

2016•2017
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Ontwikkeling en uitvoering van een economisch verantwoorde bioreactor voor bacteriegeassisteerde fytoremediatie

Promotor :
Prof. dr. ir. Leen THOMASSEN

Promotor :
ing. PETER SMEETS

Lode Ghoois

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2016•2017
Faculteit Industriële
ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Ontwikkeling en uitvoering van een economisch
verantwoorde bioreactor voor bacteriegeassisteerde
fytoremediatie

Promotor :
Prof. dr. ir. Leen THOMASSEN

Promotor :
ing. PETER SMEETS

Lode Ghoos

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële
wetenschappen: biochemie*

Woord vooraf

Als laatstejaarsstudent industriële ingenieurswetenschappen optie biochemie aan de UHasselt, heb ik de kans gekregen om mijn masterproef uit te voeren bij PSMT bvba te Lommel. De mogelijkheid om een deel van deze periode buiten, op het terrein door te brengen in combinatie met verschillende praktische proeven sprak me heel erg aan. Voor mij was deze masterproef een zeer leuke, interessante maar ook leerrijke ervaring. En dat heb ik te danken aan de personen die me afgelopen semester geholpen en gesteund hebben.

Graag zou ik mijn externe promotor ing. Peter Smeets willen bedanken voor de goede begeleiding die hij me heeft gegeven tijdens mijn onderzoeksstage in zijn bedrijf. Ook de vele extra's zoals de terreinbezoeken heb ik aan hem te danken. Vervolgens zou ik mijn interne promotor prof. dr. ir. Leen Thomassen willen bedanken voor haar hulp bij het schrijven van deze scriptie en de handige tips die ze mij gegeven heeft om verschillende zaken aan te pakken. De experimenten die ik in dit werk heb uitgevoerd hadden niet kunnen doorgaan zonder dr. Panagiotis Gkorezis. Daarom wil ik hem bedanken voor de bacteriën die hij voorbereid en geleverd heeft om de experimenten uit te voeren. De experimenten die uitgevoerd werden in het labo heb ik ook aan hem te danken. Ten slotte zou ik ook mijn ouders willen bedanken omdat zij steeds bereid waren om de proefversies van deze scriptie door te nemen.

Inhoudsopgave

Woord vooraf.....	I
Lijst met tabellen.....	VII
Lijst met figuren.....	IX
Abstract.....	XI
Abstract in English.....	XIII
1. Inleiding.....	1
1.1 Probleemstelling.....	2
1.2 Methode.....	3
2. Literatuurstudie.....	5
2.1 Bacteriegeassisteerde fyto remediatie.....	5
2.1.1 Afbraakproces.....	7
2.1.2 Bacteriën.....	7
2.2 Bioreactor.....	8
2.2.1 Eisen van een bioreactor.....	8
2.2.2 Microbieel verloop in een batch reactor.....	9
2.2.3 Kinetica.....	9
2.3 Sterilisatiemethodes.....	9
2.3.1 Temperatuur.....	9
2.3.2 UV.....	11
2.3.3 Filtratie.....	12
2.4 Samenstelling voedingsbodem.....	13
2.4.1 C:N:P ratio.....	14
2.5 Conclusie literatuurstudie.....	15
3. Materiaal en methode.....	17
3.1 Vergistingstank.....	17
3.1.1 Koperen warmtewisselaar.....	17
3.2 Labo.....	17
3.2.1 Voedingsbodem.....	18
3.2.2 Werkwijze.....	19
3.3 Isolatie van mazoutmetaboliserende bacteriën uit de bodem.....	20
3.3.1 Staalname (in de verontreinigde bodem).....	20
3.3.2 Schatting van de afbraakcapaciteit van diesel bij enkelvoudig geïsoleerde bacteriën.....	20
3.4 Reactorkamer en 250 l Bioreactor.....	21

3.4.1	Vergistingstank	22
3.4.2	Warmtewisselaar	23
3.4.3	Verbindingslangen.....	23
3.4.4	Luchtcompressor	23
3.4.5	Filters	24
3.4.6	Hydraulische test	24
3.4.7	Isolatie van de vergistingstank.....	24
3.5	Werking bioreactor.....	24
3.5.1	Sterilisatie membraanfilters en leidingslangen.....	24
3.5.2	Bereiding voedingsbodem.....	25
3.5.3	Sterilisatie vergistingstank	25
3.5.4	Steriele luchttoevoer opstarten	25
3.5.5	Enten van de bioreactor	26
3.5.6	Controle op groei.....	28
3.5.7	Staalname	29
3.5.8	Oogsten.....	30
4.	Resultaten en waarnemingen.....	31
4.1	Labo (voedingsbodem).....	31
4.1.1	Samenstelling.....	31
4.1.2	Getyndalliseerde bodem	31
4.2	Warmtewisselaar	32
4.2.1	Opwarmen.....	32
4.2.2	Koelen	34
4.3	Hydraulische test.....	35
4.4	Bioreactor: experiment 1	35
4.4.1	Opmerkingen	35
4.4.2	Waarnemingen.....	36
4.4.3	Resultaten	37
4.5	Bioreactor: experiment 2	38
4.5.1	Waarnemingen.....	38
4.5.2	Resultaten	38
5.	Kostprijs	41
5.1	Bioreactor	41
5.2	Verbruiksgoederen	41
5.3	Elektriciteit.....	42

5.4	Werkuren procesvoering.....	42
6.	Discussie.....	43
7.	Besluit.....	45
	Literatuurlijst.....	47
	Bijlagen.....	51
	Bijlage 1: Opstartprocedure bioreactor met tyndallisatie	51
	Bijlage 2: Entingsprocedure: methode 1 (met gasbrander, één kraan)	52
	Bijlage 3: Entingsprocedure: methode 2 (zonder gasbrander, drie kranen)	52
	Bijlage 4: Staalnameprocedure: methode 1 (gasbrander)	53
	Bijlage 5: Staalnameprocedure: methode 2 (doorstroomslang)	53
	Bijlage 6: Isolatieprocedure mazoutmetaboliserende micro-organismen (dr. Panagiotis Gkorezis).....	54
	Bijlage 7: Brochure en offerte van Eppendorf NB™ BioFlo® Pro 240 Liter	55

Lijst met tabellen

Tabel 1: Een overzicht van verschillende fyto-remediatietechnieken (Sharma & Juwarkar, 2015)	5
Tabel 2: Behandeling van de bodem (Nanekar et al., 2015)	6
Tabel 3: De samenstelling per liter in een "All Culture Broth" (Atlas, 2010)	14
Tabel 4: Tyndallisatieprocedure labo	19
Tabel 5: Tyndallisatieprocedure bioreactor	25
Tabel 6: Kostprijs Bioreactor	41
Tabel 7: Kostprijs verbruiksgoederen per batch van 250 liter	42
Tabel 8: Energiekost per batch van 250 liter	42
Tabel 9: De belangrijkste verschillen tussen de professionele en de zelf ontworpen bioreactor	44

Lijst met figuren

Figuur 1: <i>Vetiveria zizanioides</i> of vetiver	6
Figuur 2: Procentuele olie afbraak en dehydrogenase activiteit na 0, 30, 60 en 90 dagen (Nanekar et al., 2015).....	6
Figuur 3: Aerobe afbraak van benzeen (OVAM, 2005).....	7
Figuur 4: Groeicurve van cellen in een batch reactor (Levenspiel, 1999)	9
Figuur 5: Temperatuur i.f.v. de tijd (links) en Log(CFU/ml) i.f.v. de tijd (H. Y. Cho et al., 1999)...	11
Figuur 6: Overleving van sporen in 70% ethanol bij 65°C in functie van de tijd (Setlow et al., 2002).....	13
Figuur 7: De reductiereactie van DCPIP (Bidoia, Montagnolli, & Lopes, 2012).....	21
Figuur 8: Schematische opstelling van de bioreactor	21
Figuur 9: Bioreactor in reactorkamer	22
Figuur 10: Tijdstip en temperatuur van enting.....	27
Figuur 11: Schematische voorstelling van het enten van de bioreactor (methode 1)	27
Figuur 12: Schematische voorstelling van het enten van de bioreactor (methode 2)	28
Figuur 13: Steriele staalname (doorstroomslang).....	29
Figuur 14: Bodem 3 (links) en bodem 1 (rechts)	31
Figuur 15: LB 0,5 % na een week incubatie, steriliteitstest	32
Figuur 16: Opwarmingscurve van de niet-geïsoleerde vergistingstank, gemeten in de vloeistof	33
Figuur 17: Opwarmingscurve van de geïsoleerde vergistingstank, gemeten aan de buitenkant van de tank.....	34
Figuur 18: Koelcurve van de geïsoleerde vergistingstank, gemeten aan de buitenkant van de tank bij actieve koeling	35
Figuur 19: Voedingsbodem na de tyndallysatieprocedure in de bioreactor.....	36
Figuur 20: Het begin van de Maillard reactie (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009)	37
Figuur 21: Groei op de LB 0,5 agar "Monocultuur"	39

Abstract

PSMT bvba te Lommel saneert mazoutverontreinigingen in bodems en grondwater. De laatste stap in het saneringsproces is bacteriegeassisteerde fyto-remediatie. Daartoe zijn relatief grote hoeveelheden bacteriën nodig, waarvan het opkweken een dure aangelegenheid is. Deze masterproef gaat na of het mogelijk is een betaalbare bioreactor te bouwen om batchvolumes van ca. 250 liter geschikte bacteriën in op te kweken. Daarnaast ontwikkelt deze masterproef een budgetvriendelijke voedingsbodem om in deze reactor te gebruiken.

De basis van de reactor is een vergistingstank van ca. 300 liter. Deze tank wordt omgebouwd tot een bioreactor met enkel de essentiële onderdelen, met name een beluchtungs- en mengsysteem. Voor het opwarmen, koelen, incuberen, steriliseren, staal nemen en enten zijn oplossingen bedacht. Het steriliseren van de reactor door tyndalliseren, een oude verwarmingstechniek die werkt zonder drukverhoging, wordt toegepast. Opwarmen, koelen en incuberen gebeurt met een omgebouwde brouwketel die nu dienst doet als een warmtewisselaar. Steriele stalen worden genomen door een deel van de leidingen van de bioreactor te ontkoppelen. In het labo worden deze stalen verder geanalyseerd. De budgetvriendelijke voedingsbodem bestaat uit kunstmest, kristalsuiker en gistextract.

De ontworpen en gebouwde reactor voldoet aan de gestelde eisen. Op laboschaal zijn de bruikbaarheid van het voedingsmedium en de sterilisatiemethode bewezen. Ook in de bioreactor zijn de resultaten positief en is het mogelijk een monocultuur te kweken.

Abstract in English

PSMT bvba is a soil remediating company which is located in Lommel, Belgium. The last step of the remediating process is bacterial-assisted phytoremediation. Relatively big amounts of bacteria are needed for this process and buying bacteria from other companies is expensive. This master thesis investigates the possibility to build a low-cost bioreactor for growing these bacteria in batch-volumes of 250 liters. A budget-friendly feed medium is composed as well.

The reactor is in essence a fermentation tank of 300 liters. This tank is converted into a basic bioreactor with only the most essential components such as an air in- and outlet and a mixing system. Solutions are found to heat, cool, incubate, sterilize, sample and inoculate the bioreactor. To sterilize the bioreactor, an old heating technique where no pressure build-up occurs, “tyndallization” is used. A brewing boiler is converted into a heat exchanger to heat, cool and incubate the bioreactor. Sterile samples are taken by disconnecting pipes from the bioreactor and transport them to the lab. The budget-friendly feed medium contains fertilizer, sugar and yeast extract.

The designed and built bioreactor meets the requirements. The usability of the feed medium and the sterilization method have been proven in the lab. The results of the bioreactor are positive and it is possible to grow a monoculture of bacteria.

1. Inleiding

In Vlaanderen is het verplicht om een verontreinigde bodem te saneren wanneer het risico bestaat dat er negatieve effecten voor de mens of het milieu zijn ("EMIS Navigator," 2012). De reglementering kan online ingekeken worden op de website van de Openbare Vlaamse Afvalstoffenmaatschappij, OVAM ("Bodemdecreet en Vlarebo - OVAM," n.d.).

PSMT bvba (Peter Smeets Milieu Technologie) is een bedrijf dat een betaalbare oplossing biedt voor het saneren van verontreinigde gronden, mazoutverontreinigingen in het bijzonder. Dit soort verontreiniging kan ontstaan door een lekkende mazouttank en dit kan zowel de bodem als het grondwater verontreinigen. Om deze verontreinigingen te behandelen wordt er veelal gebruik gemaakt van ontgraving van de verontreinigde bodem met externe verwerking in een centrum voor grondreiniging en *pump&reat*¹ voor grondwater. PSMT bvba heeft een techniek ontwikkeld waarbij er niet ontgraven of gepompt wordt. Door gebruik te maken van fysische en biologische technieken wordt de verontreiniging discreet en relatief goedkoop behandeld.

Mazout vormt een drijfslaag op het grondwater. Een eerste saneringsstap verwijdert de drijfslaag door een technologie genaamd "DRU-technologie" (DRU: Drijfslaag Recuperatie Units). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een bovengronds hermetisch afsluitbaar vat dat in verbinding staat met de drijfslaag op het grondwater. Het vat en de drijfslaag vormen een gesloten circuit. In het begin bevat het vat enkel water, na enige tijd stelt er zich een evenwicht: mazout zal naar boven migreren en water naar beneden vanwege het verschil in hun soortelijke massa. Een dunne drijfslaag, kleiner dan ca. 4 cm, kan niet efficiënt via de DRU-technologie verwijderd worden. Indien de drijfslaag te dun is, wordt er olie-specifiek absorptiemateriaal (absorptiefilters) gebruikt om deze weg te nemen. Als de drijfslaag volledig weg is wil dit nog niet zeggen dat de bodem gesaneerd is. Daling van de grondwaterstand zorgt ervoor dat een deel van de drijfslaag zich vasthecht aan de bodem (versmeert) en niet meer verwijderd kan worden met de eerder vermelde technieken. Bij stijging van het grondwaterniveau vormt de nog aanwezige mazout (in de bodem) een film op het grondwater die geabsorbeerd kan worden door absorptiefilters. Toch blijft er steeds mazout aanwezig in de bodem. De restverontreiniging (mazout) in de bodem is afhankelijk van het bodemtype, voor grind en grof zand bedraagt deze 8 l/m³ (of 4600 mg/kg d.s.) terwijl deze bij fijn zand 40 l/m³ (of 22900 mg/kg d.s.) bedraagt (Bakker et al., 2007).

Fytotechnologie biedt een oplossing voor deze restverontreiniging (Kennen & Kirkwood, 2015). Door gebruik te maken van geschikte vegetatie in combinatie met bodembacteriën kan de concentratie aan mazout in de bodem teruggedrongen worden tot aanvaardbare niveaus. Deze richtwaarden zijn online terug te vinden in het "Vlaams Reglement betreffende bodemsanering", VLAREBO ("EMIS Navigator," n.d., "VLAREBO gewijzigd sinds 1 februari 2016 - OVAM," n.d.). In dit reglement wordt er voor iedere verontreinigende component een richt- en streefwaarde gegeven, zowel voor vaste aarde als voor grondwater. De terugsaneerwaarde voor mazout bedraagt 300 mg/kg d.s. in de bodem en 300 µg/l in het grondwater.

Bacteriegeassisteerde fyto-remediatie maakt gebruik van planten en specifiek toegevoegde bacteriën om een bodem te saneren. De planten die gebruikt worden moeten kunnen overleven

¹ *Pump&reat* is (letterlijk) het oppompen en behandelen van het verontreinigde grondwater, bijvoorbeeld in een striptoren (Bakker et al., 2007).

en groeien op de vervuilde bodem. Er komen verschillende planten in aanmerking, PSMT bvba maakt gebruik van wilgensoorten. Het is immers belangrijk dat de bodem gesaneerd wordt, maar veel mensen hechten ook belang aan het uitzicht van hun grond en wat erop groeit. Door gebruik te maken van wilgen wordt niet enkel de bodem gesaneerd maar wordt er ook rekening gehouden met de design van het landschap (Kennen & Kirkwood, 2015). Bovendien is de wilg een freatofyt. Freatofyten hebben veel water nodig en daarom groeien hun wortels tot in het grondwater. Hierdoor fungeren ze als het ware als een natuurlijke pomp. Op deze manier vermindert de verspreiding van de grondwaterverontreiniging. Wanneer de drijfslag nagenoeg verwijderd is (door bv. absorptiefilters) kunnen aan en in de wortels van de wilg bacteriën overleven die in staat zijn om de resterende mazout af te breken. Deze bacteriën bevinden zich voornamelijk op deze plaats, de rhizosfeer², omdat zij hier nuttige metabolieten krijgen van de wortels en visa versa. De wortels kunnen beschouwd worden als een “natuurlijke bioreactor”.

Bij PSMT bvba worden mazoutmetaboliserende bacteriën geselecteerd in het labo uit bodemstalen van de verontreinigde zone. Na selectie worden de gewenste bacteriën opgekweekt. Wanneer de bacteriën in voldoende grote hoeveelheden beschikbaar zijn, worden ze toegevoegd aan de vervuilde bodem bij de wortels van de wilg om hier de resterende verontreiniging efficiënt af te breken (Kennen & Kirkwood, 2015). Deze laatste techniek is een voorbeeld van bacteriegeassisteerde fyto-remediatie.

1.1 Probleemstelling

Iedere bodem is anders en er worden steeds verschillende bacteriën gevonden die in staat zijn om mazout af te breken. Het is ideaal indien er mazoutmetaboliserende bacteriën gevonden worden in de verontreinigde bodem. Wanneer de bacteriën gevonden zijn op de plaats van de verontreiniging is er met zekerheid geweten dat ze kunnen overleven op deze locatie. De bacteriën kunnen vervolgens geselecteerd worden in een labo door gebruik te maken van een minimum medium met als enige koolstofbron mazout, om deze vervolgens te onderwerpen aan een aantal biochemische testen. Om de specifieke bacteriecultuur op te kweken in voldoende hoeveelheden, is het nuttig om over een batchreactor te beschikken.

Tot op heden worden de bacteriën opgekweekt in het labo in flessen van twee liter. Er worden 50 flessen geautoclaveerd, vervolgens geënt en ten slotte geïncubeerd om een voldoende grote hoeveelheid bacteriën te verkrijgen. Deze methode is zeer arbeidsintensief. Bovendien is het extern laten opkweken van bacteriën in bioreactoren bij gespecialiseerde firma's een dure aangelegenheid. PSMT bvba is op zoek naar een betaalbare oplossing om deze bacteriën op voldoende grote schaal op te kweken. Om de bacteriën op te kweken wil PSMT bvba gebruik maken van een fermentatietank van ca. 300 liter uit de sector van de hobby-brouwerij. Deze tank is ontworpen om bier in te maken door suiker te vergisten. Deze vergistingstank is niet direct geschikt om bacteriën in te kweken. Zo zijn er geen verwarmings- of beluchtingsmogelijkheden. Het grootste probleem van deze fermentor is sterilisatie, want hij is niet ontworpen om aan hoge temperaturen of grote drukken te weerstaan die gebruikt worden bij het autoclaveren.

Indien de fermentor gebruikt kan worden als een bioreactor zal er ook gekeken worden naar de samenstelling van de voedingsbodem. Steriele voedingsbodems zijn commercieel beschikbaar,

² De rhizosfeer is de ruimte rond de wortels van planten en deze vertoont een verhoogde biologische activiteit (Manoharachary & Mukerji, 2006).

maar ze zijn erg prijzig voor deze toepassing. Een standaard voedingsbodem waarop de gewenste bacteriën kunnen groeien, wordt mogelijk zelf samengesteld met relatief goedkope grondstoffen.

Uit de bovenstaande probleemstelling kan de volgende onderzoeksvraag geformuleerd worden: “Is het mogelijk om een vergistingstank van ca. 300 liter om te bouwen tot een betaalbare batchbioreactor voor de kweek van een monocultuur mazoutmetaboliserende bacteriën?”. De bijvraag luidt: “Kan met goedkope, en op de markt beschikbare grondstoffen een voedingsbodem samengesteld worden die gebruikt kan worden in deze bioreactor?”

1.2 Methode

Om een bioreactor te bouwen is er een vergistingstank beschikbaar. In eerste instantie wordt er nagegaan waaruit een bioreactor is opgebouwd. Met deze informatie kan de vergistingstank aangepast worden. Verschillende sterilisatiemogelijkheden worden bekeken, zowel voor de vergistingstank en de voedingsbodem als voor de andere onderdelen. Ook zal er een verwarmingssysteem, koelsysteem, entsysteem en een beluchtingssysteem ontwikkeld worden. Er wordt getracht om al de ontwerpen betaalbaar te houden.

Om kosten te beperken wordt er zoveel mogelijk gewerkt met vlot op de markt beschikbaar materiaal waarvan een deel reeds aanwezig is bij PSMT bvba. Zo zal een Blichmann™ Fermentor™ vergistingstank de basis vormen van de bioreactor en het verwarmingssysteem gebouwd worden met een Brewferm™ brouwketel. Sommige materialen die noodzakelijk zijn bij de opbouw van een bioreactor, zoals membraanfilters en verbindingstukken, worden aangekocht. Omdat er niet gewerkt wordt met de nieuwst ontwikkelde technologie van bioreactoren waar verschillende parameters continu opgevolgd worden, wordt er bij deze proef gebruik gemaakt van goed beredeneerde trial en error testen. De bioreactor wordt ontworpen, gebouwd en getest op verschillende parameters zoals de opwarm- en koelcapaciteit, de steriliteit en de capaciteit om een monocultuur op te kweken. Afhankelijk van de uitslag van de test wordt de reactor aangepast en volgen er opnieuw soortgelijke testen.

2. Literatuurstudie

2.1 Bacteriegeassisteerde fyto remediatie

Fyto remediatie is een verzamelnaam van verschillende processen en technieken die gebruik maken van planten om bodemverontreinigingen te stabiliseren, af te breken of te extraheren (Sharma & Juwarkar, 2015). De gebruikte processen en technieken zijn afhankelijk van de soort verontreiniging. Deze technieken worden kort samengevat in onderstaande tabel.

Tabel 1: Een overzicht van verschillende fyto remediatietechnieken (Sharma & Juwarkar, 2015)

Techniek	Mechanisme	Medium	Verontreiniging
Fyto/rhizodegradatie	Enzym-gekatalyseerde afbraak	Bodem, sediment, slib, grondwater	Organische verbindingen
Fytoextractie	Opname en accumulatie van verontreinigingen	Bodem, sediment, slib	Metalen: As, Cr, Cd, Cu, Hg, Pd, Mn, Ni...
Rhizofiltratie	Opname/extractie van verontreinigingen met de wortels van de plant	Grondwater, oppervlaktewater	Metalen: Cr, Cd, As...
Fytostabilisatie	Vasthouden van de verontreiniging	bodem, sediment, slib	Metalen: As, Cr, Cd, Cu, Hg, Pd, Mn, Ni...
Fytovervluchting	Verwijdering van verontreiniging door evapotranspiratie	Bodem, sediment, slib, grondwater	Gechloreerde solventen en anorganische stoffen zoals Se, Hg...
Hydraulische controle	Degradatie en/of vasthouden van de verontreiniging	Grondwater, oppervlaktewater	Wateroplosbare organische en anorganische stoffen

Voor iedere bodemverontreiniging kan er gewerkt worden met een specifieke plantensoort. Bij een verontreiniging met polycyclische aromatische koolwaterstoffen wordt bijvoorbeeld de vetiver, rietzwenkgras of luzerne gebruikt. Een verontreiniging met polychloorbifenyyl kan behandeld worden met de Amerikaanse populier en bij een verontreiniging met As, Hg, Cs of Sr kan de *Pteris vittata*, een varensort, ingezet worden (Sharma & Juwarkar, 2015). Zo zijn er nog verschillende specifieke planten die specifiek gebruikt worden bij bepaalde verontreinigingen.

Een recente techniek, bacteriegeassisteerde fyto remediatie, maakt gebruik van geselecteerde plantensoorten die met specifieke bacteriën samenwerken. Er worden significante resultaten behaald met deze samenwerking tussen planten en bacteriën. De plant secreteert verschillende chemische stoffen³ met zijn wortels waardoor de groei van micro-organismen in de wortelzone gestimuleerd wordt (Sharma & Juwarkar, 2015). De secreties zijn van groot belang bij de interacties tussen plant en bacterie.

Recent onderzoek toont aan dat bacteriegeassisteerde fyto remediatie betere resultaten geeft dan andere bioremediatiemethodes (Nanekar, Dhote, Kashyap, Singh, & Juwarkar, 2015). In het

³ De belangrijkste gesecreteerde stoffen in de wortelzone zijn: organische zuren, fenolische verbindingen en aminozuren (Sharma & Juwarkar, 2015).

volgens beschreven onderzoek wordt slib, verontreinigd met olie, op drie verschillende (biologische) methoden gesaneerd ten opzichte van een controle. De methodes worden telkens getest zonder (a) en met (b) toevoeging van extra nutriënten die zorgen voor biostimulatie. Onderstaande tabel geeft de testmethode weer.

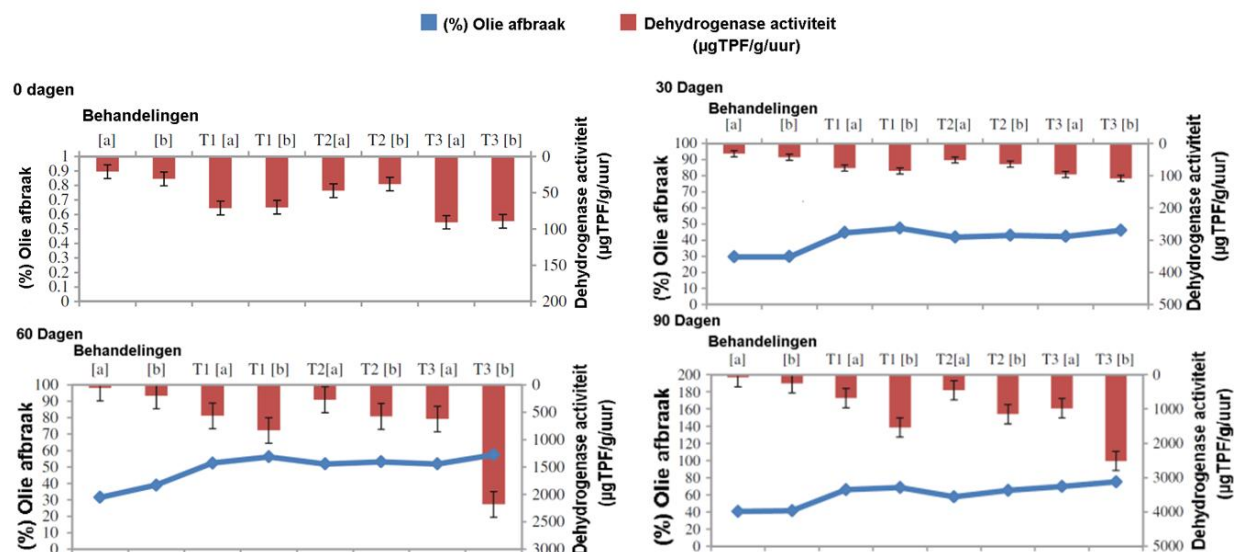
Tabel 2: Behandeling van de bodem⁴ (Nanekar et al., 2015)

Behandeling van de Bodem				
	Microbiële Consortium	Nutriënten	Bulkmiddel	Plant (<i>Vetiveria zizanioides</i>)
Control [a]	-	-	-	-
Control [b]	-	+	-	-
T1 [a]	+	-	-	-
T1 [b]	+	+	-	-
T2 [a]	-	-	-	+
T2 [b]	-	+	-	+
T3 [a]	+	-	+	+
T3 [b]	+	+	+	+



Figuur 1: *Vetiveria zizanioides* of vetiver⁵

Van de acht verschillende bodems uit Tabel 2 wordt de procentuele afbraak van olie en de activiteit van het enzym dehydrogenase opgevolgd gedurende 90 dagen. De resultaten van deze experimenten zijn samengevat in Figuur 2.



Figuur 2: Procentuele olie afbraak en dehydrogenase activiteit na 0, 30, 60 en 90 dagen⁶ (Nanekar et al., 2015)

De procentuele afbraak geeft letterlijk aan hoeveel olie er gedegradieerd is. Dehydrogenase is echter een enzym, een oxidoreductase dat enkel voorkomt in levende cellen en daardoor

⁴ Het bulkmiddel zorgt voor meer porositeit.

⁵ *Vetiveria zizanioides* of vetiver is een tropische grasoort.

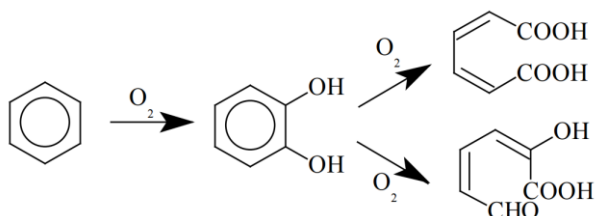
⁶ TPF of "triphenylformazone" wordt gevormd door dehydrogenase en kan spectrofotometrisch gemeten worden bij 484 nm, één µg/TPF/g/uur weerspiegelt één eenheid activiteit.

beschouwd kan worden als een biomerker voor de verandering van biologische activiteit (Alguacil & Caravaca, 2004). Er is een positieve correlatie tussen de dehydrogenase activiteit en de afbraak van olie waardoor deze afbraak opgevolgd kan worden door de activiteit te bepalen (Nanekar et al., 2015). De conclusie van dit onderzoek is dat de fytoremediatie met toevoeging van specifieke micro-organismen betere saneringsresultaten geeft dan enkel met planten of enkel met bacteriën te werken (Nanekar et al., 2015). Ook bij de controle wordt er een olie afbraak van ca. 40 % waargenomen. In het artikel wordt dit verklaard door verdamping van korte vluchtige oliefracties, foto oxidatie en degradatie door bacteriën die al aanwezig zijn in het bodem-slib mengsel.

Een andere studie onderzocht bacteriegeassisteerde fytoremediatie voor de verwijdering van persistente organische pollutanten zoals DDT⁷ (Arslan, Imran, Khan, & Afzal, 2017). Het verwijderen van de pollutanten gebeurt hier voornamelijk door absorptie. De rol van de bacteriën is degradatie, transformatie en mineralisatie van de pollutanten zodat de toxiciteit ervan afneemt (Arslan et al., 2017). Het besluit van deze studie is dan ook dat de toegevoegde bacteriën in staat zijn om de toxiciteit van de pollutanten te verminderen voor de planten.

2.1.1 Afbraakproces

Alkanen en cyclo-alkanen, aanwezig in mazout, worden vrij snel aeroob afgebroken door bacteriën tot koolstofdioxide en water. De bacteriën gebruiken de minerale oliecomponenten als elektronendonor en zuurstof dient als elektronenacceptor (B & Cahiers, 2007). De afbraak van minder goed afbreekbare aromatische ringen zoals benzeen en toluen verloopt vaak via de vorming van een catechol (OVAM, 2005). Mono- of dioxygenases (enzymen) zijn verantwoordelijk voor deze inwerking. Via een ortho-splitsing van de aromatische ring in het catechol ontstaat succinaat (barnsteenzuur) en acetaat. Dit zijn onschuldige metabolieten die gemakkelijk verder afgebroken worden. Figuur 3 geeft de aerobe afbraak van benzeen weer.



Figuur 3: Aerobe afbraak van benzeen (OVAM, 2005)

2.1.2 Bacteriën

Onder andere volgende bacteriële genera blijken over interessante eigenschappen te beschikken die van toepassing zijn bij fytoremediatie: *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Micorbacterium*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter* en *Arthrobacter* (Gkorezis, 2014). *Pseudomonas* en *Acinetobacter* zijn gramnegatief, de anderen grampositief. De interessante eigenschappen zijn mazout-afbrekend en/of plantgroei stimulerend. De eigenschappen zijn bewezen uit labotesten waar de bacteriën worden opgekweekt in een vloeibaar minimaal medium dat 1000 mg/kg filter gesteriliseerde diesel⁸ bevat. Uit labotesten is gebleken dat *Acinetobacter oleivorans* 40 % van de

⁷ DDT of dichloordifenyiltrichloorethaan, een insecticide met een halfwaardetijd van 2 tot 15 jaar.

⁸ Diesel en mazout zijn nagenoeg hetzelfde, aan mazout is een rode kleurstof en furfural toegevoegd.

diesel kon afbreken, *Acinetobacter calcoaceticus* 41 % en *Staphylococcus aureus* 27 % na 10 dagen incubatie bij 30°C (Gkorezis, 2014). 80 µl van een celsuspensie met een dichtheid van 1 bij 660 nm wordt gebruikt per 5 µl filter gesteriliseerde diesel. Niet enkel de afbraakpotentiaal van de geselecteerde bacteriën is van belang, wanneer de bacterie gebruikt wordt in een verontreinigde bodem zal deze tal van andere eigenschappen moeten bezitten. Zo moet de bacterie tolerant zijn voor toxische solventen en metalen in de bodem. Verder wordt de affiniteit van de bacterie voor koolwaterstoffen nagegaan. Ook de capaciteit om biosurfactanten⁹ te produceren en hun potentieel om biofilms¹⁰ te vormen is interessant. Daarnaast is het ook positief als de bacterie plantgroeibevorderende componenten produceert en secreteert.

Bovenstaande bacteriën zijn niet de enige bacteriën die gebruikt worden bij bacteriegeassisteerde fyto-remediatie. Sommige bacteriën in de rhizosfeer zijn bestudeerd, maar hun mogelijkheid tot mazoutafbraak is nog niet gekend. Er worden vaak nuttige eigenschappen ontdekt bij reeds gekende bacteriën (Gkorezis, 2014). Vier nieuwe bacteriesoorten van het geslacht *Chryseobacterium* (gramnegatief) werden in 2009 ontdekt en onderzocht (S. H. Cho et al., 2010). Bacteriën van dit geslacht hebben plantgroei-stimulerende eigenschappen, ze zorgen ervoor dat er meer fosfaat beschikbaar is voor de planten (Chen et al., 2006; Gkorezis, 2014). Onderzoek heeft aangetoond dat *Chryseobacterium* sp. een olie-afbrekende activiteit hebben (Gregory et al., 2015; Saimmai, Kaewrueng, & Maneerat, 2012). Een van de vier ontdekte soorten is *Chryseobacterium lathyri* sp., verschillende karakteriserende eigenschappen voor de groei van deze bacterie zijn beschreven (S. H. Cho et al., 2010). Zo is er een optimale groei tussen de 30°C en de 37°C, er is een groeimogelijkheid tussen pH 6 tot 10 met pH 7 als optimum. Ook kan de bacterie groeien in de aanwezigheid van 0–2% NaCl en is er geen groei meer mogelijk onder 5°C of boven 42°C (S. H. Cho et al., 2010). Dit soort onderzoek werd voor verschillende bacteriesoorten uitgevoerd.

2.2 Bioreactor

Een grootschalige productie van micro-organismen vereist een bioreactor. Er zijn drie reactortypen: CSTR, propstroom en batch reactor. De CSTR (*Continuously Stirred Tank Reactor*) en de propstroom reactor zijn ontworpen voor continue processen. De batch reactor werkt niet continu en kan flexibel ingezet worden (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011). Een voordeel hiervan is dat er in iedere batch een andere bacteriesoort gekweekt kan worden.

2.2.1 Eisen van een bioreactor

Een bioreactor voor de kweek van micro-organismen moet aan verschillende eisen voldoen (Levenspiel, 1999; Williams, 2002). Een eenvoudige bioreactor moet:

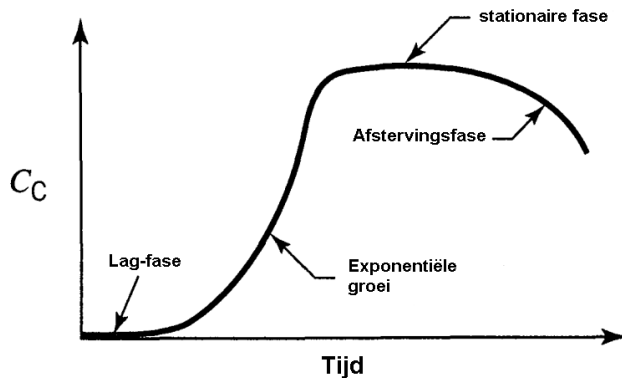
- steriel gemaakt kunnen worden;
- afgesloten zijn van de omgeving;
- op een welbepaalde temperatuur ingesteld kunnen worden;
- over beluchtungs- en menigeenschappen beschikken;
- uit een materiaal bestaan dat geschikt is om te steriliseren en kweken van micro-organismen.

⁹ Biosurfactant is een natuurlijk detergent dat organische beter oplosbaar maakt.

¹⁰ Een biofilm is een laag micro-organismen in een zelfgeproduceerde slijm laag.

2.2.2 Microbieel verloop in een batch reactor

Het typische verloop van de groei van microbiële cellen wordt weergegeven in Figuur 4.



Figuur 4: Groeicurve van cellen in een batch reactor (Levenspiel, 1999)

In deze figuur wordt de concentratie aan cellen weergegeven in functie van de tijd. In het begin, wanneer de micro-organismen in een nieuw medium gebracht worden, zullen de cellen niet meteen beginnen te groeien. Ze hebben een bepaalde tijd nodig om te wennen aan de nieuwe omgeving en om de nieuwe grondstoffen te gebruiken voor hun groei. Dit wordt de lag-fase genoemd (Levenspiel, 1999). Na de lag-fase komt de groeifase, de cellen groeien exponentieel zolang de samenstelling van het medium niet verandert. In een batch reactor verandert het medium continu waardoor de groeisnelheid ook zal veranderen. Oorzaken hiervan zijn: uitputting van voedsel of ophoping van toxische afvalstoffen in de reactor. Een stationaire fase volgt na de groeifase. In deze fase blijft de cel concentratie constant, er worden evenveel nieuwe cellen gevormd al er afsterven. De laatste fase is de afstervingsfase, er sterven meer cellen af dan er bij komen.

2.2.3 Kinetica

Een eenvoudig wiskundig model dat vaak gebruikt wordt om microbiële groeisnelheden te bepalen is de Monod vergelijking. Deze vergelijking houdt rekening met de voedingsconcentratie en het aantal aanwezige cellen: $r_R = \frac{k C_C C_A}{C_M + C_A}$. C_A is de concentratie aan voeding, C_C de cel concentratie, r_R de groeisnelheid, k de reactiesnelheidsconstante en C_M de Monod constante (Levenspiel, 1999).

2.3 Sterilisatiemethodes

2.3.1 Temperatuur

2.3.1.1 Hitteresistentie micro-organismen

Koken (100°C) doodt al de pathogene micro-organismen in water (WHO, 2005). Vegetatieve vormen van bacteriën kunnen vernietigd worden door het medium waarin deze zich bevinden te koken. Bacteriële endosporen¹¹ kunnen levensvatbaar blijven, zelfs na enkele uren koken ("WHO | Botulism," 2017).

¹¹ Dit zijn niet-reproductieve vormen van (meestal gram-positieve) bacteriën die hitteresistent zijn.

2.3.1.2 Autoclaveren

Autoclaveren is een techniek die de dag van vandaag zeer vaak gebruikt wordt in de industrie. Voor deze techniek is in er minimumtemperatuur nodig van 121°C die voor 15 minuten aangehouden wordt in combinatie met een overdruk van 1 bar of meer. Om water/stoom warmer te krijgen dan het kookpunt is er een overdruk nodig. Deze temperatuur kan bereikt worden in een autoclaaf omdat het hierin mogelijk is om de druk op te bouwen (*Sterilization Of Food In Retort Pouches*, 2006). Zowel bacteriën als de sporen ervan worden vernietigd door autoclaveren.

2.3.1.3 Pasteurisatie

Pasteurisatie is een milde techniek die onder andere gebruikt word om pathogene bacteriën in melk te doden. Onderzoek heeft aangetoond dat een hittebehandeling op 65 °C voor 30 minuten voldoende is om de bacterieconcentratie in melk terug te dringen tot veilige niveaus (Newsholme, 1935). Er kan al gepasteuriseerd worden vanaf 61,1°C (Frank, 1930) en hier is geen drukopbouw voor nodig. Bij temperaturen onder de 100°C is het niet mogelijk om de aanwezige bacteriesporen te vernietigen (LAWRENCE & HALVORSON, 1954).

2.3.1.4 Koken

Het is misschien mogelijk water te steriliseren door dit te koken (100°C), de vraag is hoelang er dan gekookt moet worden. Een uur koken volstaat om de meeste levende bacteriën te doden. Indien ook zeer resistente bacteriën en endosporen gedood moeten worden moet er verschillende uren gekookt worden. De kooktijd bij deze laatste eis kan oplopen tot 20 uur of meer (ICRC, 2014). Om een vloeistof volledig steriel te krijgen wordt deze techniek in twijfel getrokken ("Physical Control of Microorganisms: Boiling Water," 2009).

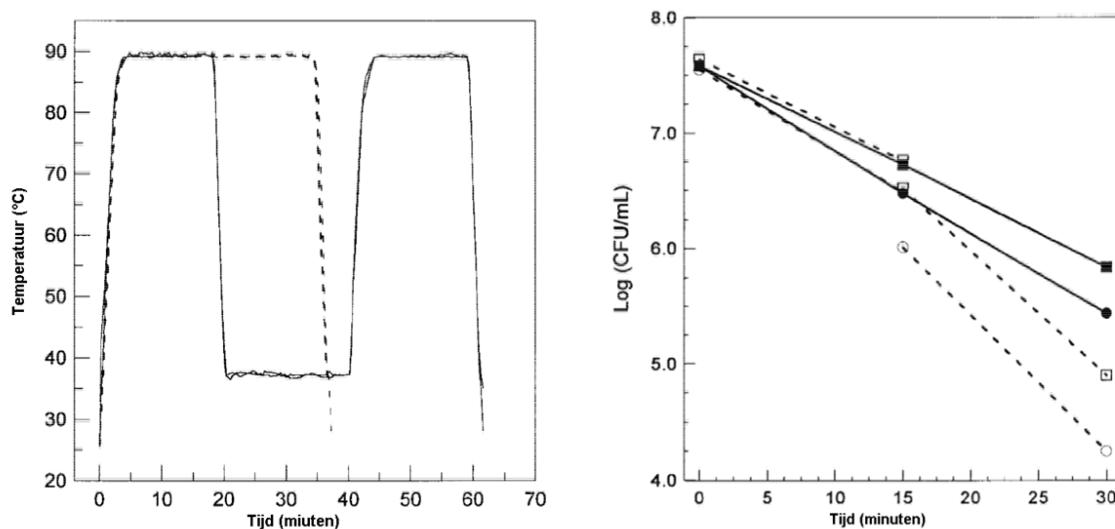
2.3.1.5 Tyndalliseren

Tyndallisatie is een techniek, ontwikkeld in de 19^e eeuw, waarbij hitteresistente endosporen gedood worden (Brochier-Armanet & Moreira, 2015). Dit is een oude thermische sterilisatietechniek voor voedingsrijke vloeistoffen, ontwikkeld door John Tyndall, waarbij er geen drukopbouw nodig is en de sterilisatietemperatuur net geen 100°C bedraagt (Kim et al., 2012). De techniek verloopt door een voedingsbodem drie maal op te warmen tot ca. 100°C gedurende 15 tot 30 minuten met telkens een nacht incubatie op 37°C tussen. Bij 15 tot 30 minuten op 100°C worden bijna al de vegetatieve bacteriën gedood. Het probleem is dat er endosporen aanwezig kunnen zijn in de voedingsbodem, deze overleven de hittebehandeling van ca. 100°C. Omdat de sporen na de hittebehandeling op 37°C gebracht worden, hebben ze een heat-shock doorlopen. Deze heat-shock is de reden dat endosporen ontkiemen wanneer ze in gunstige omstandigheden terechtkomen. De ontkiemde sporen zijn minder hitte-resistent en worden gedood in de volgende hittebehandeling (Atlas, 2010; Thiel, 1999).

Omdat de omstandigheden zeer gunstig moeten zijn, zal deze techniek enkel werken in een rijk medium. Indien het medium niet geschikt is voor het ontkiemen van de endosporen zullen deze ook niet groeien. Wanneer de sporen ontkiemen, zullen deze groeien in het medium met als gevolg dat er een deel van de grondstoffen verbruikt wordt. Ook zullen er na de volgende hittebehandeling dode bacteriecellen aanwezig zijn in het medium (Thiel, 1999).

Deze methode werd al meer dan 100 jaar geleden beschreven en er zijn gedurende deze jaren andere interessante sterilisatiemethoden ontwikkeld. Ook is er aangetoond dat deze methode niet altijd 100 % effectief is (Smelt, Hellemons, Wouters, & Van Gerwen, 2002).

Onderzoek toont aan dat tyndallisatie een betere sporendodende werking vertoont dan andere thermische behandelingen bij temperaturen onder de 100°C. Er is onderzoek gedaan naar de inactivatie van de sporen van *Bacillus subtilis* (H. Y. Cho, Yousef, & Sastry, 1999). Bacteriesuspensies (in een 0,1 % NaCl oplossing) van ca. 10^7 CFU/ml¹² ondergingen twee verschillende warmtebehandelingen: continue of onderbroken. Bij de continue warmtebehandeling wordt de suspensie 30 minuten verwarmd tot ca. 90°C en bij de onderbroken verwarming wordt deze 2 maal 15 minuten verwarmd met een tussenpauze van 20 minuten op 37°C (Figuur 5 links). De concentratie wordt na 0, 15 en 30 minuten verwarmen bepaald in CFU/ml. De resultaten worden rechts in “Figuur 5” weergegeven. De volle lijn weerspiegelt de resultaten van de continue verwarming en de stippelijijn geeft de resultaten van de onderbroken verwarming (met incubatie) weer. In Figuur 5 (rechts) wordt er ook een onderscheid gemaakt tussen twee verschillende verwarmingsmethodes: de conventionele verwarming (bolletjes) en de ohmse verwarming¹³ (vierkantjes). Bij beide verwarmingsmethodes is te zien dat er bij de onderbroken verwarming meer sporen gedood worden. Dit wordt verklaard door het “tyndallisatie-effect” (H. Y. Cho et al., 1999). In de tussentijdse incubatieperiode van 20 minuten zullen er al een aantal sporen ontkiemen waardoor ze niet meer hitteresistent zijn in de volgende verwarmingsstap.



Figuur 5: Temperatuur i.f.v. de tijd (links) en Log(CFU/ml) i.f.v. de tijd (H. Y. Cho et al., 1999)

2.3.2 UV

Desinfecteren¹⁴ met UV-straling wordt op dit moment al breed toegepast: luchtzuivering in gebouwen, verpakkingsmateriaal in de voedingsindustrie, drinkwater, UV-cabines in ziekenhuizen voor de sterilisatie van materiaal... (Kowalski, 2009a). Desinfecteren van lucht

¹² CFU/ml of “colony-forming units” per milliliter is een maat voor de bacteriële concentratie.

¹³ Bij de ohmse verwarming wordt er verwarmd door een elektrisch veld over het medium te zetten, het verwarmen gebeurt door de elektrische weerstand van het medium.

¹⁴ Desinfecteren is niet hetzelfde als steriliseren, desinfecteren is het verwijderen of het verminderen van de meeste micro-organismen, niet allemaal.

verloopt minder moeizaam dan water. De verzwakking van de UV-intensiteit in water is al merkbaar binnen ongeveer 15 cm. Het effect van deze straling op micro-organismen is afhankelijk van de soort uv-straling, de intensiteit en de blootstellingsduur (Kowalski, 2009a). Deze techniek wordt voornamelijk gebruikt om te desinfecteren en niet om te steriliseren, voor dit laatste zijn eenvoudigere technieken beschikbaar. Voor oppervlaktesterilisatie is deze techniek wel geschikt (Kowalski, 2009a).

2.3.2.1 Werking

De werking van desinfectie met ultraviolette straling is dat deze DNA van bacteriën beschadigt. DNA absorbeert de straling waardoor het breekt of mutaties ontstaan. De bekendste mutatie onder invloed van UV is de vorming van een thymine dimeer tussen twee thymine nucleotiden in het genoom. UV stralen veroorzaken ook transversie, deletie en frameshift¹⁵ (Saxena, 2015). Door de fouten in het genoom zullen de bacteriën sterven. Er zijn drie soorten UV-stralen. Deze worden ingedeeld op basis van hun golflengte. UV A-licht (320-420 nm) en UV B-licht (280-320 nm) worden beschouwd als 'niet erg schadelijk', dit zijn ook de UV-stralen die de aarde kunnen bereiken door zonnestraling (98,7% UV A en 1,3% UV B). UV C-licht (100-280 nm) is een gevaarlijke straling en kan de gezondheid schaden. Het reële golflengtegebied van UV C-straling gaat van 180 nm tot 280 nm omdat UV-stralingen met een golflengte kleiner dan 180 nm niet door lucht kunnen migreren (Kowalski, 2009a). UV C-straling wordt in verschillende labo's gebruikt als UVGI of "Ultraviolet germicidal irradiation" vanwege zijn schadelijke en kiemdodende werking.

2.3.2.2 Veiligheid

De beste manier om beschermd te zijn tegen deze UV stralen is om deze volledig af te schermen van de omgeving of ervoor te zorgen dat niemand ermee bestraald kan worden. Een korte blootstelling, van enkele seconden, kan geen kwaad (Kowalski, 2009b).

2.3.2.3 Nadelen

Bij het gebruik van UV-straling mag de straling gedurende het volledige proces niet onderbroken worden om de steriliteit te garanderen. De stroomvoorziening mag niet onderbroken worden en de lamp mag stuk gaan.

2.3.3 Filtratie

De grootte van bacteriën kan variëren van 0,2 µm bij nano bacteriën tot 750 µm bij de grootste bacteriën (Schulz & Jørgensen, 2001). De gebruikte filter moet van deze grootteorde zijn, dat ook de kleinste bacteriën niet door de filter kunnen dringen.

2.3.3.1 HEPA of High Efficiency Particulate Arrestance/Air

Deze filters zijn ontworpen, zoals de naam zegt, om met hoge efficiëntie kleine stofdeeltjes (0,3 µm en groter) uit de lucht te filteren. De HEPA filter kan breed ingezet worden, ook in de farmaceutische en de voedingsindustrie wordt deze filter gebruikt om gassen te ontdoen van bacteriën. De meeste bacteriën hebben afmetingen tussen de 0,5 µm en de 1,5 µm (Bull, 2008),

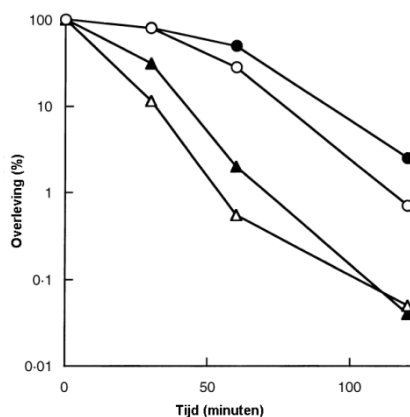
¹⁵ Bij transversie wordt er een purine vervangen door een pyrimidine (A → C of G → T); bij een deletie worden enkele nucleotiden verwijderd uit het genoom en een frameshift of rasterverschuiving veroorzaakt een verkeerde code.

deze kunnen niet doorheen de filter. Kleinere bacteriën ($< 0,3 \mu\text{m}$), die in mindere mate voorkomen, kunnen wel soms doorheen deze filter. Een HEPA filter kan gebruikt worden om bacteriën uit de lucht te filteren met een efficiëntie van 99,9 % (Korves et al., 2013). HEPA filters zijn voornamelijk geschikt om in grote ruimtes, bijvoorbeeld in vliegtuigen, de lucht te zuiveren. De gefiltreerde lucht is niet 100 % steriel.

2.3.3.2 Membraanfilter

Voor de beluchting van bioreactoren zijn er commerciële membraanfilters beschikbaar. Het membraan is meestal gemaakt van PTFE (polytetrafluorethaan) of PVDF (polyvinylideenfluoride). PTFE, beter bekend onder de merknaam “Teflon”, en PVDF kunnen beide gesteriliseerd worden in een autoclaaf bij 125°C (Padia & Huntington, 2006). Deze filters zijn verkrijgbaar met een poriegrootte van $0,2 \mu\text{m}$, dit volstaat om micro-organismen uit de lucht te filtreren (Schulz & Jørgensen, 2001). Een nadeel van deze sterilisatie is dat de filter achteraf steriel bevestigd moet worden aan de bioreactor.

PTFE is chemisch inert en verdraagt verschillende organische, zure en basische solventen (“PTFE: Algemene informatie,” n.d.). Indien de filter gesteriliseerd moet worden zonder autoclaaf, kan dit mogelijk met een 70% ethanoloplossing. De aanwezige bacteriën sterven al na een aantal minuten, sporen zijn meer resistent tegen deze behandeling (Setlow et al., 2002). Er is onderzoek gedaan naar de overlevingskansen van sporen bij de blootstelling aan een 70% ethanoloplossing bij 65°C . De resultaten van dit onderzoek worden weergegeven in Figuur 6, iedere curve stelt een andere bacteriestam voor. De test werd uitgevoerd op vier verschillende stammen van *Bacillus subtilis*.



Figuur 6: Overleving van sporen in 70% ethanol bij 65°C in functie van de tijd (Setlow et al., 2002)

In de figuur is te zien dat na een blootstelling van twee uur aan 70% ethanol ongeveer tussen de 0,06 en 3 % van de geteste sporen overleven. Ook is te zien dat in al de gevallen de curven nog sterk aan het dalen zijn.

2.4 Samenstelling voedingsbodem

Commercieel beschikbare voedingsbodems werken meestal zeer goed en geven reproduceerbare resultaten. Dit soort bodems wordt meestal enkel gebruikt voor

onderzoekdoeleinden omdat ze constant, maar duur zijn. Voor industriële fermentaties zijn chemisch samengestelde voedingsbodems niet rendabel (Saxena, 2015).

De belangrijkste ingrediënten van een algemene voedingsbodem zijn: een koolstofbron, stikstofbron, fosforbron, zwavelbron en mineralen. Algen en fungi kunnen een stikstofbron gebruiken die aanwezig is als ammoniumnitraat of natriumnitraat. Bacteriën en gisten verkiezen eerder een organische stikstofbron zoals maïsweekwater of gistextract (Saxena, 2015). In de industrie wordt er vaak gewerkt met natuurlijke complexe voedingsbodems. Dit zijn afvalstromen van een andere industrie waaraan (indien nodig) extra stoffen worden toegevoegd. Een voorbeeld hiervan is melasse, een bijproduct van de suikerraffinaderij. Dit is een viskeuze vloeistof die 48,9 % sucrose bevat, een geschikte koolstofbron voor microbiële fermentatie (Saxena, 2015).

De samenstellingen van verschillende voedingsbodems zijn beschreven in het “Handbook of Microbial Media”. Een algemene vloeibare voedingsbodem wordt erin beschreven als “All Culture Broth” of “AC Broth” (Atlas, 2010). Tabel 3 geeft de samenstelling ervan weer.

Tabel 3: De samenstelling per liter in een “All Culture Broth” (Atlas, 2010)

AC Broth	
Composition per liter:	
Proteose peptone No. 3	20.0g
Glucose	5.0g
Beef extract	3.0g
Yeast extract	3.0g
Malt extract	3.0g
Ascorbic acid	0.2g
pH 7.2 ± 0.2 at 25°C	

2.4.1 C:N:P ratio

De koolstof:stikstof:fosfor ratio van bacteriën werd bepaald in een studie van 1986. Dit is de atomaire verhouding van deze drie chemische elementen bij bacteriën en bedraagt respectievelijk 46:7:1 (Reiners, 1986). Omdat dit de atomaire verhouding in bacteriecellen is zal de voedingsbodem voor het aerob opkweken van bacteriën rijker moeten zijn aan een organische koolstofbron. Bij aerobe micro-organismen is de C-bron niet enkel nodig om biomoleculen te construeren, ook zal de (organische) C-bron gebruikt worden als energiebron voor de bacteriën. Glucose wordt bijvoorbeeld geoxideerd ter vorming van energie, water en CO₂. De globale reactievergelijking van de volledige oxidatie van glucose ziet er als volgt uit:



CO₂ is een gas en kan de voedingsbodem gemakkelijk verlaten. De verbranding van de koolstofbron betekent een verlies aan beschikbare koolstof voor bacteriegroei.

2.5 Conclusie literatuurstudie

Bacteriegeassisteerde fyto-remediatie is een milieuvriendelijke en effectieve oplossing om verontreinigde bodems en grondwater te saneren. Omdat bacteriegeassisteerde fyto-remediatie in dit onderzoek werkt met plaats specifieke bacteriën moet er voor iedere locatie een andere bacterie gekweekt worden. Daarom is het ontwerp van een batchreactor het meest interessant. In iedere batch kan er een andere bacterie groeien.

Er is nog geen studie gedaan naar de mogelijkheid om een vergistingstank om te bouwen naar een betaalbare bioreactor om aeroob bacteriën in te kweken. In dit onderzoek wordt er getracht bacteriën op te kweken in een vergistingstank waaraan een aantal aanpassingen zijn gebeurd.

Om de vergistingstank te steriliseren is autoclaveren praktisch niet uitvoerbaar omdat de tank geen temperaturen boven de 100°C kan bereiken, de reden hiervoor is dat er geen drukopbouw mogelijk is. Pasteurisatie wordt ook niet gebruikt omdat deze techniek niet geschikt is om bacteriesporen te vernietigen. De praktisch best uitvoerbare methode om de voedingsbodem en de vergistingstank tegelijk te steriliseren is tyndalliseren. De methode is niet ideaal omdat deze veel tijd in beslag neemt en er mogelijk dode bacteriecellen aanwezig zijn na de tyndallisatieprocedure, maar voor de toepassing van biologische bodemsaneringen is deze mogelijk geschikt. De bestemming van de opgekweekte bacteriën is een met mazout vervuilde bodem, daarom vormen onzuiverheden, zoals dode cellen, geen hinder. Omdat tyndallisatie een zeer oude techniek is, waarvan er voor deze toepassing niet veel concrete onderzoeksresultaten beschikbaar zijn, zal deze techniek eerst op laboschaal getest worden.

Het gebruik van UV-straling om de lucht in- en uitlaat van de bioreactor te steriliseren is niet betrouwbaar. Desinfecteren met deze stralen is mogelijk, dit is echter niet hetzelfde als steriliseren. Ook bij stroompanne zou deze methode grote problemen kunnen geven. Bij de meeste bioreactoren wordt de toegevoerde lucht gesteriliseerd door membraanfilters. Deze sterilisatie lijkt het meest geschikt en is ook het gemakkelijkst realiseerbaar. Er wordt gekozen om membraanfilters, bestaande uit PTFE met een poriegrootte van 0,2 µm, te bevestigen aan de lucht in- en uitlaat van de reactor. Aangezien het de sterilisatie met 70% ethanol bij 65°C voor 2 uur niet voldoende is om al de bacteriesporen te vernietigen, zal worden nagegaan of het mogelijk is deze filters voldoende te steriliseren bij een hogere concentratie ethanol bij een langere periode van blootstelling (99% ethanol en contacttijd minimum 24 uur). Er wordt gebruik gemaakt van filters die geschikt zijn om zowel vloeistof als lucht te filtreren.

UV straling is interessant bij het inrichten van een reactorkamer. Indien de bioreactor gebouwd is kan deze in een afgesloten ruimte geplaatst worden. In deze ruimte kan m.b.v. UV-licht de kans op infectie van de reactor verkleind worden.

Omdat chemisch samengestelde voedingsbodems duur zijn, en voornamelijk bedoeld zijn voor labotesten, zal er zelf een voedingsbodem samengesteld worden. Het is belangrijk dat deze bodem samengesteld wordt met relatief goedkope ingrediënten en dat deze geschikt zijn voor de groei van de meeste bacteriën. Hierbij wordt rekening gehouden met de nodige grondstoffen en de concentraties ervan om een aerobe bacteriecultuur te verwezenlijken. Een C:N:P ratio van 100:10:1 zal gehanteerd worden. Er zullen een aantal voedingsbodems op laboschaal getest worden om na te gaan of bacteriën er op kunnen groeien en of de fysische conditie ervan geschikt is voor gebruik in de reactor. De voedingsbodemsamenstelling die de meest aanvaardbare resultaten geeft zal gebruikt worden voor opschaling.

3. Materiaal en methode

3.1 Vergistingstank

De vergistingstank zal voor iedere batchcultuur opnieuw gesteriliseerd worden. De methode die hiervoor gebruikt zal worden is “tyndalliseren”, hierbij dient de vergistingstank opgewarmd te worden tot een temperatuur van ca. 100°C (Kim et al., 2012).

De volledige vergistingstank is opgebouwd uit RVS (roestvrij staal). Dit soort legeringen zijn stabiel tot 650-700°C (Berns, Gavriljuk, & Riedner, 2013). De opwarming tot ca. 100°C is geen probleem voor deze legering. De synthetische ringen, die tussen de verschillende onderdelen zitten, moeten ook een temperatuur van 100°C kunnen weerstaan.

De synthetische, rubberachtige afsluitingen in de vergistingstank bestaan uit ofwel silicone, ofwel EPDM (Ethyleen-Propyleen-Dieën Monomeer). Silicone is stabiel binnen een temperatuursinterval van -40°C tot 200°C. EPDM is stabiel binnen een temperatuursinterval van -50°C tot 150°C (Le Lay, 2013). Beide stoffen kunnen zonder probleem verwarmd worden tot 100°C.

3.1.1 Koperen warmtewisselaar

Om de vergistingstank op temperatuur te brengen wordt er gedacht aan een spiraalvormige koperen buis. Door de voedingsbodem continu doorheen deze spiraal te pompen wordt deze niet alleen verwarmd, maar ook gemengd. Koper heeft een zeer gunstige thermische geleidbaarheid ten opzichte van RVS, respectievelijk 401 W/mK en 16 W/mK (bij 25°C) (“Thermal Conductivity of common Materials and Gases,” n.d.). Een nadeel van deze toepassing is de mogelijke antimicrobiële werking, koper is dodelijk voor bepaalde micro-organismen, of kan de groei ervan belemmeren (Michels & Anderson, 2008). De toxische werking van koper wordt veroorzaakt door de ionen Cu^+ en Cu^{2+} , niet door metallisch koper. De redoxpotential van het koppel $\text{Cu(I)}/\text{Cu(II)}$ is zeer dicht gelegen bij de potentiaalwaarde in het bacteriële cytoplasma. Dit is de reden waarom koperkationen toxisch zijn (Pontel, Checa, & Soncini, 2015). Normaal worden er in de warmtewisselaar vrijwel geen koperionen gevormd zodat de concentratie ervan voldoende laag blijft. Om te voorkomen dat er koperionen gevormd worden, kunnen er zo nodig maatregelen genomen worden (kathodische bescherming of materiaalkeuze bv. Aluminium).

De reactor zal op temperatuur gebracht worden door de voedingsbodem door een uitwendige, spiraalvormige koperen buis te pompen, die dienst doet als een warmtewisselaar. Deze spiraal wordt verwarmd in een waterbad (brouwketel). Indien er geen remming op de groei wordt waargenomen, zal gewerkt worden met de koperen spiraalvormige buis, zonder verdere aanpassingen.

3.2 Labo

Omdat de vergistingstank een redelijk groot volume heeft (ca. 300 liter) is het nuttig om een aantal zaken eerst op laboschaal te testen. Zowel de voedingsbodem als de sterilisatiemethode (tyndalliseren) worden op laboschaal getest.

3.2.1 Voedingsbodem

Er wordt een zelf samengestelde bodem getest. Zowel de sterilisatietechniek “tyndalliseren” als de geschiktheid om er bacteriën op de kweken zal worden nagegaan. Dit gebeurt door dr. P. Gkorezis in het labo van de UHasselt.

De voedingsbodem, beschreven in Tabel 3, zal gebruikt worden als modelbodem. De ingrediënten van deze voedingsbodem zullen vervangen worden door budgetvriendelijke alternatieven. De koolstofbron glucose, een monosacharide, wordt vervangen door sucrose, een disacharide van glucose en fructose. Vermoedelijk zal de groeisnelheid over het algemeen hierdoor licht dalen omdat er nu een groter suiker opgenomen moet worden, maar dit is niet van belang bij het kweken van een monocultuur. Als bron van eiwitten, stikstof (organisch en anorganisch), fosfaat, zwavel en andere nutriënten zal kunstmest gebruikt worden. Gistextract wordt toegevoegd als extra bron van organische stikstof.

3.2.1.1 Kunstmest

Er zullen drie verschillende kunstmestsoorten getest worden: “Naturen Bio Moestuinmest”, “DCM MIX 5” en een vloeibare meststof “PELCKMANS voeding universeel”. De samenstelling van de eerste kunstmest is: 5 % organische N, 3 % P₂O₅, 7 % K₂O en 49,5 % organisch materiaal. De organische stof is afkomstig van vleesbeendermeel, meel van koeken van oliehoudende zaden, verenmeel, beendermeel, bloedmeel en gedroogde organische zeewieren. De tweede kunstmestsoort bestaat uit: 2 % ammonium N, 3,5 % ureum N, 4,5 % organische N, 4 % P₂O₅, 8 % K₂O, 3 % MgO en 36 % organisch materiaal. De eerste twee soorten kunstmest zijn korrelvormig. De derde (vloeibare) meststof bevat: 1,75 % nitraatstikstof, 1,75 % ammoniumstikstof en 3,5 % carbamidstikstof (ureum), 3% P₂O₅ en 5 % K₂O.

De eerst besproken kunstmest, “Naturen Bio Moestuinmest” bevat in totaal 64,5 % aan nutritioneel nuttige componenten. Het overige percentage is niet gekend, vermoedelijk is dit een (biodegradeerbare) vulstof die structuur geeft aan de korrels. De af te wegen massa (bij het maken van de voedingsbodem) zal hierdoor vermenigvuldigd worden met de factor 1,55. Bij “DCM MIX 5” worden 58 % aan nutritioneel nuttige componenten beschreven. De af te wegen massa wordt vermenigvuldigd met een factor 1,72. Bij de laatste kunstmest (“PELCKMANS voeding universeel”) wordt enkel een richtwaarde gegeven: 10 ml van de meststof toevoegen aan 1 liter water. Deze richtwaarde geldt voor het bemesten van planten en zal ook gebruikt worden in de voedingsbodem.

3.2.1.2 Gistextract

Als bron van gistextract zal “MARMITE yeast extract” gebruikt worden. Dit is een smeerpasta op basis van gistextract, aangereikt met vitaminen en zout. De procentuele samenstelling is de volgende: < 5 % vetten, 24 % koolhydraten (waarvan 1 % suikers), 3,5 % vezels, 39 % eiwitten, 6,2 % totale N, 9,8 % zout, $5,8 \cdot 10^{-6}$ % vit. B1, $7,0 \cdot 10^{-6}$ % vit. B2, $160 \cdot 10^{-6}$ % niacine, $2500 \cdot 10^{-9}$ % foliumzuur en $15 \cdot 10^{-9}$ % vit. B12.

Omdat de pasta aangereikt is met zout zal dit niet meer extra worden toegevoegd aan de voedingsbodem. De totale procentuele waarde aan nutritionele componenten (met zout en zonder vitaminen) bedraagt 81,3 %, vermoedelijk is het overige percentage water omdat dit een pasta is. De af te wegen massa wordt met een factor 1,23 vermenigvuldigd ter correctie.

3.2.1.3 Samenstelling

Voedingsbodem 1:

De eerste zelf samengestelde voedingsbodem bestaat uit: 40 g/l “Naturen Bio Moestuinmest”, 5 g/l sucrose en 4 g/l “MARMITE yeast extract”. Al de stoffen worden gedoseerd in regenwater.

Voedingsbodem 2:

De tweede zelf samengestelde voedingsbodem bevat: 45 g/l “DCM MIX 5”, 5g/l sucrose en 4g/l “MARMITE yeast extract”. Al de stoffen worden gedoseerd in regenwater.

Voedingsbodem 3:

De derde voedingsbodem bevat 10 ml/l “Pelckmans voeding universeel”, 10 g/l sucrose en 4 g/l “MARMITE yeast extract”. Al de stoffen worden gedoseerd in regenwater.

3.2.2 Werkwijze

Om de voedingsbodem op laboschaal te testen zijn er flessen van twee liter beschikbaar. Iedere bodem wordt in drievoud getest. De bodems worden gesteriliseerd in de flessen door de tyndallisatietechniek toe te passen. Vervolgens worden deze bodems getest op steriliteit en geënt met gekende bacteriestammen nl. *Acinetobacter oleivorans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Pantoea ananatis* en *Pseudomonas aeruginosa*. Tijdens de incubatie zal de groei worden opgevolgd (visueel).

De flessen worden gevuld met 1,5 liter voedingsbodem, bereid zoals beschreven in “3.2.1.3 Samenstelling”. Ze worden getyndalliseerd volgens de procedure beschreven in “Tabel 4: Tyndallisatieprocedure labo” op pagina 19. Vervolgens worden de flessen een week geïncubeerd op 37°C. Na deze procedure worden de voedingsbodems getest op steriliteit (in petrischalen). Ook zal de groeimogelijkheid van verschillende gekende bacteriestammen in de zelfgemaakte voedingsbodem getest worden. De gekende bacteriën zijn opgeslagen in het labo, ze zijn ingevroren in een glyceroloplossing en moeten vanuit deze oplossing opgekweekt worden. Het opkweken gebeurt eerst in een klein volume voedingsbodem (10 ml) vooraleer ze geënt wordt in de flessen (ca. 1,5 liter).

Tabel 4: Tyndallisatieprocedure labo

	Dag 1	Nacht 1	Dag 2	Nacht 2	Dag 3
Temperatuur	>95°C	37°C	>95°C	37°C	>95°C
Tijd	30 min.	Overnacht	30 min.	overnacht	30 min.

3.2.2.1 Test op steriliteit

De voedingsbodem in de flessen wordt vooraf gehomogeniseerd. Op steriele wijze wordt er 1 druppel van het medium op een petrischaal overgebracht. De petrischaal bevat een algemene voedingsbodem (LB 0,5 %¹⁶ in dit geval). De vloeistof wordt verspreid en geïncubeerd op 30°C voor een periode van een week. Na 48 uur kan er al voor een eerste maal gecontroleerd worden

¹⁶ LB 0,5 % of Luria Bertrani 0,5 % is een algemene, eiwitrijke voedingsbodem voor bacteriën met 0,5 % NaCl.

op groei, indien er merkbaar groei aanwezig is kan de test beëindigd worden. Indien er geen groei zichtbaar is wordt er verder geïncubeerd. Per fles worden er twee petrischalen geënt.

Indien er na een week incubatie (30°C) op de petrischalen geen groei merkbaar is kan er besloten worden dat het voedingsmedium steriel is. Ook is dan aangetoond dat de tyndallisatiemethode geschikt is om de (zelf samengestelde) voedingsbodem te steriliseren.

3.2.2.2 Test op groeimogelijkheid

Nadat een hoeveelheid voedingsbodem geënt werd op de petrischaaltjes (test op steriliteit), kan de groeimogelijkheid van gekende bacteriën in deze bodem getest worden. De voedingsbodem wordt eerst geautoclaveerd om de steriliteit te garanderen, vervolgens wordt deze op steriele wijze verdeeld over buisjes van 50 ml. Van elke fles (voedingsbodem) worden er een aantal buisjes gevuld. De groeimogelijkheid van verschillende (beschikbare) bacteriën wordt in duplo getest. Deze bacteriën worden geënt in de buisjes met voedingsbodem en geïncubeerd op 30 °C voor minstens 12 uur. De proef wordt in tweevoud uitgevoerd per voedingsbodem per bacterie.

3.3 Isolatie van mazoutmetaboliserende bacteriën uit de bodem

Bacteriën waar verontreinigde bodems mee gesaneerd worden, zijn bij de methode die PSMT toepast afkomstig van deze bodems zelf. Ze worden op een steriele wijze gewonnen uit de grond en/of de wortels van bomen of planten (populieren of wilgen) die aanwezig zijn. De isolatie en selectie van de bacteriën gebeurt in het labo (extern). Ze worden in een monocultuur van 1,5 liter geleverd om de bioreactor te enten. Hieronder wordt een samenvatting van de isolatieprocedure in het labo gegeven, de volledige procedure is beschreven in “Bijlage 6: Isolatieprocedure mazoutmetaboliserende micro-organismen”.

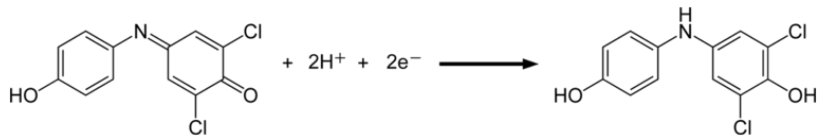
3.3.1 Staalname (in de verontreinigde bodem)

Er wordt met een metalen handboor (type “edelmanboor”) geboord tot op de plaats waar de bodemverontreiniging begint (mazoutgeur is waarneembaar). Op dit moment wordt de boor ontdaan van zand en het kopstuk wordt gesteriliseerd door afbranding met een gasbrander. Centraal uit de volgende hoeveelheid opgeboorde verontreinigde bodem wordt op steriele wijze een bodemstaal genomen en overgebracht in een steriele Falcon buis (50 ml). Dit wordt tien maal gedaan. In het labo worden de stalen verdund tot een 10^{-5} verdunning met 10 mM $MgSO_4$. De verdunningen worden geënt op een vaste voedingsbodem in petrischalen om de bodembacteriën te isoleren.

3.3.2 Schatting van de afbraakcapaciteit van diesel bij enkelvoudig geïsoleerde bacteriën

Om de mazoutafbraakcapaciteit van de geïsoleerde bacteriën na te gaan worden de bacteriën in een eerste stap apart opgekweekt in 5 ml standaard vloeibare voedingsbodem. Vervolgens worden de bacteriën geënt in een steriele voedingsbodem met als enige koolstofbron filter gesteriliseerde diesel. DCPIP¹⁷ is aanwezig in als redoxindicator. Het medium wordt geïncubeerd op 30°C voor 48 uur. Wanneer de aanwezige diesel gemetaboliseerd (geoxideerd) wordt door bacteriën zal DCPIP optreden als elektronenacceptor en reduceren.

¹⁷ 2,6-Dichlorofenolindofenol of 2,6-dichloorindofenol

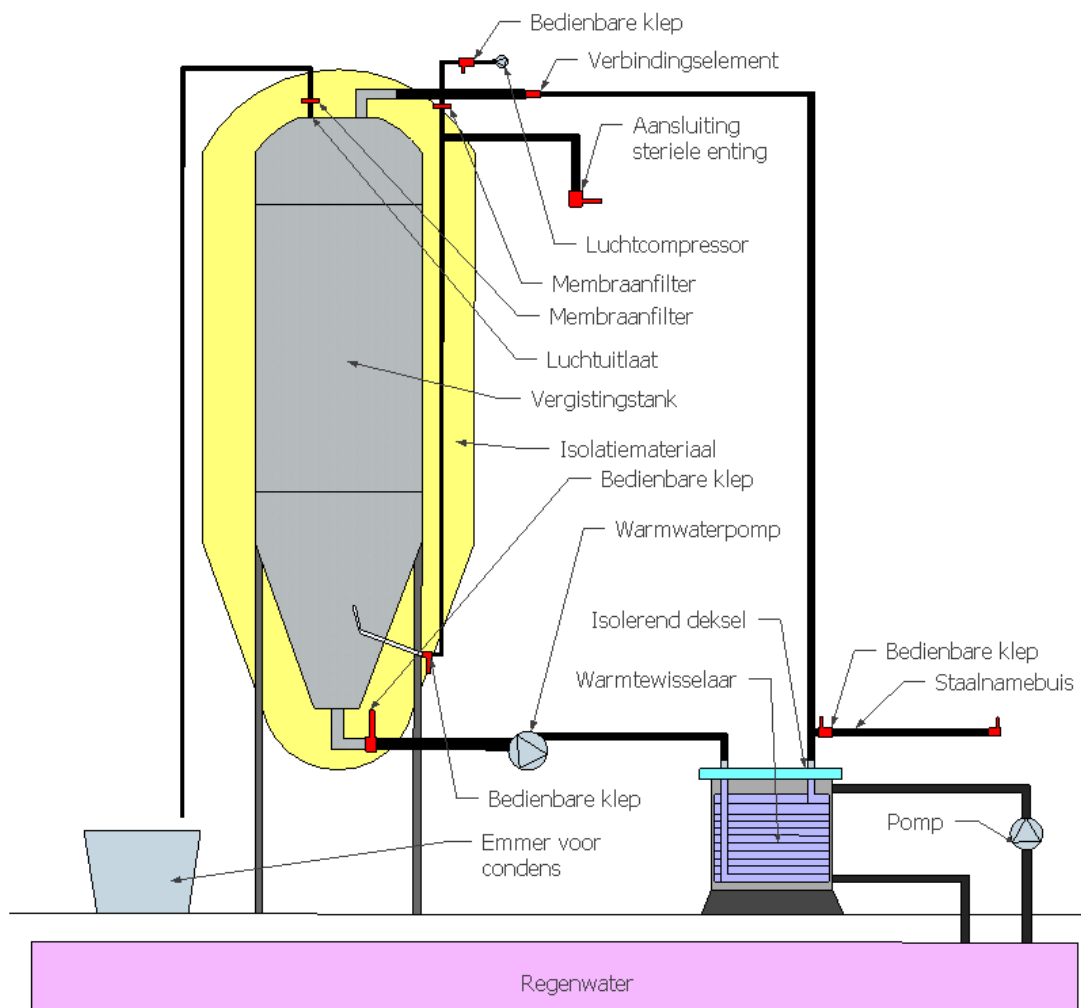


Figuur 7: De reductiereactie van DCPIP (Bidoia, Montagnolli, & Lopes, 2012)

De reductie van DCPIP gaat gepaard met een visuele kleurverandering van blauw naar kleurloos. Deze verandering wordt opgevolgd door de absorptie te meten bij een golflengte van 605 nm. Indien het medium verkleurd is (van blauw naar kleurloos) is de geënte bacterie in staat om minstens (bepaalde fracties) diesel te degraderen, deze bacteriën worden aan verdere testen onderworpen in het labo.

3.4 Reactorkamer en 250 l Bioreactor

De ruimte waar de reactor zich bevindt is afgesloten van de omgeving. De reactorkamer is voorzien van een UV-C TL-lamp van 55 Watt (van het merk "XCear") die brandt wanneer er niemand aanwezig is in de ruimte. Het risico op infectie wordt zo beperkt. Wanneer er iemand de ruimte betreedt wordt de UV-lamp uitgeschakeld. Figuur 8 geeft de schematische opstelling van de bioreactor weer en Figuur 9 visualiseert de reactor zoals deze uiteindelijk gebouwd is.



Figuur 8: Schematische opstelling van de bioreactor



Figuur 9: Bioreactor in reactorkamer

De bioreactor is opgebouwd uit een vergistingstank die verbonden wordt met een warmtewisselaar via hitteresistente rubberen slangen. De voedingsbodem wordt continu rondgepompt (doorheen de warmtewisselaar) om op de gewenste temperatuur te blijven.

3.4.1 Vergistingstank

De vergistingstank van "Blichmann™ Fermentor™ gistingstank tri clamp 158 l met uitbreiding van 158 l" heeft een diameter van 55 cm. Het bovenste deel is in totaal 35 cm hoog. Het middelste deel is 62 cm hoog en het onderste 77 cm. Het onderste deel bestaat gedeeltelijk uit een omgekeerde kegel met een hoogte van 52 cm. Omdat de vergistingstank bovenaan sferisch is wordt er om de volumeberekeningen te vereenvoudigen het sferische deel weggelaten (10 cm). Met deze gegevens wordt het volume van de vergistingstank berekend:

De inhoud van de cilinder = $r^2 * \pi * h = 27.5^2 * \pi * 112 = 265 * 10^3 \text{ cm}^3$ of 265 liter

De inhoud van de kegel = $\frac{1}{3} r^2 * \pi * h = 1/3 * 27.5^2 * \pi * 52 = 41 * 10^3 \text{ cm}^3$ of 41 liter

Het totale volume wordt dan 306 liter indien de tank tot op 10 cm van de top in gebruik is. Er zal gewerkt worden met volumes van ca. 250 liter dus de vergistingstank zal gevuld zijn tot op een hoogte van 140 cm of tot op 34 cm van de top. Voor een volume van ca. 240 liters is dit 38 cm van de top en een volume van ca. 90 liter 101 cm.

3.4.2 Warmtewisselaar

De warmtewisselaar die gebruikt wordt om de voedingsbodem op temperatuur te brengen bestaat uit een spiraalvormige koperen buis van 10 m, deze leiding heeft een binnendiameter van 15 mm. De spiraal is ondergedompeld in een waterbad waarvan de temperatuur ingesteld kan worden. De voedingsbodem wordt continu door deze warmtewisselaar gepomp door gebruik te maken van een warmwaterpomp die net voor de warmtewisselaar bevestigd is. De pomp is een standaard circulatiepomp van OEG® (39 Watt) die in verwarmingsinstallaties van gebouwen gebruikt wordt.

Om na te gaan in welke mate de voedingsbodem wordt opgewarmd zal de opwarmsnelheid en de maximaal bereikbare temperatuur op voorhand bepaald worden. De testen worden uitgevoerd met regenwater. Ook de afkoelsnelheid is van belang. Indien er niet gekoeld wordt kan het lang duren om een volume van ca. 250 liter van 100°C tot 37°C af te koelen in een geïsoleerde bioreactor. Daarom zal de warmtewisselaar ook dienst doen als koeling. Bij het koelen wordt er continu regenwater (dat zich in een ondergrondse regenwatertank bevindt) over de warmtewisselaar gepompt. Om dit te recupereren wordt het weer opgevangen in het regenwaterreservoir (ondergronds).

3.4.3 Verbindingslangen

Om de vergistingstank te verbinden met de warmtewisselaar (via de pomp,) worden rubberen, temperatuurbestendige slangen gebruikt (radiatorslangen). De slangen zijn gemaakt uit EPDM rubber, verstevigd met textiel. Voor de beluchting is eenzelfde slang gebruikt. Er worden twee verschillende maten gebruikt. De slang met de grootste diameter (2,5 cm) is bevestigd aan de vergistingstank, die met de kleinste diameter (1,3 cm) aan de warmtewisselaar. Van deze laatste slang is eveneens gebruik gemaakt bij de beluchting.

De grote en de kleine slangen staan met elkaar in verbinding via koperen tussenstukken en metalen kraantjes. De slangen worden over een passend kopstuk geschoven en vastgemaakt met een klemband. De kopstukken zijn m.b.v. een schroefdraad op de verschillende verbindingstukken gedraaid. Om te voorkomen dat de vloeistof zal lekken en dat er geen rechtstreeks contact is tussen verschikende metaalsoorten worden al de schroefdraden omwonden met een strip teflon¹⁸.

3.4.4 Luchtcompressor

De druk van de lucht die de compressor levert moet groter zijn dan de hydrostatische druk die geleverd wordt door de voedingsbodem. De wet van Pascal wordt gebruikt om deze druk te berekenen: $P = P_0 + pgh$. P_0 is de druk aan het vloeistofoppervlak (Pa), p de dichtheid (kg/m^3), g de valversnelling ($9,81 \text{ m/s}^2$) en h de hoogte van de vloeistof (m). P_0 komt meestal overeen met de luchtdruk, omdat enkel de overdruk nodig is bij de keuze van de compressor wordt deze term weggelaten bij de berekening. Deze voedingsbodem bestaat voornamelijk uit water dus wordt

¹⁸ Teflon of PTFE is een vrijwel inerte, en temperatuurreistente (tot 300°C) kunststof.

enkel de massadichtheid van water (bij kamertemperatuur) gebruikt in de berekening. De hoogte van de vloeistof zal maximaal 1,5 m boven de luchtinlaat bedragen.

Door bovenstaande gegevens in te vullen in de wet van Pascal wordt er een overdruk van 0,0147 MPa berekend. De gebruikte compressor (HAILEA® ACO-328) levert een overdruk van minstens 0,03 MPa, dit volstaat om de vergistingstank te beluchten.

3.4.5 Filters

Er worden twee membraanfilters gebruikt. De filters bestaan uit PTFE, hebben een poriegrootte van 0,2 μm en zijn geschikt om zowel vloeistoffen als gassen te filteren. Ze zijn van het merk "Millex®". Een HEPA filter wordt gebruikt om de lucht te filteren (aan de inlaat) vooraleer deze door de membraanfilter gaat. Dit verkleint de kans op verstopping van de membraanfilter. De filters worden boven het vloeistofniveau in de vergistingstank bevestigd. Indien dit niet gedaan wordt en de druk op de perslucht te laag is, kan de voedingsbodem door de filter de fermentor uitstromen.

3.4.6 Hydraulische test

De reactor wordt gevuld met water om na te gaan of deze volledig is afgesloten van de omgeving (uitgezonderd de lucht-in en -uitlaat). Zowel de pomp als de beluchting worden aangezet. Gedurende een volledige week zullen al de aansluitingen gecontroleerd worden op lekken. De controle gebeurt door de reactor op een droge ondergrond te plaatsen en iedere dag wordt er nagegaan of er ergens water ontsnapt.

3.4.7 Isolatie van de vergistingstank

Omdat de vergistingstank een grote oppervlakte heeft gaat dit gepaard met veel warmteverlies naar de omgeving. De tank wordt volledig geïsoleerd met glaswol. Roestvrij staal heeft een warmtegeleidingscoëfficiënt van minimum 16 W/(mK), die van glaswol bedraagt maximum 0,04 W/(mK). De volledige oppervlakte van de vergistingstank wordt omwikkeld met een 15 cm dikke isolatielaag.

3.5 Werking bioreactor

In dit deel wordt beschreven hoe al de handelingen m.b.t. de bioreactor uitgevoerd worden. De handelingen gaan van het maken van de voedingsbodem tot het oogsten van de bacteriën.

3.5.1 Sterilisatie membraanfilters en leidingslangen

Om de membraanfilter bij de luchtinlaat te steriliseren wordt de volledige luchtleiding, van de filter tot de reactor gevuld met een 99 % gedenatureerde ethanoloplossing. Het vullen gebeurt met een injectiespuit. De entingsslang wordt geïnjecteerd tot deze volledig gevuld is. De ethanol zal minstens 24 uur in de leidingen verblijven bij kamertemperatuur. Zowel de membraanfilter als de luchtleidingen zijn nu steriel. De rubberen luchtleidingen hebben een totale lengte van 360 cm en een diameter van 1,3 cm, dit geeft een volume van ca. 48 cm³ of 0,48 liter ethanol. De ethanol komt bij het opstarten van de beluchten in de voedingsbodem terecht, waar het verdund wordt door 250 liter voedingsbodem. Hierdoor bedraagt de uiteindelijke concentratie aan ethanol ca. 0,2 %. Deze concentratie heeft geen remmende werking op de bacteriën.

3.5.2 Bereiding voedingsbodem

Om ervoor te zorgen dat de voedingsbodem gemakkelijk toe te voegen is aan de reactor wordt deze op voorhand opgelost in een kleiner volume van 5 – 10 liter. Het oplossen van de voedingsbodem verloopt als volgt:

- Neem een lege beker of emmer van 10 liter;
- Doe 2,5 liter “Pelckmans voeding universeel” in de beker;
- Voeg 2,5 kg sucrose toe en los op (voeg indien nodig water toe);
- Los vervolgens 1 kg “MARMITE yeast extract” op;
- Voeg water toe indien bovenstaande stoffen niet volledig oplossen (tot maximum 10 liter).

De bioreactor wordt gevuld met ca. 240 liter water (tot op 38 cm van het vuldeksel) en opgewarmd tot 50°C. De vooraf bereide voedingsbodem wordt toegevoegd wanneer de temperatuur in de vergistingstank boven de 50 °C is. De voedingsbodem wordt pas later toegevoegd om twee redenen. Een eerste reden is omdat de opwarmsnelheid zeer traag is (ca. 0,1°C/min), hierdoor is de kans groter dat er zich al (ongewenste) micro-organismen zullen vermenigvuldigen. Door de (geconcentreerde) voedingsbodem toe te voegen wanneer de tank op temperatuur is, zijn de condities minder gunstig voor de groei van de meeste micro-organismen. Een tweede reden waarom het voedingsbodem-concentraat wordt toegevoegd op temperatuur is dat deze zeker goed in oplossing zal blijven zodat de leidingen niet verstopten.

De reactor wordt gevuld met ca. 240 liter water vooraleer de geconcentreerde voedingsbodem van ca. 10 liter eraan wordt toegevoegd. Er zit nu ca. 250 liter in de bioreactor, voor dit totale volume werd de geconcentreerde voedingsbodem berekend en bereid.

3.5.3 Sterilisatie vergistingstank

De techniek die gebruikt wordt voor de sterilisatie is “tyndalliseren”. Door de voedingsbodem rond te pompen via de warmtewisselaar, wordt de vergistingstank op een temperatuur gebracht die de 100°C benadert. De temperatuur van de voedingsbodem wordt opgevolgd tot deze boven 95°C is. Deze temperatuur wordt minstens 120 minuten aangehouden. Vervolgens wordt de verwarmingsketel afgezet en gekoeld tot een temperatuur van 37 °C bereikt is. Deze temperatuur wordt een volledige dag aangehouden. Warmteverliezen worden beperkt door de temperatuur van de reactorkamer eveneens in te stellen op de gewenste incubatietemperatuur. De volgende dag wordt de voedingsbodem weer verwarmd tot boven de 95°C voor 120 minuten, gevolgd door weer een dag incubatie op 37°C. De voedingsbodem dient nu nog een keer verwarmd te worden tot boven de 95°C voor 120 minuten. Na deze laatste stap is de voedingsbodem steriel. De stappen zijn hieronder weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5: Tyndallisatieprocedure bioreactor

	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5
Temperatuur	> 95°C	37°C	> 95°C	37°C	> 95°C
Tijd	120 min.	24 uur	120 min.	24 uur	120 min.

3.5.4 Steriele luchttoevoer opstarten

Na de eerste tyndallisatiestap (één keer > 95°C en weer afgekoeld tot 37°C) wordt de luchttoevoer gestart. Omdat de membraanfilter verzadigd is met ethanol zal er een grotere druk

dan 0,03 MPa nodig zijn om deze vloeistof er vlot doorheen te persen. De membraanfilter wordt aangesloten op een zwaardere compressor¹⁹ (tot 2 bar) totdat de opborrelende luchtballen te horen zijn in de reactor. Deze stap duurt slechts enkele seconden, er kan meteen weer gewisseld worden van de zware compressor naar de beluchtingscompressor die een druk van 0,03 MPa (of 0,3 bar) levert. De druk van ca. 2 bar is enkel nodig om de luchtinlaatfilter droog te blazen. Wanneer er ethanol in de filter zit, heeft deze een grotere weerstand. Het is niet mogelijk om met de compressor van 0,3 bar de vloeistof doorheen en uit het membraan te persen. De membraanfilters zijn bruikbaar tot 4 bar dus de tijdelijke drukverhoging (tot 2 bar) heeft geen invloed op de filterwerking. Omdat de filter aan de luchtuitlaat niet verzadigd is met vloeistof is er geen (ontoelaatbare) drukopbouw in het reactorvat.

3.5.5 Enten van de bioreactor

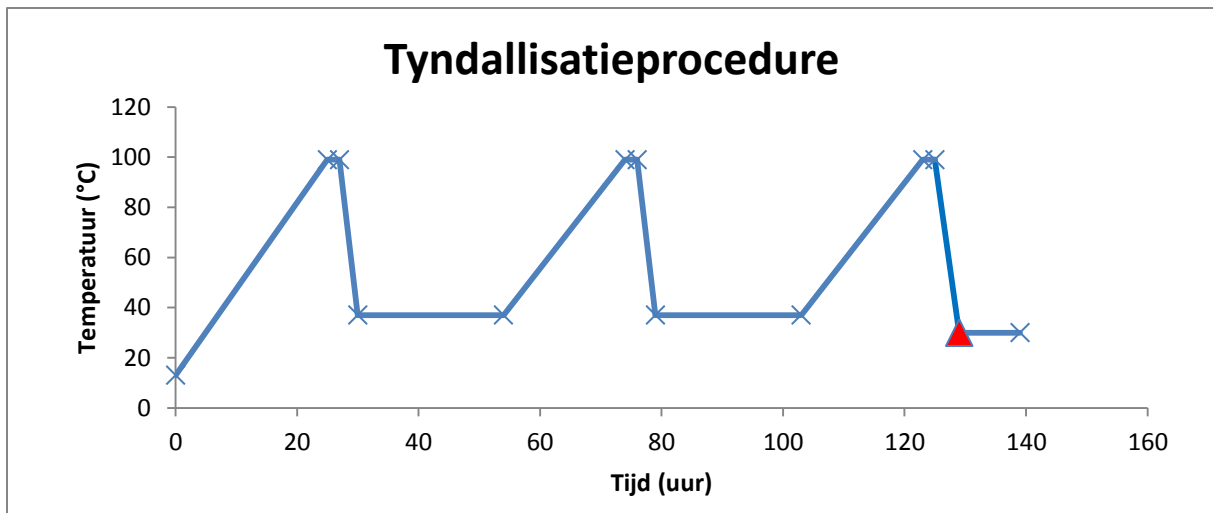
De gewenste bacterie wordt door het labo geleverd in 1,5 liter vloeibaar medium, hetzelfde medium dat aanwezig is in de bioreactor. De bacteriecultuur die geleverd wordt door het labo zit in de exponentiële of stationaire fase wanneer er geënt wordt. De bacteriesoort en de incubatieperiode worden bepaald tijdens het labo-onderzoek. Wanneer en hoe de reactor geënt wordt, is hieronder beschreven. De bacterie die bij dit onderzoek gebruikt wordt is *Chryseobacterium lathyri*, een bacterie die geïsoleerd werd bij een saneringsproject te Beverlo.

3.5.5.1 Tijdstip en temperatuur

Onderstaande curve geeft de tyndallisatieprocedure weer. De enting van de reactor gebeurt na de tyndallysatie, wanneer de reactor op een gewenste temperatuur is. In Figuur 10 wordt met een rode driehoek het tijdstip van enting gegeven, vanaf dit punt mag er geënt worden.

De tussentijdse incubatie gebeurt steeds op 37°C terwijl de gewenste bacterie geïncubeerd wordt op 30°C. Deze methode verkleint de kans dat er pathogene micro-organismen kunnen groeien na het enten van de bioreactor. Omdat er tussentijds geïncubeerd wordt op 37°C (lichaamstemperatuur) is de kans groter dat voor de mens pathogene bacteriesporen ontkiemen en vernietigd kunnen worden.

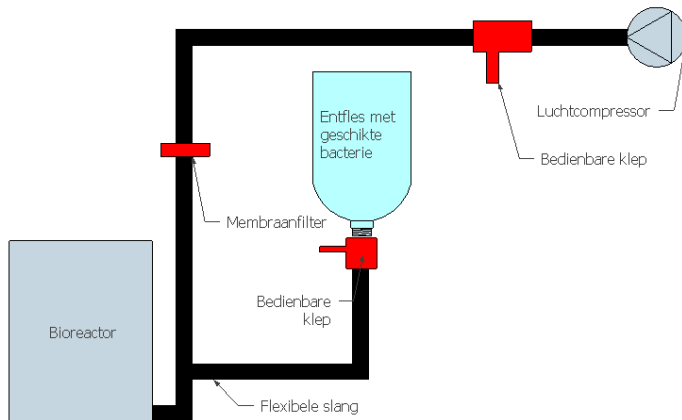
¹⁹ Dit kan eender welk type compressor zijn, het doel is enkel om de ethanol uit de filter te blazen met een maximale overdruk van 2 bar. Zelfs een eenvoudige fietspomp waarop de druk gemeten wordt kan volstaan.



Figuur 10: Tijdstip en temperatuur van enting

3.5.5.2 Methode 1

De enting van de bioreactor gebeurt door 1,5 liter monocultuur van de gewenste bacterie (bereid in het labo) toe te voegen aan de reactor. De reactor is gevuld met voedingsbodem op de gewenste temperatuur. Het enten gebeurt op een steriele manier bij de luchtinlaat. Omdat de enting op deze plaats gebeurt, zal de entings slang samen met de beluchtings slang gesteriliseerd worden door de initieel toegevoegde alcohol om de luchtfilter te steriliseren. Een schematische voorstelling wordt weergegeven in Figuur 11.

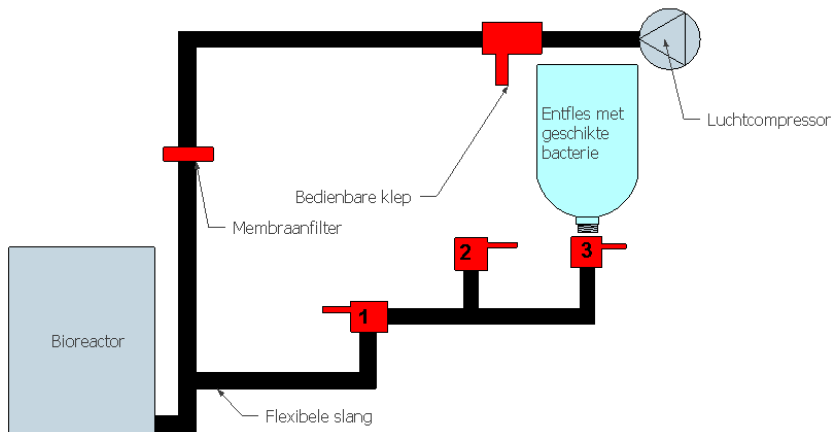


Figuur 11: Schematische voorstelling van het enten van de bioreactor (methode 1)

De kop van de entfles wordt, onder de vlam van een gasbrander, steriel aangesloten op de afgebrande bedienbare klep (Figuur 11). De luchtcompressor blijft continu lucht door de slangen persen terwijl de entingsfles ondersteboven wordt gekanteld en de bedienbare klep wordt opengezet. De voedingsbodem in de fles (met de gewenste bacterie) loopt de bioreactor in en de fles vult zich met lucht. Wanneer de voedingsbodem uit de fles is wordt de klep weer dichtgedraaid en ontkoppeld, de reactor is geënt.

3.5.5.3 Methode 2

Bij de tweede methode komt geen gasbrander aan te pas. De sterilisatie gebeurt hier met gedenatureerde ethanol (99%). De schematische voorstelling van deze methode wordt weergegeven in “Figuur 12: Schematische voorstelling van het enten van de bioreactor (methode 2)”.



Figuur 12: Schematische voorstelling van het enten van de bioreactor (methode 2)

Bij deze methode wordt de entfles, samen met kraan nr. 3 (geautoclaveerd) geleverd door het labo. Deze wordt gemonteerd zoals weergegeven op bovenstaande figuur. Kranen nr. 1 en 3 zijn dicht terwijl de ingesloten leiding gevuld wordt met gedenatureerde ethanol (99%) door kraan nr. 2. Het vullen gebeurt voldoende langzaam zodat de aanwezige lucht langst kraan nr. 2 kan ontsnappen (dit is mogelijk omdat de leidingen vrij breed zijn: 1,3 cm). De entfles wordt geïsoleerd om het warmteverlies te beperken. Wanneer de ethanol 24 uur in de leiding is geweest kan er geënt worden. Het enten gebeurt door eerst kraan nr. 1 open te zetten zodat eerst de ethanol wegstroomt en gemengd wordt met de reactorinhoud, en vervolgens kraan nr. 3. Op deze wijze wordt het contact tussen entmateriaal en geconcentreerde ethanol vermeden.

3.5.6 Controle op groei

De groei kan niet visueel opgevolgd worden door de troebelheid van het medium te controleren gezien er een reële kans bestaat dat de voedingsbodem tijdens het tyndallisatieproces troebel wordt. Omdat de geënte bacteriën geleverd worden in hetzelfde medium dat ook aanwezig is in de bioreactor, en omdat de bioreactor dezelfde temperatuur als de entfles heeft, zullen de geënte bacteriën vrijwel onmiddellijk beginnen met vermenigvuldigen.

De incubatieperiode wordt ingeschat op basis van de waargenomen incubatieperiode bij het bereiden van het entmateriaal in het labo. Vlak voor het oogsten wordt er nog een staalname uitgevoerd. Dit staal wordt in het labo gecontroleerd op de aanwezigheid van de gewenste monocultuur. De exacte concentratie kan bepaald worden door verdunnen en uitplaten. Deze concentratie wordt dan vergeleken met de concentratie in de entfles om de mate van bacteriële groei na te gaan.

3.5.7 Staalname

Een steriele staalname wordt uitgevoerd net voor en op het einde van het kweekproces. Er is een staalnameleiding/aftappunt gemonteerd achter de pomp. Net zoals bij het enten zijn er twee verschillende methodes getest. Bij de eerste methode is een gasbrander vereist, de tweede maakt gebruik van gedenatureerde ethanol om steriel te werken.

3.5.7.1 Methode 1

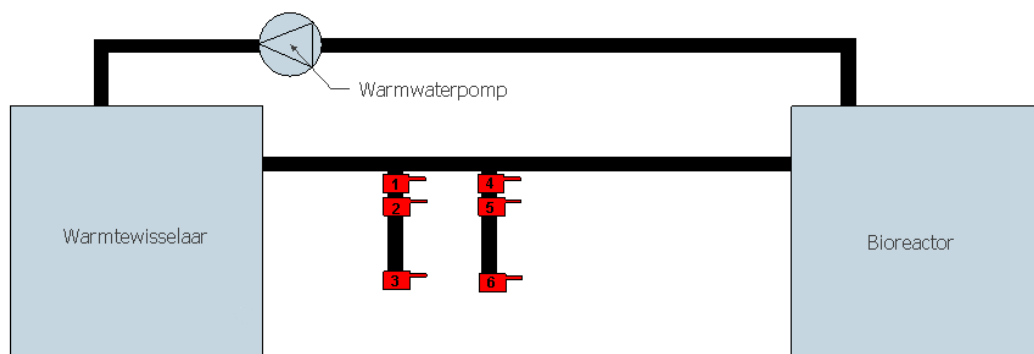
De leiding is voorzien van twee kranen en is gevuld met gedenatureerde ethanol (99 %). Om een staalname uit te voeren wordt de binnenste kraan opgedraaid en meteen erna de buitenste. Eerst zal de gedenatureerde ethanol (aanwezig in de leiding) uit de leiding vloeien, deze wordt opgevangen in een afvalbeker. Wanneer het voedingsmedium uit de leiding begint te vloeien wordt de buitenste kraan dichtgedraaid en een gasbrander steriliseert de kop van de kraan.

Gebruik een gesteriliseerde borosilicaatglazen²⁰ fles van twee liter om een staal te nemen. Draai de dop er af en vlam het kopstuk uit. Steek de uitgevlamde kop van de kraan in de fles en zet de kraan open zodat het staal de fles inloopt. Doe dit in de nabijheid van een blauwe vlam. Vlam het kopstuk van de fles opnieuw uit, sluit de kraan en draai de dop weer op de fles. De steriele staalname is uitgevoerd. Draai ook de binnenste kraan dicht.

Ter voorbereiding van een volgende steriele staalname zal de aanwezige voedingsbodem tussen de twee kranen verwijderd worden door de buitenste kraan weer open te zetten. Het aanwezige medium vloeit uit de leiding en deze wordt vervolgens gevuld met gedenatureerde ethanol (99 %). De volgende staalname kan 24 uur later uitgevoerd worden omdat er tijd nodig is om de leiding steriel te maken met ethanol (99 %). De volledige procedure is beschreven in "Bijlage 4: Staalnameprocedure: methode 1 (gasbrander)".

3.5.7.2 Methode 2

De tweede methode maakt gebruik van twee stukken leidingen die ontkoppeld worden. Zo kan het volledige stuk naar het labo getransporteerd worden. Het medium komt op deze manier niet in contact met de omgeving dus er is geen gasbrander vereist. De methode wordt uitgelegd aan de hand van Figuur 13.



Figuur 13: Steriele staalname (doorstroomslang)

²⁰ Borosilicaatglas is een hitteresistente glassoort.

In de bovenstaande figuur is te zien dat er twee leidingen, met telkens drie kranen, bevestigd zijn op het circuit van de bioreactor. Ieder stuk leiding is een staal dus er kunnen in dit geval twee stalen genomen worden. In het begin zijn de twee leidingen volledig gevuld met gedenatureerde ethanol (99%) en zijn kraan 1, 3, 4 en 6 dichtgedraaid. Om het eerste staal te nemen wordt eerst kraan 1 opengedraaid met daaropvolgend kraan 3. De aanwezige ethanol wordt, samen met ca. 1 liter voedingsbodem, opgevangen in een afvalbeker. Vervolgens wordt eerst de buitenste kraan (kraan 3) dichtgedraaid, daarna volgen kranen 1 en 2. Het staal bevindt zich nu tussen kranen 2 en 3 en dit kan eenvoudig losgekoppeld worden van de bioreactor. Dit staal kan in zijn geheel naar het labo waar het op steriele wijze uitgeplaat wordt in petrischalen. Het tweede staal wordt identiek genomen met kranen 4, 5 en 6.

3.5.8 Oogsten

Het oogsten van de bacteriën gebeurt aan het aftappunt waar ook stalen genomen worden. Omdat de eindbestemming van de bacteriën een verontreinigende bodem is, moeten de bacteriën niet steriel geoogst worden. Het oogsten gebeurt door een slang aan het aftappunt te bevestigen. De bacteriecultuur kan vervolgens naar een gepast vat voor transport gepompt²¹ worden.

²¹ Dit gebeurt met dezelfde pomp (circulatiepomp) die het medium door de warmtewisselaar pompt (OEG® 39 Watt).

4. Resultaten en waarnemingen

4.1 Labo (voedingsbodem)

Het voedingsmedium wordt bereid bij PSMT bvba te Lommel, ook de tyndallisatie wordt hier uitgevoerd. De labotesten worden uitgevoerd in het labo van de UHasselt door dr. Panagiotis Gkorezis.

4.1.1 Samenstelling

De zelf samengestelde voedingsbodems, voedingsbodem 1 en voedingsbodem 2 (uit “3.2.1.3 Samenstelling”), losten niet op bij kamertemperatuur, ook na opwarmen tot het kookpunt losten de voedingsbodems niet volledig op. Voedingsbodem 3, beschreven in “3.2.1.3 Samenstelling” lost volledig op. Omdat de voedingsbodem volledig opgelost moet zijn om vlot door de leidingen van de bioreactor te stromen zullen voedingsbodems 1 en 2 niet gebruikt worden. De proef wordt verdergezet met voedingsbodem 3. Onderstaande Afbeelding (Figuur 14) geeft voedingsbodem 3 (links) en voedingsbodem 1 (rechts) weer, voedingsbodem 2 komt qua uitzicht en structuur overeen met voedingsbodem 1.



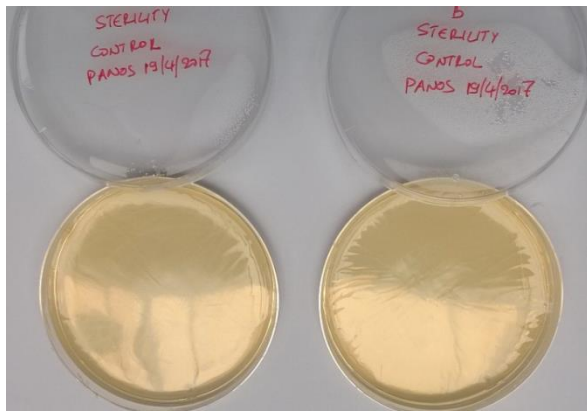
Figuur 14: Bodem 3 (links) en bodem 1 (rechts)

4.1.2 Getyndalliseerde bodem

Na de tyndallisatieprocedure worden de bodems nog een week geïncubeerd op 37°C om de mogelijk aanwezige micro-organismen alsnog te laten groeien. Drie dagen na de tyndallisatie en incubatie met voedingsbodem 3, in drievoud uitgevoerd, wordt een kleurverandering waargenomen. Twee van de drie bodems vertroebelden al na de eerste incubatieperiode, er hebben dus micro-organismen in kunnen groeien. Een van de drie bodems is niet troebel geworden gedurende de tyndallisatieperiode, maar wel lichtjes verkleurd door de warmtebehandeling (iets bruiner). Na een week incubatie op 37°C is de heldere bodem ook licht vertroebeld. De testen worden verdergezet met alle drie de voedingsbodems.

4.1.2.1 Steriliteitstest

De petrischalen werden geënt met de getyndalliseerde voedingsbodems. Na een week incubatie op 30°C wordt er nog steeds geen groei waargenomen. Dit toont aan dat de voedingsbodem steriel is en dat de tyndallisatieprocedure geschikt is om het medium te steriliseren. Figuur 15 geeft de petrischalen weer waarop 1 ml van de getyndalliseerde voedingsbodem geënt en geïncubeerd werd op een standaardvoedingsbodem (LB 0,5% agar of Luria Bertrani agar met 0,5 % NaCl). Op deze figuur is te zien dat er na een week incubatie op 30°C geen bacteriële groei is.



Figuur 15: LB 0,5 % na een week incubatie, steriliteitstest

4.1.2.2 Groeicapaciteit voedingsmedium

Er werden verschillende bacteriën (op steriele wijze) geënt in het zelfgemaakt voedingsmedium. Na een 48 uur incubatie (op 30°C) is visueel zichtbaar (vertroebeling van het medium) dat elke bacterie erin geslaagd is om te groeien in het medium. De geteste bacteriën zijn de volgende: *Acinetobacter oleivorans* PF1, *Acinetobacter calcoaceticus* GK1, *Arthrobacter sp.* SPG2, *Bacillus licheniformis* GB2, *Pantoea ananatis* GB1 en *Pseudomonas aeruginosa* WatG.

4.2 Warmtewisselaar

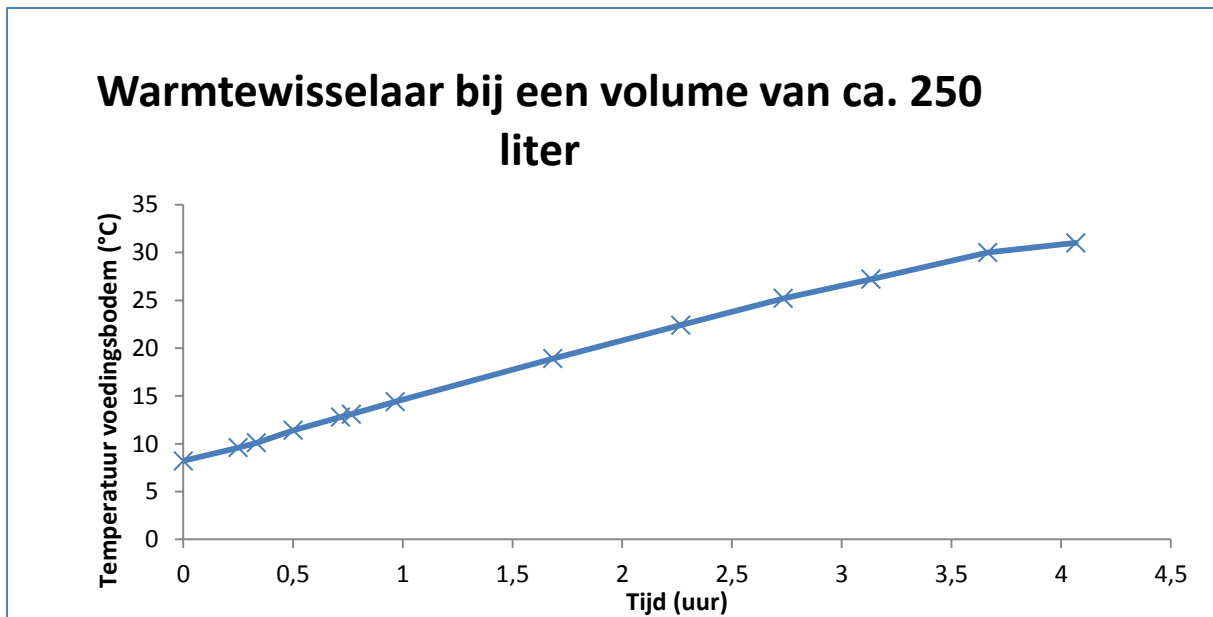
De warmtewisselaar wordt gebruikt om de inhoud van de tank op te warmen en af te koelen. Uit onderstaande proeven kan worden nagegaan hoe snel het water opwarmt en wat de maximaal bereikbare temperatuur is. Ook de koelsnelheid wordt opgevolgd. Tijdens het opwarmen/afkoelen wordt er continu lucht door de vloeistof geblazen bij deze proef.

4.2.1 Opwarmen

Er is energie nodig om een volume water van ca. 250 liter op te warmen tot minstens 95°C. Omdat deze energie geleverd wordt met een brouwketel van 27 liter en 1800 Watt om de opwarming te realiseren zal dit enige tijd in beslag nemen. Hoelang dit precies duurt en welke temperaturen er bereikt worden, zijn hier beschreven.

4.2.1.1 Niet-geïsoleerde vergistingstank

De warmtewisselaar wordt gestart bij kamertemperatuur en het water wordt continu van de vergistingstank door de warmtewisselaar gepompt. De temperatuur van het water wordt in de vloeistof zelf opgevolgd omdat deze niet steriel moet zijn bij deze proef.

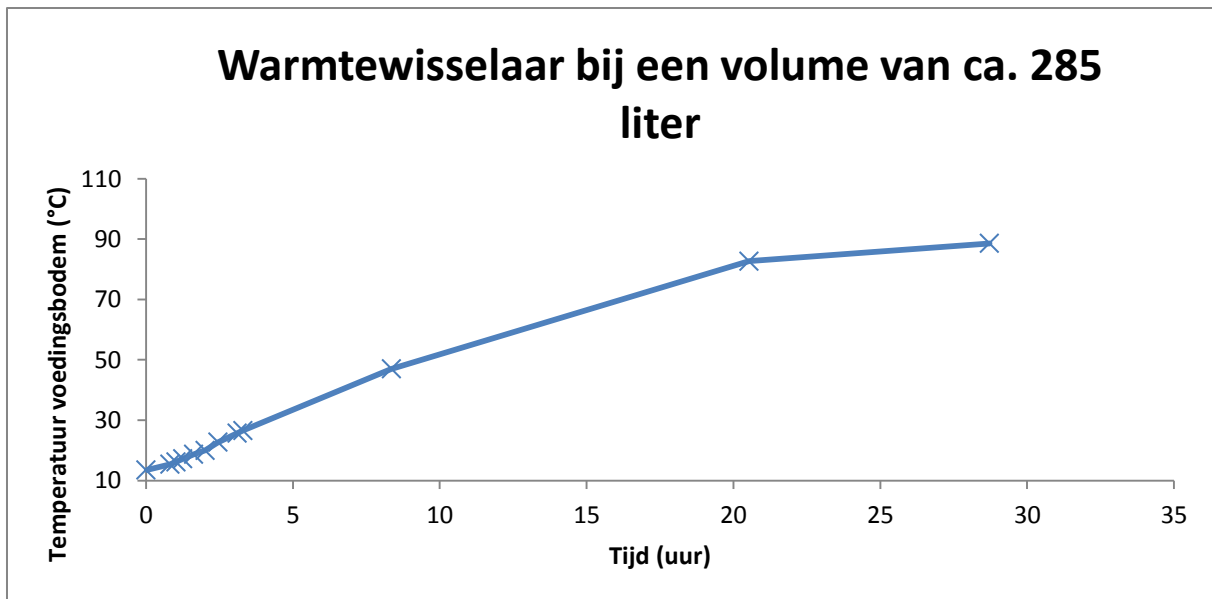


Figuur 16: Opwarmingscurve van de niet-geïsoleerde vergistingstank, gemeten in de vloeistof

Uit bovenstaande curve kan afgeleid worden dat de temperatuurstijging van het water ca. 0,1°C/ minuut bedraagt gedurende vier uur lang (tot ca. 35°C). De warmtewisselaar heeft vervolgens nog een volledige nacht opgestaan, de volgende dag had het water een temperatuur van 60°C bereikt. Dit was meteen ook de maximaal bereikbare temperatuur. Er is een temperatuur groter dan 95°C nodig voor het tyndallisatieproces. Omdat de vergistingstank een grote oppervlakte heeft (van RVS) zal er warmte aan de omgeving verloren gaan. Om dit warmteverlies te minimaliseren wordt de vergistingstank geïsoleerd met een 15 cm dikke laag glaswol.

4.2.1.2 Geïsoleerde vergistingstank

Deze proef verloopt hetzelfde als bovenstaande proef, het verschil is dat de temperatuur continu gemeten wordt aan de buitenkant van de reactor (tussen de vergistingstank en het isolatiemateriaal). Op deze manier blijft de vloeistof steriel. Achteraf wordt de temperatuur van de vloeistof gemeten. Een tweede verschil is dat er een vloeistofvolume van ca. 285 liter gebruikt wordt i.p.v. een volume van ca. 250 liter. Dit grote volume werd gebruikt om de afdichting tussen mantel en kop van de tank te controleren.



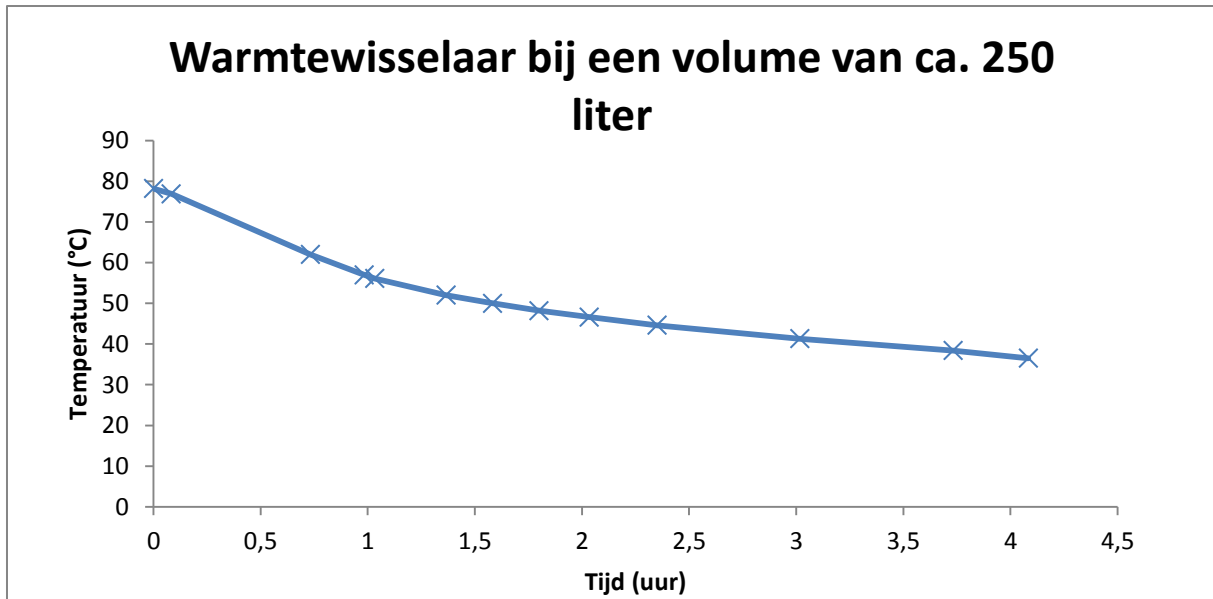
Figuur 17: Opwarmingscurve van de geïsoleerde vergistingstank, gemeten aan de buitenkant van de tank

Het experiment wordt stopgezet na 28 uur en 40 minuten. De gemeten temperatuur bedraagt 88,6 °C (aan de buitenkant van de reactor). Aan de luchtuitlaat wordt een temperatuur van 94,6 °C gemeten en de vloeistof in de reactor heeft een temperatuur van 95,4 °C bereikt. Het water in de warmtewisselaar is 98,7 °C. Deze temperatuur van de vloeistof in de reactor (>95°C) volstaat voor het tyndallisatieproces.

De eerste vier uur wordt er een temperatuurstijging van 0,06°C/minuut waargenomen, deze waarde ligt lager dan bij de proef in “4.2.1.1 Niet-geïsoleerde vergistingstank”. Dit is te wijten aan het grotere volume.

4.2.2 Koelen

Nadat de bioreactor, gevuld met ca. 250 liter voedingsbodem, opgewarmd is tot meer dan 95°C, wordt het koelsysteem gestart. De temperatuur wordt gemeten en opgevolgd aan de buitenkant van de bioreactor, tussen de mantel en de isolatie. Er wordt gekoeld tot 37°C (manteltemperatuur), vervolgens wordt deze temperatuur aangehouden. Het is aangeraden om het koelsysteem te gebruiken, indien er niet gekoeld wordt bedraagt de temperatuur aan de mantel van de reactor nog steeds ca. 60°C na 24 uur.



Figuur 18: Koelcurve van de geïsoleerde vergistingstank, gemeten aan de buitenkant van de tank bij actieve koeling

In Figuur 18 is te zien dat het ongeveer drie uur duurt om de reactor te koelen tot een gewenste temperatuur van 37°C.

4.3 Hydraulische test

Bij de eerste test worden er verschillende lekken gedetecteerd na één dag. De test wordt stopgezet en al de koppelingen worden gecontroleerd. Op de schroefdraad van de koppelingen wordt een nieuwe dikkere teflon omwikkeling aangebracht en de test wordt hernomen. Tijdens de tweede test werd er gedurende een testperiode van een week geen enkel lek waargenomen. De reactor is op hydraulisch vlak in orde.

4.4 Bioreactor: experiment 1

De eerste test met de bioreactor wordt uitgevoerd in de werkplaats zonder dat de reactor afgezonderd is van de omgeving. De reactor wordt gevuld met ca. 250 liter voedingsbodem, getyndaliseerd en geënt met een gekende (en beschikbare) mazoutmetaboliserende en plantgroei stimulerende bacterie, nl. *Chryseobacterium lathyri*.

250 liter voedingsbodem wordt bereid zoals in “3.5.2 Bereiding voedingsbodem” staat beschreven en de procedure in “Bijlage 1: Opstartprocedure bioreactor met tyndallisatie” wordt gevolgd.

4.4.1 Opmerkingen

Er is een probleem na de eerste tyndallisatiestap, de voedingsbodem is mogelijk in de luchtinlaatbuis gestroomd omdat de luchtcompressor was uitgevallen. Deze buis wordt opnieuw gevuld met 99 % ethanol vooraleer de tweede tyndallisatiestap wordt uitgevoerd. Door deze handeling loopt de maximaal aanwezige ethanolconcentratie in de reactor op tot 0,4 %.

Na de tyndallisatieprocedure staat de bioreactor nog twee weken op kamertemperatuur in afwachting van het entmateriaal. Er wordt een staalname uitgevoerd om na te gaan of de voedingsbodem in de fermentor steriel is en de reactor wordt vervolgens geënt.

4.4.2 Waarnemingen

Omdat dit de eerste test is in de bioreactor worden verschillende zaken, zoals de temperatuur, de beluchting en de voedingsbodem, opgevolgd. Tijdens het opvolgen werden er verschillende onverwachte vaststellingen gedaan. Deze worden hieronder besproken.

4.4.2.1 Temperatuur

Tussen de tyndallisatiestappen wordt de temperatuur ingesteld op 37°C. De temperatuur wordt voor 6 uur aangehouden, vervolgens schakelt de verwarming zichzelf uit. 13 uur (overnacht) na het uitschakelen van de verwarming bedraagt de temperatuur nog 34 °C. De volgende ochtend wordt de warmtewisselaar weer aangezet zodat een temperatuur van 37 °C nog 5 uur wordt aangehouden. In totaal wordt de bioreactor geïncubeerd voor 24 uur op een temperatuur tussen de 37 °C en 34 °C. Dit gebeurt twee keer bij het tyndalliseren. Op het tijdstip van enting bedraagt de temperatuur in de bioreactor 32°C. Nadat de reactor geënt is, wordt deze ingesteld op 37°C voor 2 uur, 26 uur later bedraagt de manteltemperatuur 32°C.

4.4.2.2 Voedingsbodem

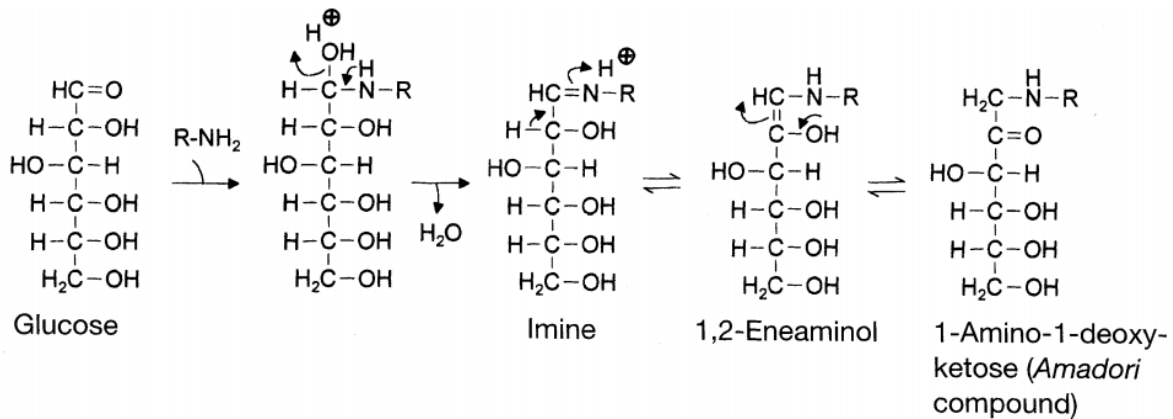
Vooraleer de reactor geënt wordt met de gekende bacteriestam wordt er een staalname uitgevoerd om de steriliteit van de reactor na te gaan. Bij de staalname na de incubatie wordt er een vertroebeling van de voedingsbodem vastgesteld. Dit kan wijzen op bacteriële groei, het labo moet dit bevestigen.



Figuur 19: Voedingsbodem na de tyndallysatieprocedure in de bioreactor

Opmerkelijk is dat het voedingsmedium donkerbruin verkleurd is (Figuur 19). Een mogelijke oorzaak van deze kleurverandering is de Maillard reactie. Dit is een niet-enzymatische bruinkleuringsreactie die al kan plaatsvinden bij lagere temperaturen, maar voornamelijk bij temperaturen rond de 140 tot 165 °C (Lewis & Bamforth, 2006). Een vrije aminogroep en een reducerend suiker²² zijn nodig om deze reactie te starten. Figuur 20 geeft het begin van deze Maillard reactie weer. In dit voorbeeld wordt glucose geoxideerd en de aminogroep gereduceerd.

²² Een reducerend suiker heeft een hemi-acetaalfunctie.



Figuur 20: Het begin van de Maillard reactie (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009)

De voedingsbodem bevat oorspronkelijk sucrose, een niet-reducerend suiker. De Maillard reactie kan niet optreden bij sucrose. Tijdens de tyndallisatieprocedure wordt sucrose mogelijk gehydrolyseerd tot glucose en fructose, welke wel reducerend zijn. Een vrije aminogroep is aanwezig in de voedingsbodem omdat dit voorkomt in gistextract, de Maillard reactie kan dus plaatsvinden.

Karamellisatie is uitgesloten omdat dit pas optreedt bij een temperatuur vanaf 110°C voor fructose en 160°C voor glucose en sucrose. Ook een enzymatische bruinkleuring, met het enzym “fenoloxidase”, wordt uitgesloten omdat dit enzym normaal niet aanwezig is in het voedingsmedium en omdat het, indien wel aanwezig, geïnactiveerd wordt door de eerste kookstap van het tyndallisatieproces (Belitz et al., 2009). Een andere hypothese van deze verkleuring is het feit dat er gewerkt wordt met regenwater. Dit bevat mogelijk algen die na de tyndallisatieprocedure afsterven en bruin/zwart verkleuren.

4.4.2.3 Beluchting

Een uur voor het enten van de reactor wordt de beluchting gestart. Deze zou de reactor gedurende de hele incubatieperiode moeten beluchten. Door schuimvorming tijdens de incubatieperiode werd de luchtuitlaat verstopt met als gevolg dat de beluchting ergens in deze periode is stilgevallen.

4.4.3 Resultaten

De resultaten van de steriliteitstest wijzen erop dat het genomen staal geïnfecteerd is met meerdere micro-organismen, op de petrischalen zijn verschillende soorten kolonies waarneembaar. De batch wordt gekookt en geëlimineerd omdat het niet uitgesloten is dat de reactorinhoud gecontamineerd is.

Vermoedelijk gebeurde de infectie tijdens de staalname of het enten. De handelingen waarbij steeds onder een vlam gewerkt moet worden blijken te omslachtig te zijn. Ook stond de bioreactor nog niet in een van de omgeving afgesloten reactorkamer. Het enten verliep moeizaam waardoor er was rechtstreeks contact tussen de omgeving en het entmateriaal mogelijk was.

Bij het volgende experiment zal de bioreactor verhuisd worden naar de reactorkamer. Bovendien worden het staalname- en entingssysteem aangepast zodat er niet meer met een gasbrander gewerkt wordt en contact met de omgeving vermeden wordt.

4.5 Bioreactor: experiment 2

In tegenstelling tot de eerste test wordt deze uitgevoerd met een volume van 100 liter voedingsbodem waardoor de verwarmings- en koelstappen sneller verlopen. Ook wordt aan de voedingsbodem 20 ml maïsolie toegevoegd om schuimvorming tegen te gaan. Voor het enten van de reactor wordt Methode 2, beschreven in alinea 3.5.5.3, gebruikt. Ook het nemen van stalen is veranderd t.o.v. de eerste test, Methode 2, beschreven in alinea 3.5.7.2 wordt hiervoor gebruikt.

4.5.1 Waarnemingen

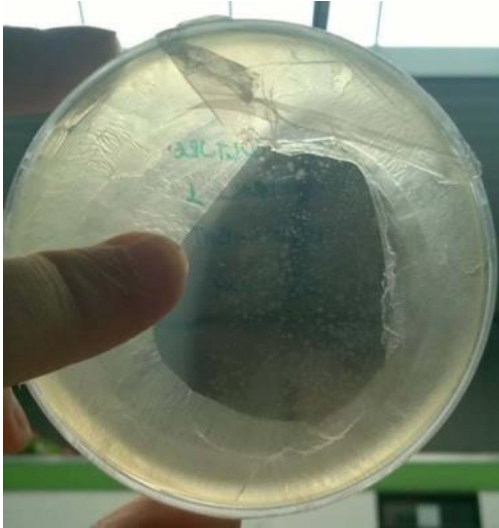
Net zoals de eerste test werd er een verkleuring van het medium waargenomen na de tyndallisatiestap. Bij het openen van de reactor is er nagenoeg geen schuim waargenomen en de luchttuitlaat is niet verstopt.

4.5.2 Resultaten

Er worden twee testen uitgevoerd: een steriliteitstest om na te gaan of de reactor steriel is na tyndallisatie, en een test op monocultuur na enting en incubatie. Beide testen worden uitgevoerd door de stalen over te brengen op een LB 0,5 % agar medium in petrischalen en vervolgens microscopisch te analyseren.

Net voor de reactor geënt wordt is er een eerste staalname uitgevoerd. De steriliteit van dit staal wordt in duplo nagegaan op petrischalen. Na een week incubatie op 30°C is er geen groei waargenomen in deze petrischalen. Er zijn dus geen bacteriën aanwezig en de bioreactor is steriel. Ook het labo bevestigt deze waarnemingen na een microscopische analyse. De sterilisatie is succesvol.

Nadat de reactor 24 uur geïncubeerd werd op 30°C met de *Chryseobacterium lathyri*, werd er een tweede staalname uitgevoerd. De groei van bacteriën in dit staal werd in duplo nagegaan op petrischalen. Op een van deze petrischalen werd duidelijk groei waargenomen na een week incubatie in de broedstoof (Figuur 21). De kolonies blijken identiek te zijn. Op de andere petrischaal was er geen groei waargenomen na een week incubatie. De *Chryseobacterium lathyri* stam die initieel geënt werd gedraagt zich wel vaker eigenaardig waardoor het ook geen verrassing is dat de groei nog niet ideaal is. Dr. P. Gkoresis heeft de petrischaal microscopisch onderzocht in het labo. Na onderzoek bleek het om één type bacteriële kolonies te gaan. De waargenomen kolonies stemmen qua uitzicht overeen met deze van de oorspronkelijk geënte *Chryseobacterium*.



Figuur 21: Groei op de LB 0,5 agar "Monocultuur"

5. Kostprijs

Omdat het proefopzet van dit werk een betaalbare bioreactor te ontwerpen is, wordt de totale kost ervan hieronder berekend en beschreven. De vaste kosten (ontwikkeling, materiaal, montage) en de variabele kosten (voedingsbodem, membraanfilters, elektriciteit, personeelskost) zijn in rekening gebracht. De kostprijs per batch bedraagt 655 euro (excl. BTW) zoals verder gespecificeerd.

5.1 Bioreactor

De ontwikkeling van de bioreactor nam 10 werkweken in beslag. Hiervan zijn twee werkweken door het personeel van PSMT gepresteerd en 8 werkweken door de thesisstudent. Enkel de kosten van PSMT personeel worden gecalculeerd. Aan een mandagprijs van 500 euro komt de ontwikkelingskost op 5000 euro. Het materiaal en de montagekosten die gebruikt zijn om een bioreactor te bouwen staan hieronder beschreven in Tabel 6. De totale kostprijs voor de bouw van de economisch verantwoorde bioreactor bedraagt ca. 3700 euro (exclusief BTW).

Tabel 6: Kostprijs Bioreactor

Materiaal	Merk/ Leverancier	prijs (€ excl. BTW)
Vergistingstank (158 l) met uitbreiding	Blichmann™ Fermentor™	2455
Verbindingslangen (6 m)	Houben-Nelis VOF	21
Warmtewisselaar	/	/
--> Koperen leidingen	Gamma	41
--> Brouwketel	Brewferm™	288
Warmwaterpomp	OEG®	41
Luchtcompressor	Hailea®	37
Verbindingsstukken, kranen en klemmen	Houben-Nelis VOF	41
Isolatiemateriaal (glaswol 15 cm dik)	Knauf Insulation	32
<i>Subtotaal</i>		<i>2958</i>
Montagekosten	Uitvoerder	prijs (€ excl. BTW)
1,5 werkdag	PSMT bvba	750
<i>Subtotaal</i>		<i>750</i>
Totaal		3708

De totale kost voor de eerste reactor bedraagt 8700 euro excl. BTW. Afschrijving hiervan over 100 batches komt neer op 87 euro per batch.

5.2 Verbruiksgoederen

De voedingsbodem bestaat uit grondstoffen die gemakkelijk, en door iedereen op de markt te verkrijgen zijn. Verder worden ethanol en twee membraanfilters per batch gebruikt. De prijzen en de grondstoffen worden beschreven in Tabel 7. De kostprijs van 250 liter voedingsbodem bedraagt 24,05 euro (incl. BTW).

Tabel 7: Kostprijs verbruiksgoederen per batch van 250 liter

Grondstof	Merk/Leverancier	Prijs (€ excl. BTW)	Aantal	Prijs per batch (€ excl. BTW)
gistextract (200 gram)	Marmite Yeast extract	2,47	1 kg	12,36
Kristalsuiker, sucrose (1kg)	Van Gilse®	0,57	2,5 kg	1,43
Vloeibare kunstmest (1L)	Pelckmans	2,44	2,5 liter	6,10
Regenwater	/	0,00	250 liter	0,00
Membraanfilter	Millex-FG Filterunit®	9,70	2	19,40
Ethanol 99% (per liter)	Werken Met Merken	6,00	1 liter	6,00
Totaal				45,28

5.3 Elektriciteit

Er is elektriciteit nodig om verschillende apparaten te laten werken en dit is niet gratis. De elektriciteitskost is samengevat in Tabel 8. De prijs wordt steeds berekend aan een tarief van 0,15 euro/kWh (excl. BTW). Het verwarmen van de voedingsbodem is duidelijk de grootste kost. De totale energiekost van één batch van 250 liter bedraagt 23,03 euro (excl. BTW).

Tabel 8: Energiekost per batch van 250 liter

Apparaat	Vermogen (Watt)	Gemiddelde gebruiksduur per batch (uur)	Prijs per Batch van 250 liter (€ excl. BTW)
Pomp	39	152	0,89
Compressor	50	72	0,54
Brouwketel	1800	80	21,60
Totaal			23,03

5.4 Werkuren procesvoering

De procesvoering omhelst de voorbereiding, het bereiden van de voedingsbodem, de tyndallisatie, het afvullen van de recipiënten voor infiltratie en het reinigen van de reactor. Deze handelingen nemen 1 mandag in beslag (kostprijs 500 euro).

6. Discussie

De kostprijs van de ontworpen bioreactor bedraagt ca. 8700 euro (excl. BTW). In “Bijlage 7: Brochure en offerte van Eppendorf NB™ BioFlo® Pro 240 Liter” wordt er een brochure van een professionele bioreactor gegeven. De offerte van de reactor met een totaalvolume van 240 liter werd opgevraagd. Dit volume komt overeen met dat van de zelf gebouwde reactor. De vraagprijs van deze reactor bedraagt ca. 220 000 euro (excl. BTW), dit is zo’n 25 keer de kostprijs van de ontworpen reactor. De professionele reactor heeft verschillende functies en opties die niet aanwezig zijn op de ontworpen bioreactor, deze functies zijn niet noodzakelijk voor de toepassing van biologische bodemsaneringen. De enige eis die gesteld wordt bij de bioreactor voor biologische saneringen is dat er een monocultuur aan bacteriën gekweekt kan worden.

De professionele bioreactor wordt redelijk snel thermisch gesteriliseerd door een automatisch sterilisatieprogramma (SIP²³), de temperatuur kan 1°C per minuut stijgen waardoor de reactor in enkele uren gesteriliseerd is. De zelf ontworpen bioreactor kan slechts 0,1°C per minuut stijgen (bij 250 liter voedingsbodem) en kan niet geautoclaveerd of gestoomd worden, maar wordt getyndalliseerd. Hierdoor duurt het een kleine week (129 uur) om deze reactor, inclusief voedingsbodem, te steriliseren. Dit is geen nadeel want de productie van één batch per week is voldoende. Indien er in de toekomst meerdere batches nodig zijn, kan er een tweede bioreactor gebouwd worden. De kost van een tweede reactor weegt nog steeds niet op tegen die van een professionele bioreactor. De professionele bioreactor heeft een monsterklep die na iedere staalname gesteriliseerd wordt waardoor er verschillende stalen genomen kunnen worden. Bij de zelf gebouwde bioreactor kunnen er met de opstelling zoals die nu is slechts twee stalen genomen worden, één om de steriliteit na te gaan en één om de controle op monocultuur uit te voeren. Verschillende parameters, zoals de pH, de temperatuur en de druk, worden continu gemeten en bijgestuurd in de professionele bioreactor. Omdat er geen mogelijkheid is om de pH van de voedingsbodem te meten tijdens de incubatie is het niet mogelijk om deze bij te sturen. Ook de druk kan niet bijgestuurd worden omdat deze te allen tijde gelijk zal zijn aan de atmosferische druk. De enige parameter die semi automatisch gestuurd wordt in de economisch verantwoorde bioreactor is de temperatuur, voor het opwarmen en incuberen kan de temperatuur en tijd ingesteld worden in de brouwketel (warmtewisselaar). In de brouwketel wordt de temperatuur continu opgevolgd m.b.v. een thermometer. De belangrijkste verschillen tussen de twee bioreactoren zijn samengevat in Tabel 9.

²³ “*Steaming in place*” is een sterilisatiemethode die gebruik maakt van stoom.

Tabel 9: De belangrijkste verschillen tussen de professionele en de zelf ontworpen bioreactor

Eppendorf NB™ BioFlo® Pro 240 Liter	Ontworpen bioreactor
SIP sterilisatie (tijdsduur: enkele uren)	Tyndallisatie (tijdsduur: een kleine week)
Verskillende monsternames	Maximum twee monsternames
Opvolgen en bijsturen van de pH	Geen pH controle
Opvolgen en bijsturen van de druk	Altijd atmosferische druk
Automatische temperatuurscontrole met een opwarmcapaciteit van 1°C/min	Semi automatische temperatuurscontrole met een opwarmcapaciteit van 0,1°C/min
Kweken van een zuivere monocultuur	Kweken van een onzuivere ²⁴ monocultuur
Ca. 220 000 euro	Ca. 8700 euro

De professionele reactor is eerder ontworpen voor farmaceutische toepassingen en toepassingen in de voedingsindustrie, waar een nauwkeurige opvolging van verschillende parameters noodzakelijk is. Dit is niet te vergelijken met de toepassing van biologische bodemsaneringen. Onzuiverheden zoals dode bacteriecellen of algen moeten niet verwijderd worden uit de batch voor infiltratie van een verontreinigde bodem. Wanneer een batch klaar is voor infiltratie moet deze niet steriel behandeld worden. Vooraleer de bacteriën geïnfiltrated worden op het terrein, worden ze verdund met niet gesteriliseerd regenwater (1 eenheid voedingsbodem met 4 eenheden regenwater). Dit verdunnen gebeurt om de bacteriën te stimuleren om over te schakelen op een andere voedingsbron nl. de mazout in de bodem. Indien de gewenste bacterie om een bepaalde reden niet gegroeid is na incubatie, en de batch wordt alsnog geïnfiltrated in de bodem, is dit geen ramp. De batch bevat geen schadelijke stoffen (enkel kunstmest, suiker en gistextract). Het grootste nadeel van de zelf ontworpen bioreactor is dat er pas met zekerheid geweten is dat er een monocultuur gekweekt werd na infiltratie in de verontreinigde bodem omdat de stalen niet ter plekke geanalyseerd kunnen worden. Het groeien van ongewenste micro-organismen wordt tegengegaan door vlak nadat de bioreactor gesteriliseerd is deze te enten met een zeer groot aantal gewenste bacteriën. De gewenste bacteriën worden in het labo opgekweekt in dezelfde voedingsbodem die aanwezig is en de bioreactor dus kunnen meteen verder groeien wanneer ze overgebracht worden in de reactor.

Het uitgeven van de bacteriekweek aan een gespecialiseerde firma kost 5000 à 6000 euro (excl. BTW) per batch. Enkel het opkweken is bij deze prijs inbegrepen, het voorafgaande labowerk (zoals selectie en isolatie van de bacterie) moet nog steeds zelf uitgevoerd worden. Een batchvolume van 250 liter is voldoende om biologische saneringen uit te voeren (per infiltratie). De totale kostprijs per batch in de zelf ontworpen bioreactor bedraagt ca. 655 euro. Dit is 8 à 9 maal goedkoper dan de bacteriën bij een gespecialiseerde firma te laten kweken. PSMT bvba werkt nauw samen met het labo voor de selectie en isolatie van plaats specifieke bacteriën. Deze samenwerking maakt het mogelijk om de geïsoleerde bacteriën in het labo op te kweken in aangepaste flessen die speciaal ontworpen zijn om de economisch verantwoorde bioreactor te enten.

²⁴ De “onzuivere monocultuur” slaat op het feit dat er grote hoeveelheden dode micro-organismen aanwezig kunnen zijn.

7. Besluit

Bacteriegeassisteerde fyto-remediatie is een biologische saneringstechniek die goede resultaten oplevert. Deze methode vormt het sluitstuk van de opeenvolging van saneringstechnieken die door PSMT gebruikt worden voor de behandeling van mazoutverontreinigingen, zonder dat er grote ingrepen op het terrein nodig zijn. Indien er bacteriën opgekweekt moeten worden om deze techniek toe te passen zijn er enkel dure opties beschikbaar op de markt. Het is mogelijk om een eenvoudige economisch verantwoorde bioreactor van ca. 250 liter te bouwen uitgaande van een vergistingstank en een brouwketel. De prijs van de bioreactor bedraagt ca. 8700 euro, dit is slechts een fractie van het bedrag wat er gevraagd wordt voor commerciële bioreactoren met eenzelfde volume.

De bioreactor wordt, samen met de voedingsbodem gesteriliseerd door de tyndallisatietechniek toe te passen. Het succes van deze techniek wordt bevestigd op laboschaal en in de bioreactor zelf. Ook is het mogelijk de reactor steriel te enten en steriele staalnames uit te voeren. De stalen die voor analyse overgeënt worden op petrischalen in een standaardvoedingsbodem, zien er positief uit na incubatie. Het staal dat vlak na de sterilisatieprocedure genomen wordt, vertoont geen groei en het staal dat genomen wordt nadat de bioreactor geënt en geïncubeerd werd (met de gekende *Chryseobacterium lathyri*), vertoont groei. Dit wil zeggen dat het mogelijk is de bioreactor te steriliseren en ook dat er na de sterilisatie groeimogelijkheden zijn in de reactor. De gegroeide kolonies hebben visueel hetzelfde uitzicht en dit wordt microscopisch ook bevestigd door het labo. Vermoedelijk gaat het om de *Chryseobacterium* stam die oorspronkelijk geënt werd en is de monocultuur geslaagd. Er kan besloten worden dat de sterilisatie van de bioreactor succesvol is, maar er moet verder onderzocht worden of het gebruikte medium in voldoende mate geschikt is om de geënte bacteriestam te laten groeien naar wens.

Bij een economisch verantwoorde bioreactor hoort een budgetvriendelijke voedingsbodem. Deze bestaat uit vloeibare kunstmest, kristalsuiker en gistextract. Er wordt een C:N:P verhouding van 100:10:1 gebruikt in het medium. De tot nu toe geteste bacteriën groeiden allemaal in het voedingsmedium.

De reactor is gebruiksklaar, maar om een beter overzicht te krijgen over de groei van de bacteriën en de geschikte incubatieperiodes dient deze reactor echter nog verder getest en geoptimaliseerd te worden. Bijkomende proeven, zoals het maken van een verdunningsreeks en uitplaten op petrischalen, zijn nodig om de exacte opbrengst van bacteriën na te gaan. Ook kleine aanpassingen aan de reactoropstelling, bijvoorbeeld het toevoegen van een extra verwarmingselement in de brouwketel, kan het opwarmingsproces versnellen.

Literatuurlijst

- Alguacil, M. M., & Caravaca, F. (2004). Changes in soil microbial activity following conservation tillage practices in a Sorghum field under subtropical conditions. In *International Soil Conservation Organisation Conference* (Vol. 8, pp. 8–11). Retrieved from <http://tucson.ars.ag.gov/isco/isco13/PAPERS R-Z/ROLDAN.pdf>
- Arslan, M., Imran, A., Khan, Q. M., & Afzal, M. (2017). Plant-bacteria partnerships for the remediation of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 4322–4336. <http://doi.org/10.1007/s11356-015-4935-3>
- Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition*. <http://doi.org/10.1201/EBK1439804063>
- B, S. K., & Cahiers. (2007). *Natuurlijke afbraak: het is niet niks!*
- Bakker et al. (2007). Olie in de bodem, (182), 90.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry. Food Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Berns, H., Gavriljuk, V., & Riedner, S. (2013). *High Interstitial Stainless Austenitic Steels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-33701-7>
- Bidoia, E. D., Montagnoli, R. N., & Lopes, P. R. M. (2012). Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique : a case study. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 3(290–295), 1277–1288.
- Bodemdecreet en Vlarebo - OVAM. (n.d.). Retrieved April 19, 2017, from <http://www.ovam.be/bodemdecreet-en-vlarebo>
- Brochier-Armanet, C., & Moreira, D. (2015). *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications. Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. <http://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2>
- Bull, K. (2008). Cabin air filtration: Helping to protect occupants from infectious diseases. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 6(3), 142–144. <http://doi.org/10.1016/j.tmaid.2007.08.004>
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33–41. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- Cho, H. Y., Yousef, A. E., & Sastry, S. K. (1999). Kinetics of inactivation of Bacillus subtilis spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(3), 368–372. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990205\)62:3<368::AID-BIT14>3.0.CO;2-0](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990205)62:3<368::AID-BIT14>3.0.CO;2-0)
- Cho, S. H., Lee, K. S., Shin, D. S., Han, J. H., Park, K. S., Lee, C. H., ... Kim, S. B. (2010). Four new species of Chryseobacterium from the rhizosphere of coastal sand dune plants, Chryseobacterium elymi sp. nov., Chryseobacterium hagamense sp. nov., Chryseobacterium lathyri sp. nov. and Chryseobacterium rhizosphaerae sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(3), 122–127. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.12.004>
- EMIS Navigator. (n.d.). Retrieved March 17, 2017, from <https://navigator.emis.vito.be/mijn-navigator?woid=23676>
- EMIS Navigator. (2012). Retrieved April 19, 2017, from <https://navigator.emis.vito.be/mijn->

navigator?wold=1411

- Frank, L. C. (1930). An Effective and Practical Definition of Pasteurization. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, 20(10), 1105–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18013113>
- Gkorezis, P. (2014). The role of plant-associated bacteria in the remediation of soils and groundwater contaminated with petroleum hydrocarbons.
- Gregory, S. J., N Anderson, C. W., Camps-Arbestain, M., Biggs, P. J., D Ganley, A. R., O, J. M., & McManus, M. T. (2015). Biochar in Co-Contaminated Soil Manipulates Arsenic Solubility and Microbiological Community Structure, and Promotes Organochlorine Degradation. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0125393>
- ICRC, I. commision red cross. (2014). STERILIZATION GUIDELINES. Retrieved from <https://www.flinnsci.com/globalassets/flinn-scientific/all-free-pdfs/dc10375.pdf>
- Kennen, K., & Kirkwood, N. (2015). *Phyto: Principles and Resources for Site Remediation and Landscape Design*. Retrieved from https://books.google.com/books?id=rL_JCAAQBAJ&pgis=1
- Kim, H., Kim, H., Bang, J., Kim, Y., Beuchat, L. R., & Ryu, J.-H. (2012). Reduction of Bacillus cereus spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization processes with and without carbon dioxide injection. *Letters in Applied Microbiology*, 55(3), 218–223. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03278.x>
- Korves, T. M., Piceno, Y. M., Tom, L. M., DeSantis, T. Z., Jones, B. W., Andersen, G. L., & Hwang, G. M. (2013). Bacterial communities in commercial aircraft high-efficiency particulate air (HEPA) filters assessed by PhyloChip analysis. *Indoor Air*, 23(1), 50–61. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2012.00787.x>
- Kowalski, W. (2009a). *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-01999-9>
- Kowalski, W. (2009b). *Ultraviolet germicidal irradiation handbook: UVGI for air and surface disinfection. Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for Air and Surface Disinfection*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-01999-9>
- LAWRENCE, N. L., & HALVORSON, H. O. (1954). Studies on the spores of aerobic bacteria. IV. A heat resistant catalase from spores of Bacillus terminalis. *Journal of Bacteriology*, 68(3), 334–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13201531>
- Le Lay, F. (2013). Study on the lifetime of EPDM seals in nuclear-powered vessels. *Radiation Physics and Chemistry*, 84, 210–217. <http://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.05.008>
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical reaction engineering. Ind. Eng. Chem. Res* (Vol. 38). <http://doi.org/10.1021/ie990488g>
- Lewis, M. J., & Bamforth, C. W. (2006). Essays in brewing Science, 39–40. <http://doi.org/10.1007/0-387-33011-9>
- Manoharachary, C., & Mukerji, K. G. (2006). Rhizosphere Biology - an Overview. *Soil Biology*, 7, 1–6. http://doi.org/10.1007/3-540-29420-1_1
- Michels, H. T., & Anderson, D. G. (2008). Antimicrobial regulatory efficacy testing of solid copper alloy surfaces in the USA. *Metal Ions in Biology and Medicine*, 10, 185–190. Retrieved from

http://www.antimicrobialcopper.org/sites/default/files/upload/Media-library/Files/PDFs/UK/Scientific_literature/mibm-epa-reg-copper-michels-2008.pdf

- Nanekar, S., Dhote, M., Kashyap, S., Singh, S. K., & Juwarkar, A. A. (2015). Microbe-assisted phytoremediation of oil sludge and role of amendments: a mesocosm study. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(1), 193–202. <http://doi.org/10.1007/s13762-013-0400-3>
- Newsholme, A. (1935). Pasteurization of Milk. *Nature*, 136(3427), 1–3. <http://doi.org/10.5038/2326-3652.2.2.1>
- OVAM. (2005). In-situ Bioremediatie van petroleumkoolwaterstoffen Code van Goede Praktijk Documentbeschrijving, 125. Retrieved from https://www.ovam.be/sites/default/files/atoms/files/In-situ_bioremediatie_van_petroleumkoolwaterstoffen_-_Code_van_goede_praktijk.pdf
- Padia, J., & Huntington, P. (2006). Gas filtration: sterile micro-filtration for bioreactors. *Filtration & Separation*, 43(4), 28–31. [http://doi.org/10.1016/S0015-1882\(06\)70866-7](http://doi.org/10.1016/S0015-1882(06)70866-7)
- Physical Control of Microorganisms: Boiling Water. (2009). Retrieved April 6, 2017, from <http://microbiologyon-line.blogspot.be/2009/08/physical-control-of-microorganisms.html>
- Pontel, L. B., Checa, S. K., & Soncini, F. C. (2015). Bacterial copper resistance and virulence. In *Bacteria-Metal Interactions* (pp. 1–20). Cham: Springer International Publishing. http://doi.org/10.1007/978-3-319-18570-5_1
- PTFE: Algemene informatie. (n.d.). Retrieved March 17, 2017, from http://www.hpproducts.nl/nl/materialen/fluorkunststoffen/ptfe-algemene-informatie?gclid=CjwKEAjwkq7GBRDun9iu2JjyhmsSJADHCD_Hq-Fn6XUK2Oie_TlY7yDwuRXSjm6OAltzZM7fqC25UhoC32nw_wcB
- Reiners, W. a. (1986). Complementary Models for Ecosystems. *The American Naturalist*, 127(1), 59. <http://doi.org/10.1086/284467>
- Saimmai, A., Kaewrueng, J., & Maneerat, S. (2012). Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1757–1767. <http://doi.org/10.1007/s13213-012-0434-7>
- Saxena, S. (2015). *Applied microbiology*. Applied Microbiology. New Delhi: Springer India. <http://doi.org/10.1007/978-81-322-2259-0>
- Schulz, H. N., & Jørgensen, B. B. (2001). Big Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 105–137. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.105>
- Setlow, B., Loshon, C. A., Genest, P. C., Cowan, A. E., Setlow, C., & Setlow, P. (2002). Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 362–375. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01540.x>
- Sharma, J. K., & Juwarkar, A. A. (2015). Phytoremediation: General account and its application. In *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology* (pp. 673–684). New Delhi: Springer India. http://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_34
- Smelt, J. P. P. M., Hellemons, J. C., Wouters, P. C., & Van Gerwen, S. J. C. (2002). Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. *International Journal of Food Microbiology*. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00242-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00242-8)

- Sterilization Of Food In Retort Pouches.* (2006). Boston, MA: Springer US. <http://doi.org/10.1007/0-387-31129-7>
- Thermal Conductivity of common Materials and Gases. (n.d.). Retrieved March 16, 2017, from http://www.engineeringtoolbox.com/thermal-conductivity-d_429.html
- Thiel, T. (1999). Sterilization of Broth Media by Tyndallization. *Science*, 1999–1999. Retrieved from <http://www.umsl.edu/~microbes/tyndallization.pdf>
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*. Boston, MA: Springer US. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6>
- VLAREBO gewijzigd sinds 1 februari 2016 - OVAM. (n.d.). Retrieved March 17, 2017, from <http://ovam.be/vlarebo-gewijzigd-sinds-1-februari-2016>
- WHO. (2005). *Preventing Travellers' Diarrhoea: How to Make Drinking Water Safe*. Retrieved from http://www.who.int/water_sanitation_health/hygiene/envsan/sdwtravel.pdf?ua=1
- WHO | Botulism. (2017). WHO. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/en/>
- Williams, J. A. (2002). John A. Williams, PhD, P.E., (March), 34–41.

Bijlagen

Bijlage 1: Opstartprocedure bioreactor met tyndallisatie

1. Zet al de kranen open
2. Giet gedestilleerde ethanol (99%) door de entleiding tot deze in de reactor terecht komt (± 20 ml)
3. Sluit de onderste kraan van de luchttoevoer
4. Vul de luchtleiding verder met gedestilleerde ethanol (99 %) tot boven de membraanfilter
 - a. Zorg ervoor dat de luchtleidingen (inclusief de entleiding en -kraan) volledig gevuld zijn met gedestilleerde ethanol (99 %)
5. Sluit de entkraan
6. Vul de staalnamebuis met ± 60 ml gedestilleerde ethanol (99 %) en sluit de kranen
7. Vul de bioreactor met ca. 250 liter water (de kraan naar de pomp staat open)
8. Sluit de warmwaterpomp aan op het net en zet deze op de laagste stand
9. Inspecteer de reactor op lekken
 - a. Indien er een lek wordt gedetecteerd wordt dit gedicht
10. Vul de brouwketel met water zodat het koperwerk volledig is ondergedompeld
11. Stel de brouwketel (met spiraalvormige koperen buis) in op 100 °C voor 120 minuten
12. Plaats het isolerend deksel op de brouwketel
13. Volg de temperatuur op (1 maal per uur) door een thermometer bovenaan de bioreactor in het water te steken
14. Voeg de geconcentreerde voedingsbodem toe wanneer het water in de tank is opgewarmd tot minstens 50°C (na ± 4 uur opwarmen)
 - a. Deze bodem wordt vooraf bereid (7 à 10 liter)
 - b. Giet of pomp de geconcentreerde voedingsbodem in de reactor
15. Sluit de reactor af met een het deksel waarop de luchttuitlaat is gemonteerd
16. De bioreactor zal automatisch verder opwarmen
 - a. Het volledige opwarmproces duurt ± 25 uur (bij ca. 250 liter)
 - b. Twee uur na het bereiken van de ingestelde temperatuur schakelt de verwarming zich uit
17. Start de beluchting
 - a. Sluit de grote compressor aan op de kraan boven de membraanfilterfilter
 - b. Zet de compressor aan en zorg ervoor dat meteen hierna al de luchtleidingen open staan
 - c. Wanneer de opborrelende luchtbellens te horen zijn, wordt de onderste kraan van de luchtleiding afgesloten en de grote compressor onmiddellijk uitgeschakeld
 - d. De kleine compressor wordt aangesloten en de onderste kraan van de luchtleiding wordt geopend
18. Start de koeling
 - a. Neem het isolerende deksel van de brouwketel
 - b. Zet de onderste kraan aan de brouwketel open
 - c. Voeg 30 seconden koelwater toe in de slang naar de afloop
 - d. Laat vervolgens het koelwater in de brouwketel lopen
 - e. Stel het debiet zo in dat er minder water bijkomt dan dat er wegloopt
19. Meet met een thermometer de temperatuur aan de mantel van de reactor (tussen mantel en isolatie)

20. Stop met koelen wanneer de temperatuur 36 °C bedraagt
21. Stel de brouwketel in op 37°C voor 120 minuten
 - a. Houd de temperatuur tussen 30 en 37°C aan voor minstens 24 uur
 - b. Indien nodig kan de brouwketel opnieuw ingesteld worden
 - c. Na het instellen van de brouwketel blijft deze minstens 12 uur boven de 34°C.
22. Stel de brouwketel opnieuw in op 100°C voor 120 minuten
 - a. De opwarmprocedure duurt nu ± 20 uur
 - b. Twee uur na het bereiken van de ingestelde temperatuur schakelt de verwarming zich uit
23. Herhaal de stappen van 18 t.e.m. 22 nog een maal. Net voor elke opwarming tot 100 °C (stap 22) wordt de kraan van de beluchtingsleiding dichtgedraaid en wordt de luchtcompressor uitgeschakeld.
24. Koel de reactor tot 30°C en houd deze temperatuur aan (met de brouwketel)
25. Voer een steriele staalname uit (zie “staalnameprocedure”)
26. Ent de bioreactor volgens methode 2
27. Incubeer de reactor op 37°C door dit in te stellen in de brouwketel voor een gewenste periode
28. Voer een steriele staalname uit (zie “staalnameprocedure”)
29. Oogst de bacteriën (dit moet niet steriel gebeuren)
 - a. Houd een vat (of meerdere vaten) klaar aan de staalnamekraan
 - b. Open beide kranen en vul het vat/de vaten

Bijlage 2: Entingsprocedure: methode 1 (met gasbrander, één kraan)

Opmerking: deze methode werd getest doch niet weerhouden

1. Ga met de vlam van een gasbrander door de entkraan van de bioreactor
2. Doe hetzelfde met de opening van de entfles
3. Bevestig de fles aan de kraan
4. Open de kraan en giet het medium van de fles en de reactor
5. Sluit de kraan en ontkoppel de fles

Bijlage 3: Entingsprocedure: methode 2 (zonder gasbrander, drie kranen)

1. Sluit de entfles (met gesloten kraan) aan op het entsysteem.
2. isoleer de fles met toebehorende isolatie of stel de temperatuur van de reactorkamer in op de gewenste temperatuur
3. Vul het leidingsysteem met gedenatureerde ethanol (99%)
4. Incubeer 24 uur
5. Open de binnenste kraan en laat de ethanol in de reactor stromen
6. Wacht vervolgens minimum 1 minuut
7. Open de kraan van de entfles en giet de inhoud in de reactor
8. Sluit de kranen van het entsysteem

Bijlage 4: Staalnameprocedure: methode 1 (gasbrander)

Opmerking: deze methode werd getest doch niet weerhouden

1. Draai de binnenste kraan open
2. Draai de buitenste kraan open
 - a. Laat de aanwezige ethanol uit de leiding lopen (en vang het op in een beker)
 - b. Draai de buitenste kraan dicht
3. Zorg ervoor dat de handelingen bij punten 5 t.e.m. 7 onder continu afvlammen (blauwe vlam) worden uitgevoerd
4. Open een gesteriliseerde borosilicaatglazen fles onder continu afvlammen
5. Open de buitenste kraan
6. Vul de fles voor ongeveer 2/3 van zijn volume en sluit de kraan
7. Sluit de binnenste kraan vlak nadat de buitenste werd dichtgedraaid
8. Open de buitenste kraan en laat het aanwezige voedingsmedium er uitvloeien
9. Vul de leiding met 99 % gedenatureerde ethanol en sluit de kraan
10. Wacht minstens 24 uur voor de volgende steriele staalname

Bijlage 5: Staalnameprocedure: methode 2 (doorstroomslang)

1. Er zijn driekranen: de middelste is open en de buitenste twee zijn dicht
2. Draai de binnenste kraan open
3. Draai de buitenste kraan open
 - a. Laat de aanwezige ethanol wegvloeien in een afvalbeker
 - b. Laat ook een 2-tal seconden voedingsbodem wegvloeien
4. Draai de buitenste kraan dicht
5. Draai de binnenste kraan dicht
6. Draai ten slotte de middelste kraan dicht
7. Nu kan de volledige staalnamebuis ontkoppeld worden

Bijlage 6: Isolatieprocedure mazoutmetaboliserende micro-organismen (dr. Panagiotis Gkorezis)

Isolation process

Bulk soil is collected and stored in sterile Falcon tubes (50 mL). 10 sets of samples were collected to assess the microbial community with culture-dependent methods. For the isolation process soil samples were diluted up to 10^{-5} in 10 mM $MgSO_4$ solution and plated on 1/5 strength LB solid medium in order to isolate soil bacteria.

Estimation of degradation capacity of diesel by single isolates

Estimation of the single isolates capability to degrade diesel was based on a modified protocol of the 2,6-dichlorophenolindophenol indicator assay (referred as from this point as DCPIP) performed by (Kubota et al. 2008). Briefly, all the isolated strains were pre-cultured in 5 ml of 869 broth at 30° C and 160 rpm until the optical density at 660 nm became > 1.0 . After centrifugation at 4,000g for 5 min and washing 3 times with 0.9% saline buffer (9 g of NaCl in one liter of distilled water), the cell density was adjusted to 1.0 according to the optical density at 660 nm. After sterilization, 750 μ l of Fe-free W medium (per liter: 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 14.3204 g Na_2HPO_4 , 5.4436 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl, 0.2465 g $MgSO_4$, 2.78 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 14.7 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.01 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0.2 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.4 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ and 1.49 mg $MnSO_4 \cdot 5H_2O$), 50 μ l of $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ solution (150μ g ml^{-1}) and 50 μ l of 2,6- DCPIP solution (100μ g ml^{-1}) were added to a 1.5-ml sterile microtube.

Subsequently, 80 μ l of cell suspension and 5 μ l diesel sterilized by filtration through 0.45 unit membranes (MILLIPORE Corp. MA, USA) were added to the medium, and the cells were cultivated at 30° C and 120 rpm for 48 h. The assay was performed in triplicates and the color of the medium was observed visually with four controls; the first control contained no diesel, the second no cells, the third represented the positive control and contained cells of a known diesel degrader (*Pseudomonas aeruginosa* WatG strain), while the fourth one consisted of heat killed cells of that strain. The principle behind this method is that by incorporating an electron acceptor such as DCPIP, it is possible to ascertain the ability of a microorganism to utilize a hydrocarbon substrate by simply observing the color change, in this case, from blue (oxidized) to colorless (reduced). The principle behind this method is that by incorporating an electron acceptor such as DCPIP, it is possible to ascertain the ability of a microorganism to utilize a hydrocarbon substrate by simply observing the color change, in this case, from blue (oxidized) to colorless (reduced). Therefore, the reaction was followed as written before for 48 h and examined after 6, 12, 24, 36 and 48 h and every single isolate was evaluated as positive for microbial diesel degrading ability if colorless (degraded) and negative if remained blue (not degraded).

(Gkorezis, 2014)



Scale-Up Seamlessly

New Brunswick™ BioFlo® Pro pilot to production SIP fermentation systems

Design, Delivery and Dependability

The Eppendorf line of New Brunswick BioFlo® Pro fermentors provides a unique solution to the need for flexibility in pilot through production-scale bioprocessing. The advanced, modular fermentation systems feature off-the-shelf components to enable rapid delivery and dependability.

These systems come with an industry-standard Allen Bradley® Programmable-Logic Controller (PLC) for reliable operation. New Brunswick BioFlo Pro fermentors incorporate robust devices to minimize maintenance and downtime. Eppendorf also offers training and a wide range of services to minimize start-up time and to provide ongoing support.



Smart design

- > Open piping frame eases filter and valve access during operation and routine maintenance
- > Flush-mounted vessel connections limit contamination risk
- > Easy customization to suit a wide variety of specifications and budgets
- > Small footprint
- > Field-upgrade capability
- > Fully validatable, following V-Model guides for URS, FRS, DDS, IQ, OQ and trace matrix¹

Premium performance

- > CE-certified and manufactured to cGMP and GaMP guidelines²
- > 3 : 1 vessel ratio optimized for fermentation; pressure vessels designed and built to ASME standards
- > NEMA 4, IP66 rated control cabinet with user-friendly touchscreen interface
- > Industry-standard Allen Bradley® PLC system for optimized process control and easy integration with any production environment
- > Optional transmitters measure and display pH/DO/Redox and/or weight
- > Optional dual transmitters offer redundant pH/DO probes

¹User Requirement Specification, Functional Requirement Specification, Detailed Design Specification, Installation Qualification, Operational Qualification

²cGMP: Current Good Manufacturing Practice; GaMP: Good Automated Manufacturing Practice



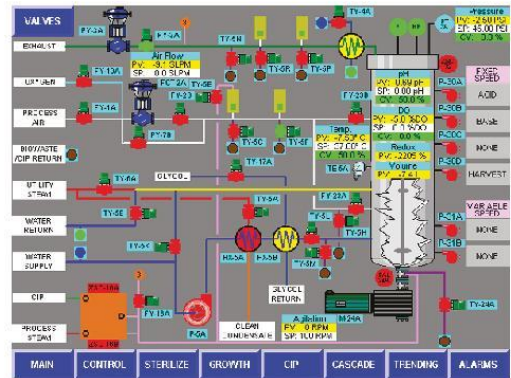
Headplate ports accommodate septum, sprayballs, level probes, level and pressure transmitters, vessel light and more; spring-assisted manway on 60 - 400 L models; motorized headlift on 800 - 2400 L vessels



Resterilizable SIP, CIP and addition valves enable sterile transfer of liquids into the vessel for pH and foam control, or nutrient addition



Flush mount, sanitary NA-Connect® quick connections in hard-to-clean locations eliminate dead legs; 25 mm safety ports on lower side wall enable use of redundant probes or retractable housings



Allen Bradley PLC system lets you easily integrate data from auxiliary systems, such as CIP skids, for total system control

Efficient scale-up

- > Validation packages with detailed documentation shorten start-up timelines
- > Preventive maintenance and spare parts kits simplify system upkeep
- > Worldwide network of factory-trained service engineers provide after-sales support

Nothing comes close

The New Brunswick BioFlo Pro offers a unique solution for pilot- and production-scale processing, combining dependable operation, system flexibility, increased throughput and quick delivery, all at an affordable price.

New Brunswick™ BioFlo® Pro vessel specifications*

Vessel	60 L	120 L	240 L	400 L	800 L	1200 L	2400 L
Working volume	32 - 60 L	45 - 120 L	68 - 240 L	103 - 400 L	250 - 800 L	375 - 1200 L	750 - 2400 L
Total volume	75 L	150 L	300 L	500 L	1000 L	1500 L	3000 L
Air flowrate (SLPM)	2 - 90	4 - 180	7 - 360	12 - 600	24 - 1200	36 - 1800	72 - 3600
Construction	Aspect ratio: 3 : 1; Code ratings: ASME/CE; Material: 316L stainless steel; Vessel access: spring-assisted manway, motorized headlift for 800 L to 2400 L systems; Finish: 20 Ra, 0.5 micrometer internal/external (optional electropolished interior)						
Agitation							
Range	50 - 500 rpm	50 - 500 rpm	45 - 450 rpm	40 - 400 rpm	30 - 300 rpm	25 - 250 rpm	20 - 200 rpm
AC motor size	1.12 kW (1.5 hp)	1.12 kW (1.5 hp)	2.24 kW (3 hp)	3.73 kW (5 hp)	7.46 kW (10 hp)	14.91 kW (20 hp)	18.64 kW (25 hp)
Drive	Bottom drive, double-mechanical seal						
Impellers	3 Rushton-like						
Baffles	(4) 316L stainless-steel <i>[removable in 60 - 1200 L systems; fixed in 2400 L systems]</i>						
Ports							
Headplate tri-clamps	(3) 1.5 in <i>[DP transmitter, rupture disk, pressure transmitter]</i> (4) 2 in <i>[sprayballs, exhaust condenser, level probes, septum, vessel light]</i>	(3) 1.5 in <i>[DP transmitter, rupture disk, pressure transmitter]</i> (4) 2 in <i>[sprayballs, exhaust condenser, level probes, septum]</i> (1) 3 in <i>[exhaust condenser]</i>	(3) 1.5 in <i>[DP transmitter, rupture disk, pressure transmitter]</i> (1) 2 in <i>[vessel light]</i> (3) 3 in <i>[sprayballs, exhaust condenser, level probes, septum]</i>		(3) 1.5 in <i>[rupture disk, pressure transmitter]</i> (2) 2 in <i>[vessel light]</i> (3) 4 in <i>[sprayballs, exhaust condenser, level probes, septum]</i> (1) 3 in <i>[spare]</i>		(1) 6 in <i>[exhaust condenser]</i> (3) 2 in <i>[rupture disk, spare, vessel light]</i> (1) 3 in <i>[spare]</i> (2) 4 in <i>[sprayballs]</i> (1) 1.5 in <i>[pressure transmitter, level, spare]</i>
Upper side wall	(1) 0.75 in NA-Connect <i>[gas overlay]</i> (5) 0.5 in Tapered Tri-clamps <i>[SIP/CIP addition valves]</i> (1) 1.5 in Tapered Tri-clamp <i>[pressure gauge]</i> (1) 4 in Tapered Tri-clamp <i>[viewing port]</i>				(1) 1.5 in NA-Connect <i>[gas overlay]</i> (1) 1.5 in Pressure gauge (3) 0.5 in Tapered Tri-clamp <i>[addition]</i> (2) 1 in Tapered Tri-clamp <i>[addition]</i> (1) 3 in Tapered Tri-clamp <i>[upper DP transmitter]</i> (1) 6 in Tapered Tri-clamp <i>[viewing port]</i>		
Lower side wall	(2) 0.75 in NA-Connects <i>[RTD, thermowell]</i> (4) 25 mm Ingold® ports at 15 ° angle <i>[pH, DO, Redox, spare pH, spare DO]</i> (2) 1.5 in NA-Connect <i>[sample valve, sparge]</i>				Same as 60 - 400 L, plus: (1) 3 in NA-Connect <i>[sparge]</i> (1) 2 in NA-Connect <i>[sight glass]</i>		
Bottom	(1) 1 in Drain valve (1) Drain flange (1) 1.5 in NA-Connect <i>[lower DP transmitter]</i>	(1) 1.5 in Drain valve (1) Drain flange (1) 1.5 in NA-Connect <i>[lower DP transmitter]</i>	(1) 2 in Drain valve (1) Drain flange (1) 3 in NA-Connect <i>[lower DP transmitter]</i>				

New Brunswick™ BioFlo® Pro system specifications*

Controller	
System	Standard Allen Bradley® PLC, design based on GaMP guidelines
Display	Large color industrial touchscreen interface
cGMP validation	Validation documents available to support cGMP validation of cell culture and microbial systems. FRS, DDS, Trace Matrix, IQ and OQ
Sensor options	pH/DO kit; redundant pH/DO probe kit; SIP retractable probe housing; redox probe and transmitter; foam, level, high foam, high high foam
Regulatory compliance	CAN/CSA-C22.2 No. 61010-1 UL Standard UL-61010-1

Eppendorf is ISO 13485 and 9001 certified. * Specifications subject to change without notice.

Piping skid	
Construction	Material: 316L stainless steel; Gaskets/O-rings: EPDM Class VI and Silicon
Air line	Equipped with rotameter, SIP inlet filter, sparger, single gas air control. Options include: Thermal Mass Flow Controller (TMFC), dual inlet air filters (in series), two gas air control, oxygen supplementation, dual inlet air filters with integrity-test ports, overlay valve
Exhaust line	Designed for minimal backpressure, unregulated. Standard heated exhaust filter and manual backpressure regulator. Options include: automatic backpressure control, dual exhaust filters (in parallel), exhaust condenser, dual exhaust filters with integrity-test ports
Temperature	User-definable PLC-based automated sterilization program; temperature increases of 1 °C per minute; Glycol heat exchanger optional
System dimensions W x D x H	
60 - 120 L	1.6 x 1.24 x 2.44 m (6 ft 5 in x 4 ft 1 in x 8 ft)
240 - 400 L	2.06 x 1.42 x 3.12 m (6 ft 9 in x 4 ft 8 in x 10 ft 3 in)
800 - 1200 L	2.16 x 2.06 x 4.65 m (7 ft 1 in x 6 ft 9 in x 15 ft 3 in)
2400 L	2.5 x 2.6 x 5.34 m (8 ft 2 in x 8 ft 6 in x 17 ft 6 in)

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact
 Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany
newbrunswick@eppendorf.com

www.eppendorf.com

Allen-Bradley® is a registered trademark of Rockwell Automation, Inc., USA. NA-Connect® and Ingold® are registered trademarks of Millipore AB, Sweden. Eppendorf® and the Eppendorf logo are registered trademarks Eppendorf AG, Germany. New Brunswick™ is a trademark of Eppendorf AG, Germany. All rights reserved, including graphics and images. Order no B-4028. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.

EP255146 BioFlo Pro 240L R1.2 - 2016 Pricelist Rev. 3.2

Sales quote rev. 3.5 Eppendorf NB™ BioFlo® Pro 240 Liter SIP Fermentor consisting of the following:			
ITEM / DESCRIPTION	Quantity	2016 (€)	
		Totals	
M1364-1003	Control Cabinet	1	
	- 10" Adjustable Touch Screen interface		
	- Allen Bradley PLC		
	- Necessary inputs and Outputs		
M1364-2380	- Auto flow/Pressure I/O module	1	
M1364-2383	- Seven Additional 4-20mA Inputs	1	
M1364-2361	- BioCommand Scada Panel Option	1	
M1364-2382	- Variable Speed Pump IO Module (in combination with variable speed pump)	1	
	<i>Piping and Instrumentation</i>		
	- Valves for automatic sterilization		
	- Automatic temperature control		
	- Automation speed control		
M1290-2404	- Manual pressure control	1	
M1290-2506	- Inlet filter with integrity test port	1	
M1290-2464	- Single gas inlet (240L)	1	
M1290-2483	- Manual flow control (rotameter)	1	
M1290-2529	- Overlay valve not included	1	
M1290-2425	- Standard Exhaust filter	1	
M1290-4003	240-Liter Vessel Assembly	1	
	- 3:1 height to diameter ratio		
	- Spring Assisted Manway		
M1290-9221	- Rushton Impeller 240L	3	
	- Baffle Cage Assembly		
	- 4" Sight glass		
M1290-3103	- Vessel load cells not included	1	
M1364-2543	- CIP Option not included	1	
M1290-2623	- Resterilizable Sample Valve	1	
M1290-2561	- Resterilizable Addition Valve Array (1/2")	1	
M1290-3003	Lower Sparge Bottom Mounted Drive and Seal	1	
	- Double mechanical Seal		
M1364-0009	CE Marking	1	
M1364-0571	4 Fixed Speed Pump Box	1	
	Total Sub-systems:		
M1290-0642	1.5" Tri-Clamp Septum	1	
M1290-0390	1/2" Addition Connection Kit BF Pro	2	
M1290-0500	SIP Housing (120 mm)	1	
M1364-2370	Dual pH/DO Transmitter	1	
M1290-0601	Ingold Polarographic 120 mm DO probe	1	
M1290-0611	Ingold Gel Filled pH Probe 120 mm	1	
M1364-2374	Low Seal Pressure Switch	1	
M1290-0503	High High Foam 240/400L Probe	1	
M1290-0504	High Foam & Foam 240/400L Probe	1	
M1290-2443	240 Liter Exhaust Condensor for SIP	1	
M1290-2469	400/240 Liter Two Gas Mixing	1	
M1290-2488	240 Liter Auto Flow Control	1	
M1290-2604	400/240 Liter Glycol Option	1	
	Total System as above		€ 221.412
OPTIONS			
M1290-2562	2 Resterilizable Addition Valve Array (replaces M1290-2561)	1	5.342 €
M1290-0760	Instrument Air Prefilter/Regulator Kit	1	429 €
M1290-0654	Water Prefilter/Reg Kit (240/400L)	1	1.907 €
M1290-0664	Main Steam Prefilter/Reg Kit (240/400L)	1	6.207 €
M1290-0674	Process Steam Reg Kit (240/400L)	1	4.922 €
M1290-2573	240 Liter CIP - Sprayballs Only	1	6.033 €
M1326-0010	Biocommand Batch Control	1	8.004 €

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Ontwikkeling en uitvoering van een economisch verantwoorde bioreactor voor bacteriegeassisteerde fytoremediatie

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**
Jaar: **2017**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Ghoos, Lode

Datum: **12/06/2017**