuur 56: Roest 2 + Fe pH 7



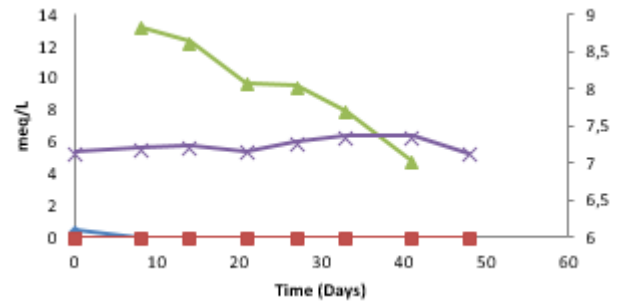
Figuur 60: Roest 1 + Fe + BES pH 6



Figuur 59: Roest 1 + Fe + BES pH 7



Figuur 58: Roest 2 + Fe + BES pH 6



Figuur 57: Roest 2 + Fe + BES pH 7