

19



Octrooicentrum
Nederland

11 1033432

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1033432

51 Int.Cl.:
G01N33/18 (2006.01)

22 Ingediend: 20.02.2007

41 Ingeschreven:
21.08.2008 I.E. 2008/11

47 Dagtekening:
21.08.2008

45 Uitgegeven:
03.11.2008 I.E. 2008/11

73 Octrooihouder(s):
Stichting Wetsus Centre of Excellence for
Sustainable Water Technology te
Leeuwarden.

72 Uitvinder(s):
Hubertus Victor Marie Hamelers te Heelsum.
Catharina Wilhelmina van Oers te Nijmegen.
Gerrit Jan Willem Euverink te Haren.
Cees Jan Nico Buisman te Harich.

74 Gemachtigde:
Ir. A.A.G. Land c.s. te 2502 EN Den Haag.

54 **Werkwijze voor het bepalen van de toxiciteit van een monsterstroom en apparaat daarvoor.**

57 De onderhavige uitvinding heeft volgens een eerste aspect betrekking op een werkwijze voor het bepalen van de toxiciteit van een monsterstroom. In deze werkwijze volgens de uitvinding wordt gebruik gemaakt van een microbiële brandstofcel. Volgens een verder aspect heeft de uitvinding betrekking op een apparaat dat geschikt is voor het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding. Een dergelijk apparaat is bijvoorbeeld toepasbaar als een biosensor.

NL C 1033432

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Octrooicentrum Nederland is een agentschap van het ministerie van Economische Zaken

Werkwijze voor het bepalen van de toxiciteit van een monsterstroom en apparaat daarvoor.

De onderhavige uitvinding heeft volgens een eerste
5 aspect betrekking op een werkwijze voor het bepalen van de toxiciteit van een monsterstroom.

Volgens een verder aspect heeft de uitvinding
betrekking op een apparaat dat geschikt is voor het uitvoeren
van de werkwijze volgens de uitvinding. Een dergelijk
10 apparaat is bijvoorbeeld toepasbaar als een biosensor.

Het gebruik van een microbiële brandstofcel (MBC) als
biosensor voor bepaling van de "biochemische zuurstofvraag
(BZV)" oftewel de "biochemical oxygen demand (BOD)" is bekend
uit de stand der techniek [1,2,3,4,5] Dergelijke BZV
15 biosensoren maken gebruik van anodofiele micro-organismen,
die onder anaërobe condities een organisch substraat kunnen
oxideren door gebruik te maken van een anode als elektronen
acceptor. Aan een kathode worden de elektronen vervolgens
gebruikt voor de reductie van zuurstof. In dergelijke
20 biosensoren wordt de metabole activiteit van de anodofiele
micro-organismen gecorreleerd aan de BZV. Daar de anodofiele
micro-organismen de anode als elektronen acceptor gebruiken
is hun metabole activiteit te bepalen aan de hand van de
stroom die loopt tussen de anode en kathode.

25 In deze in de stand der techniek beschreven MBC
biosensoren wordt het aantal Coulomb lading dat tussen de
anode en kathode wordt verplaatst gerelateerd aan de metabole
activiteit van de micro-organismen in de brandstof cel.
Hierdoor dient een integratie van de ladingsverplaatsing over
30 de tijd plaats te vinden. Dit maakt het onmogelijk om real-
time metingen uit te voeren. Verder is de uit de stand der
techniek bekende MBC biosensor alleen beschreven als BZV
sensor en is deze niet bijzonder geschikt voor het meten van

de toxiciteit van een monsterstroom. Dit omdat de gevoeligheid van de sensor niet goed te regelen is.

De uitvinding beoogt een oplossing te bieden voor ten minste één van de bovengenoemde nadelen van de stand der techniek. Gevonden is dat de anode in een MBC biosensor potentiostatisch geregeld kan worden en dat een dergelijke potentiostatische regeling van de anode het mogelijk maakt om de metabole activiteit van de micro-organismen direct te correleren aan de stroomsterkte van de stroom die in het systeem loopt tussen de kathode en de anode.

Analoog hieraan is het tevens mogelijk om de kathode potentiostatisch te regelen. Dit is met name van nut indien micro-organismen worden toegepast die betrokken zijn bij de overdracht van elektronen vanaf de kathode zoals het geval is bij microbiëel geassisteerde reductie van zuurstof aan een kathode.

De uitvinders van de onderhavige uitvinding zijn verder tot het inzicht gekomen dat het door de potentiostatische regeling van de anode dan wel de kathode voorts mogelijk is om de gevoeligheid van de biosensor te regelen. Gevonden is dat dit mogelijk is door de potentiaal van de anode dan wel de kathode op een voorafbepaalde waarde te regelen ten opzichte van de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de anode respectievelijk de reductiereactie aan de kathode. De achtergrond hiervan zal hieronder nader worden toegelicht.

Bond en Lovley [6] beschrijven experimenten waarbij een MBC met anodofiele micro-organismen wordt bedreven met een potentiostatische regeling van de anode. De beschreven MBC wordt niet toegepast als sensor en de beschreven experimenten hebben enkel betrekking op een MBC die wordt bedreven bij een constante, relatief hoge geregelde potentiaal van de anode (+200 mV ten opzichte van een Ag/AgCl

elektrode, bij een evenwichtspotentiaal van $-0,42$ V ten opzichte van de Ag/AgCl elektrode). Deze geregelde potentiaal is hierbij niet vooraf gerelateerd aan de evenwichtspotentiaal van het anode systeem.

5 Bergel et al. [7]. Beschrijven experimenten waarbij in een brandstofcel aan de kathode microbiëel geassisteerde reductie van zuurstof met behulp van een biofilm wordt toegepast. De beschreven brandstofcel wordt niet gebruikt als sensor en de experimenten worden uitgevoerd bij een geregelde
10 potentiaal van de kathode tussen $-0,1$ V en $-0,4$ V ten opzichte van een standaard calomel elektrode (SCE). De redox evenwichtspotentiaal van het kathode systeem ligt op $+ 0,20$ V ten opzichte van de SCE. Deze geregelde potentiaal is hierbij niet vooraf gerelateerd aan de evenwichtspotentiaal van het
15 kathode systeem.

De onderhavige uitvinding verschaft volgens een eerste aspect een werkwijze voor het bepalen van de toxiciteit van een monsterstroom omvattende:

- het verschaffen van een aantal microbiële
20 brandstofcellen omvattende een aantal kathodecompartimenten, voorzien van een kathode, een aantal anodecompartimenten, voorzien van een anode, welke anode en kathode elektrisch verbonden zijn, en waarbij in het anodecompartiment een anodesubstraatfluïdum aanwezig is omvattende een oxideerbare
25 verbinding die aan de anode kan worden geoxideerd, in het kathodecompartiment een kathodesubstraatfluïdum aanwezig is omvattende een reduceerbare verbinding die aan de kathode kan worden gereduceerd, op tenminste één van de anode of kathode een elektrochemisch-actieve microbiële populatie aanwezig is
30 die betrokken is bij de overdracht van elektronen naar de anode respectievelijk van de kathode en waarbij verder middelen aanwezig zijn voor het toevoeren van een

monsterstroom aan tenminste een deel van de microbiële populatie;

- het toevoeren van de monsterstroom aan tenminste een deel van de microbiële populatie;

5 - het bepalen van de potentiële toxiciteit van de monsterstroom aan de hand van een verandering in de metabole activiteit van tenminste het deel van de microbiële populatie ten opzichte van een referentiemeting aan de hand van een verandering in de elektrische stroom die loopt tussen de
10 kathode en de anode.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat tenminste één van de anode of kathode elektrisch verbonden is aan een referentie elektrode, de metabole activiteit van tenminste het deel van de microbiële populatie
15 wordt bepaald aan de hand van de stroomsterkte van de elektrische stroom tussen de kathode en de anode, en dat ten minste één van de aan een referentie elektrode verbonden anode respectievelijk kathode dusdanig potentiostatisch wordt geregeld op een geregelde potentiaal (V_p) ten opzichte van
20 deze referentie elektrode dat op enig moment wordt voldaan aan de voorwaarde $0 > V_e - V_p \geq x = -500$ mV voor een potentiostatisch geregelde anode en/of $0 < V_e - V_p \leq y = +200$ mV voor een potentiostatisch geregelde kathode, waarbij V_e de waarde is van de evenwichtspotentiaal ten opzichte van de
25 referentie elektrode van de oxidatiereactie aan de potentiostatisch geregelde anode respectievelijk de waarde van de evenwichtspotentiaal ten opzichte van de referentie elektrode van de reductiereactie aan de potentiostatisch geregelde kathode. Aan de voorwaarde $0 > V_e - V_p \geq -500$ mV wordt
30 voldaan indien de geregelde potentiaal maximaal 500 mV hoger is dan de evenwichtspotentiaal. Aan de voorwaarde $0 < V_e - V_p \leq +200$ mV wordt voldaan indien de geregelde potentiaal maximaal 200 mV lager is dan de evenwichtspotentiaal.

De werkwijze volgens de uitvinding is gericht op het bepalen van de (potentiële) toxiciteit van een monsterstroom. Bekend is dat veranderingen in de metabole activiteit van organismen en micro-organismen in het bijzonder kan worden
5 gebruikt als aanduiding voor de aanwezigheid van stoffen die een negatieve invloed hebben op biochemische activiteit en aldus mogelijk toxisch zijn. De werkwijze volgens de uitvinding kan bijvoorbeeld van nut zijn in de monsteranalyse van afvalwater of de analyse van monsters verkregen uit
10 drinkwater leidingsystemen. Andere toepassingen zullen duidelijk zijn voor de vakman.

Begrepen moet worden, dat met de werkwijze volgens de uitvinding geen definitief uitsluitsel kan worden gegeven met betrekking tot de toxiciteit van de monsterstroom. Verdere
15 analyse van de monsterstroom kan hiervoor noodzakelijk zijn. De werkwijze volgens de uitvinding is echter bijzonder geschikt om op eenvoudige wijze vast te stellen of er potentieel een toxische verbinding in de monsterstroom aanwezig is en of verdere analyse hiervan noodzakelijk is.

20 In de werkwijze volgens de uitvinding wordt de metabole activiteit van elektrochemisch-actieve micro-organismen bepaald. Met elektrochemisch-actieve micro-organismen worden in het kader van de onderhavige uitvinding bedoeld micro-organismen, die bij de oxidatie van een
25 substraat een anode, hetzij direct hetzij via een redoxmediator, kunnen gebruiken als terminale elektronen acceptor, dan wel een kathode (direct of via een mediator) kunnen gebruiken als elektronendonor voor de reductie van een substraat. Dergelijk micro-organismen zijn bekend voor de
30 vakman. Anodofiele micro-organismen (die een anode kunnen gebruiken als terminale elektronen acceptor), worden bijvoorbeeld geselecteerd uit één of meer van *Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens*, *Shewanella*

putrefaciens, *Rhodoferrax ferrireducens*, inclusief combinaties hiervan.

Een kathodische biofilm die een kathode kan gebruiken als elektronendonor wordt beschreven door Bergel et al. [7].

5 In de werkwijze volgens de uitvinding wordt een microbiële brandstof cel verschaft. De werking van een microbiële brandstofcel is bekend bij de vakman [1,2,3,4,5,6,8] Zo zal de vakman begrijpen dat een microbiële brandstofcel in een geschikte vorm onder andere zal omvatten
10 een aantal kathodecompartimenten, voorzien van een kathode, een aantal anodecompartimenten, voorzien van een anode, waarbij de anode en kathode elektrisch verbonden zijn. In het anode en kathodecompartiment is verder een fluïdum aanwezig dat een oxideerbare verbinding respectievelijk een
15 reduceerbare verbinding omvat als substraat. Verder zullen in een MBC elektrochemisch-actieve micro-organismen aanwezig zijn op de anode en/of de kathode. Zo kunnen op de anode anodofiele micro-organismen aanwezig zijn en kunnen op de kathode micro-organismen aanwezig zijn die betrokken zijn bij
20 microbiëel geassisteerde zuurstof reductie. De vakman zal verder begrijpen dat in een werkende microbiële brandstofcel een elektrische stroom wordt gegenereerd tussen de kathode en anode ten gevolge van de anaërobe oxidatie van een aantal substraten in het anodecompartiment onder gebruikmaking van
25 de anode als elektronen acceptor en de reductie van een reduceerbare verbinding aan de kathode in het kathodecompartiment met van de anode afkomstige elektronen.

Om er voor zorg te dragen dat het anodesubstraatfluïdum en/of kathodesubstraatfluïdum wordt
30 ververst/aangevuld gedurende het verloop van de tijd, kunnen deze worden toegevoerd naar het anodecompartiment respectievelijk het kathodecompartiment. Indien toevoer van het anodesubstraatfluïdum en/of kathodesubstraatfluïdum

gewenst en/of noodzakelijk is, worden hiervoor geschikte middelen verschaft. Toevoer van anodesubstraatfluidum en/of kathodesubstraatfluidum geschiedt mogelijk tezamen met de monsterstroom in een gemengd anodemengsel respectievelijk 5 kathodemengsel. Toevoer gescheiden van de monsterstroom, waarbij in het anodecompartiment menging van het anodesubstraatfluidum en de monsterstroom tot een anodemengsel plaatsvindt, dan wel in het kathodecompartiment menging van het kathodesubstraatfluidum en de monsterstroom 10 tot een kathodemengsel plaatsvindt, is echter tevens mogelijk.

De kathode- en anodecompartimenten kunnen verder worden gescheiden door een voor protonen doorlaatbaar partitievlak, dat ervoor dient om het transport van protonen 15 mogelijk te maken, terwijl de verdere uitwisseling van reagentia wordt geminimaliseerd. Hoewel een dergelijk voor protonen doorlaatbaar partitievlak hoogst gewenst is voor een microbiële brandstofcel, die wordt toegepast voor het opwekken van elektrische energie, is een dergelijk 20 partitievlak enkel optioneel in de huidige uitvinding. Dit omdat uitwisseling van reagentia minder kritiek is in de huidige uitvinding. Voorbeelden van protonen geleidende materialen die kunnen worden toegepast als partitievlak zijn bijvoorbeeld kationselectieve membranen, zoals Nafion® of 25 alternatieven hiervoor.

Zoals voor de vakman bekend kunnen anodofiele organismen een grote variëteit van organische verbindingen en mengsels van deze verbindingen gebruiken als voedingssubstraat (oxideerbare verbinding). Voorbeelden van 30 geschikte voedingssubstraten zijn lagere (C1-C8) alcoholen of lagere (C1-C8) organische zuren zoals ethanol, propanol, azijnzuur of melkzuur. Tevens kunnen de voedingssubstraten

aanwezig zijn in complexe mengsels van organische verbindingen zoals bijvoorbeeld een afvalwaterstroom.

Van kathodische biofilms en de micro-organismen die hierin aanwezig zijn wordt gedacht dat ze autotroof zijn, dat wil zeggen dat ze CO₂ kunnen gebruiken als koolstofbron. De energie die ze nodig hebben voor hun anabole metabolisme verkrijgen ze uit de reductie van een substraat, zoals zuurstof, met elektronen van de kathode.

In de werkwijze volgens de uitvinding wordt een te onderzoeken monsterstroom toegevoerd aan tenminste een deel van de microbiële populatie. Begrepen moet worden dat de monsterstroom separaat van het anodesubstraatfluidum dan wel het kathodesubstraatfluidum kan worden toegevoerd aan de microbiële populatie, of dat het hierbij kan worden gemengd met het anodesubstraatfluidum dan wel het kathodesubstraatfluidum. Aan de hand van de invloed van de monsterstroom op de metabole activiteit van de microbiële populatie waaraan deze wordt toegevoerd wordt de (potentiële) toxiciteit van de monsterstroom bepaald. De monsterstroom zal over het algemeen in de vorm van een fluidum zijn, zoals een vloeistof.

De monsterstroom kan wel of geen oxideerbaar en/of reduceerbaar substraat bevatten voor de elektrochemisch-actieve micro-organismen. Om te voorkomen dat fluctuaties in het niveau van oxideerbare en/of reduceerbare verbindingen in de monsterstroom de metabole activiteit van de elektrochemisch-actieve micro-organismen beïnvloeden, voorziet de onderhavige uitvinding in een verdere voorkeursuitvoeringsvorm.

In deze uitvoeringsvorm wordt de monsterstroom gemengd met het anodesubstraatfluidum tot een anodemengsel, als de microbiële populatie waaraan het wordt toegevoerd zich bevindt in het anodecompartiment (op de anode), of wordt het

gemengd met het kathodesubstraatfluïdum tot een kathodemengsel, indien de microbiële populatie waaraan het wordt toegevoerd zich bevindt in het kathodecompartiment (op de kathode). Hierbij wordt er zorg voor gedragen dat in het
5 anodemengsel respectievelijk het kathodemengsel de oxideerbare verbinding respectievelijk de reduceerbare verbinding in een dusdanige hoeveelheid aanwezig is, dat deze oxideerbare verbinding respectievelijk reduceerbare verbinding niet limiterend is voor de metabole activiteit van
10 de elektrochemisch-actieve micro-organismen, waaraan de monsterstrom wordt toegevoerd.

Bij voorkeur is de bijdrage van het anodesubstraatfluïdum ofwel het kathodesubstraatfluïdum voldoende om substraat-ongelimiteerde activiteit van de
15 microbiële populatie te verzekeren. Dit maakt dat 100% variatie in de hoeveelheid van enig oxideerbaar of wel reduceerbaar substraat in de monsterstroom geen effect heeft op de metabole activiteit van de elektrochemisch-actieve micro-organismen waaraan dit wordt toegevoerd. Dit vergroot
20 de kans dat gemeten effecten worden veroorzaakt door de aanwezigheid van potentieel toxische verbindingen.

Indien de monsterstroom wordt gemengd met het anodesubstraatfluïdum kan de oxideerbare verbinding in het anodesubstraatfluïdum bijvoorbeeld acetaat zijn. De
25 drempelwaarde voor acetaat ongelimiteerde activiteit van anodofiele micro-organismen in een systeem kan bijvoorbeeld worden bepaald door bij de hoogst geregelde potentiaal van de anode, die wordt geselecteerd, de acetaatconcentratie in afwezigheid van de monsterstroom te verhogen, totdat er geen
30 verdere toename van de elektrische stroom is. In het gebied waar er geen verdere verhoging van de elektrische stroom is, zal acetaat als substraat niet-limiterend zijn.

Over het algemeen zal acetaat bij een concentratie van tussen 2-5 mM reeds niet-limiterend zijn als substraat, zoals bekend is voor de vakman. Het zal voor de vakman tevens bekend zijn bij welke concentraties andere oxideerbare
5 substraten, zoals glucose, ethanol, of melkzuur, tevens niet-limiterend zijn. Ook zullen deze concentraties voor reduceerbare verbindingen, zoals zuurstof, bekend zijn voor de vakman of eenvoudig kunnen worden bepaald in analogie met wat bovenstaand is beschreven.

10 De monsterstroom bevat bij voorkeur, in vergelijking tot het anodesubstraatfluidum dan wel kathodesubstraatfluidum waarbij het gemengd wordt, geen of nauwelijks enige biologisch oxideerbare of reduceerbare verbindingen. Een voorbeeld van een monsterstromen met een laag gehalte aan
15 biologisch oxideerbare of reduceerbare verbindingen is bijvoorbeeld drinkwater.

Bij voorkeur is het volume van de monsterstroom ten opzichte van een anodesubstraatfluidum dan wel kathodesubstraatfluidum, waarmee het wordt vermengd, zo groot
20 mogelijk. Geschikte verhoudingen voor het mengen van monsterstroom:anodesubstraatfluidum liggen binnen de spreiding 500:1 tot 5:1, zoals 1000:1, 500:1, 100:1, 10:1. Geschikte verhoudingen voor het mengen van monsterstroom met kathodesubstraatfluidum liggen binnen dezelfde spreiding.

25 In de werkwijze volgens de uitvinding wordt de metabole activiteit van de elektro-actieve micro-organismen bepaald aan de hand van de stroomsterkte van de stroom die tussen de kathode en anode loopt. In tegenstelling tot de sensoren uit de stand der techniek wordt in de werkwijze
30 volgens de uitvinding de metabole activiteit van de micro-organismen niet gecorreleerd door het bepalen van het aantal Coulomb lading dat tussen de anode en kathode wordt verplaatst, wat vereist dat de stroom in de tijd wordt

geïntegreerd. In plaats daarvan kan in de werkwijze volgens de uitvinding, door de potentiostatische regeling van de anode, de stroomsterkte tussen de kathode en anode direct gebruikt worden voor het bepalen van de metabole activiteit van de anodofiele micro-organismen.

Potentiostatische regeling van een elektrode is op zich bekend uit het vakgebied van de elektrochemie. Diverse firma's brengen hiervoor geëigende apparaten op de markt, zoals bijvoorbeeld Bank Elektronik - Intelligent Controls GmbH. Aldus staan de vakman diverse geschikte potentiostaten ter beschikking voor toepassing in de onderhavige uitvinding. Voor de potentiostatische regeling van de anode dan wel kathode wordt de anode respectievelijk de kathode middels een potentiostaat gekoppeld aan een referentie elektrode. Bij de potentiostatische regeling van de anode zal de kathode over het algemeen worden toegepast als tegenelektrode. Omgekeerd zal bij de potentiostatische regeling van de kathode over het algemeen de anode als tegenelektrode worden toegepast.

Als referentie elektrode kan elke referentie elektrode worden toegepast waarvan voor de vakman duidelijk is dat deze geschikt is voor toepassing in de onderhavige uitvinding, zoals een Ag/AgCl referentie elektrode, een calomel elektrode of een standaard waterstof elektrode.

Middelen voor het bepalen van de stroom tussen de kathode en de anode en de wijze van gebruik van deze middelen zijn bekend voor de vakman. Bijvoorbeeld kan gebruik worden gemaakt van een stroommeter van een geschikt type.

Daar de metabole activiteit van de elektro-actieve micro-organismen nu direct te correleren is aan de sterkte van de stroom tussen de anode en kathode is het mogelijk om real-time metingen uit te voeren en aldus veranderingen in de metabole activiteit van de elektro-actieve micro-organismen vast te stellen. Deze veranderingen kunnen worden

gecorreleerd aan veranderingen in de samenstelling van het aan het anodecompartiment dan wel het kathodecompartiment toegevoerd monstermedium, bijvoorbeeld ten gevolge van de aanwezigheid van een (potentieel) toxische verbinding.

5 Vergelijkbaar aan hun invloed op andere (hogere) organismen kunnen toxische verbindingen namelijk de metabole activiteit remmen van elektro-actieve micro-organismen, zoals anodofiele micro-organismen. Om de aanwezigheid van de toxische stoffen te bepalen kan de metabole activiteit van de
10 elektro-actieve micro-organismen worden gecorreleerd aan een referentiemeting. Omdat het met de werkwijze volgens de uitvinding mogelijk is om real-time metingen uit te voeren kan de referentiemeting een meting op een monsterstroom zijn, die eerder in de tijd is genomen.

15 Aldus kunnen met de werkwijze volgens de uitvinding real-time bepalingen worden verricht. Veranderingen, met name verminderingen, van de metabole activiteit van de micro-organismen kunnen een indicatie zijn voor de aanwezigheid van (potentieel) toxische stoffen in een monsterstroom. Bij
20 bijvoorbeeld een verlaging van de metabole activiteit van anodofiele micro-organismen zal de conversie van de oxideerbare verbinding afnemen, waardoor minder elektronen aan de anode worden afgegeven en de stroomsterkte van de stroom tussen de kathode en anode afneemt. Op vergelijkbare
25 wijze zal de sterkte van de stroom tussen de kathode en anode afnemen indien de metabole activiteit van een kathodische biofilm afneemt.

 De metabole energie die elektro-actieve micro-organismen ter beschikking staat wordt bepaald door het
30 verschil tussen de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de anode dan wel van de reductiereactie aan de kathode en de potentiaal van de anode respectievelijk de potentiaal van de kathode. Hierbij is de

evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de anode gelijk aan die potentiaal van de anode waarbij er juist geen stroom loopt in het systeem in een steady state toestand. Bij deze evenwichtspotentiaal is namelijk de oxidatie van de
5 oxideerbare verbinding aan de anode in evenwicht met reductie van de geoxideerde producten aan de anode, waardoor er netto geen reactie plaatsvindt aan de anode.

In analogie hiermee is de evenwichtspotentiaal van de reductiereactie aan de kathode gelijk aan die potentiaal van
10 de kathode waarbij er juist geen stroom loopt in het systeem in een steady state toestand. Bij deze evenwichtspotentiaal is namelijk de reductie van de reduceerbare verbinding aan de kathode in evenwicht met oxidatie van de gereduceerde producten aan de kathode, waardoor er netto geen reactie
15 plaatsvindt aan de kathode.

Om de metabole energie van de anodofiele micro-organismen te beïnvloeden kan dus de samenstelling van het anodefluidum dan wel het kathodefluidum met betrekking tot de oxideerbare verbinding dan wel reduceerbare verbinding
20 veranderd worden. Op alternatieve wijze kan de geregelde anode potentiaal respectievelijk de geregelde kathode potentiaal worden veranderd. Verandering van de geregelde potentialen is eenvoudig te realiseren door de geregelde potentiaal van de anode dan wel die van de kathode te
25 variëren. Tevens heeft een verandering van de geregelde potentiaal het meest directe effect, daar bij een verandering van de oxideerbare en/of reduceerbare verbinding andere effecten, zoals transmembraantransport van de verbinding en inductie van geëigende transportsystemen hierbij tevens een
30 rol kunnen spelen.

In de werkwijze volgens de uitvinding wordt de anode dan wel de kathode dusdanig potentiostatisch geregeld op een geregelde potentiaal (V_p) ten opzichte van de referentie

elektrode dat op enig moment wordt voldaan aan de voorwaarde $0 > V_e - V_p \geq x = -500$ mV voor een potentiostatisch geregelde anode en/of $0 < V_e - V_p \leq y = +200$ mV voor een potentiostatisch geregelde kathode, waarbij V_e de waarde is van de evenwichtspotentiaal ten opzichte van de referentie elektrode van de oxidatiereactie aan de potentiostatisch geregelde anode respectievelijk de waarde van de evenwichtspotentiaal ten opzichte van de referentie elektrode van de reductiereactie aan de potentiostatisch geregelde kathode.

10 Bij voorkeur wordt de anode dan wel de kathode dusdanig potentiostatisch geregeld ten opzichte van de referentie elektrode dat in de bovenstaand relatie de grens x een waarde heeft van -450 mV, -400 mV, -350 mV, -300 mV, -250 mV, -200 mV, -150 mV, -100 mV, -90 mV, -80 mV, -70 mV, -60 mV, -50 mV, 15 -40 mV, -30 mV, -20 mV, of -10 mV en/of de grens y een waarde heeft van +150 mV, +100 mV, +90 mV, +80 mV, +70 mV, +60 mV, +50 mV, +40 mV, +30 mV, +20 mV, of +10 mV. Bij deze waarden van het potentiaalverschil hebben de elektrochemisch-actieve micro-organismen relatief weinig metabole energie tot hun 20 beschikking. Dit resulteert in een sensor met een hoge gevoeligheid.

Zonder gebonden te willen zijn door deze theorie wordt gedacht dat micro-organismen die veel metabole energie tot hun beschikking hebben meer mogelijkheden hebben om 25 toxische verbindingen te neutraliseren. Aldus kan een monsterstroom met een relatief laag toxiciteitsniveau reeds invloed hebben op micro-organismen die weinig metabole energie tot hun beschikking hebben, terwijl micro-organismen met veel metabole energie mogelijk nauwelijks worden 30 beïnvloed. Een monsterstroom met een relatief hoge toxiciteit kan daarentegen invloed hebben op de metabole activiteit van zowel micro-organismen die weinig metabole energie tot hun

beschikking hebben alsmede op micro-organismen met veel metabole energie.

De potentiostatische regeling van de anode dan wel de kathode ten opzichte van de referentie elektrode, binnen de
5 gegeven waarden van $0 > V_e - V_p \geq -500$ mV voor de anode en/of van $0 < V_e - V_p \leq +200$ mV voor de kathode, duurt volgens een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding minimaal 15 minuten, zoals minimaal 30 minuten, bij voorkeur minimaal 60 minuten, zoals minimaal 120 minuten,
10 met meer voorkeur minimaal 5 uur, zoals minimaal 10 uur.

Indien de meting aan de monsterstroom langer dan een etmaal voortduurt, worden deze tijden bij voorkeur per etmaal gehanteerd. Over het algemeen is het voldoende om gedurende deze tijdsperioden metingen aan de monsterstroom uit te
15 voeren bij een gevoeligheid die hoort bij de gegeven potentiaalverschillen aan de anode en/of kathode. De voorkeur ligt hierbij echter wel bij het gedurende lange periode meten bij een gevoeligheid die hoort bij de gegeven potentiaalverschillen. Met de meeste voorkeur wordt derhalve
20 continu voldaan aan de voorwaarde $0 > V_e - V_p \geq -500$ mV voor de anode en/of $0 < V_e - V_p \leq +200$ mV voor de kathode.

Zoals uit het bovenstaande blijkt kan de mate waarin de micro-organismen op verschillende metabole energie niveaus worden beïnvloed door een monsterstroom worden gebruikt als
25 maat voor de toxiciteit van de monsterstroom (die bijvoorbeeld wordt bepaald door de concentratie van een aanwezige toxische verbinding of de mate van toxiciteit van een aanwezige verbinding). In een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt de geregelde
30 potentiaal van de anode dan wel de kathode derhalve gevarieerd in de tijd. Hiermee wordt de metabole energie die voor de elektro-actieve micro-organismen beschikbaar is gevarieerd. Door de metabole energie van de elektro-actieve

micro-organismen te variëren (bijvoorbeeld door de potentiaal van de anode te variëren indien anodofiele organismen worden toegepast) kan een kwalitatieve en mogelijk zelfs (semi-)kwantitatieve aanduiding worden verkregen van de toxiciteit van de monsterstroom die wordt gemeten. Opgemerkt dient te worden dat bij variatie van de geregelde potentiaal van de anode in de tijd het potentiaal verschil tussen de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de anode en de geregelde potentiaal van de anode de eerder gegeven voorwaarde van $0 > V_e - V_p \geq -500$ mV op een bepaald moment kan overschrijden. Het feit dat het genoemde potentiaalverschil op enig moment tussen 0 en -500 mV bedraagt, sluit vanzelfsprekend niet uit dat dit potentiaalverschil op een ander moment meer negatief kan zijn dan -500 mV. Bij variatie van de geregelde potentiaal van de kathode geldt ook voor het potentiaalverschil tussen de evenwichtspotentiaal van de reductiereactie aan de kathode en de geregelde potentiaal van de kathode dat dit op bepaalde tijdstippen groter kan zijn dan +200 mV. Zoals de vakman zal begrijpen kan de potentiaal van de anode en of kathode worden geregeld door de stroom of de weerstand in het systeem te veranderen.

Een alternatieve wijze om de invloed van de monstersamenstelling op de micro-organismen bij verschillende metabole energie niveaus te bepalen maakt onderdeel uit van een verdere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding. In deze uitvoeringsvorm wordt een veelvoud van microbiële brandstofcellen verschaft waarvan de geregelde potentialen van de anodes dan wel de kathodes op enig tijdstip verschillen. Door het voeden van de anode dan wel de kathodecompartimenten met dezelfde monsterstroom kan aldus tevens de invloed van de monstersamenstelling op de micro-organismen bij verschillende metabole energie niveaus worden bepaald. Het is hierbij mogelijk dat verschillende

(gescheiden) anodecompartimenten respectievelijk kathodecompartimenten worden gevoed met een zelfde monsterstroom, maar ook dat meerdere anodes dan wel kathodes aanwezig zijn in een enkel anodecompartiment respectievelijk 5 kathodecompartiment. Het heeft de voorkeur dat maatregelen worden getroffen die er voor zorg dragen, dat de monsterstroom, die door de verschillende anodes dan wel kathodes worden 'gezien' een identieke samenstelling hebben. Dit kan bijvoorbeeld door de monsterstroom in parallelle 10 stromen naar de verschillende anodes respectievelijk kathodes te laten stromen. In deze voorkeursuitvoeringsvorm kan de geregelde potentiaal van de anodes dan wel kathodes zowel variëren in de tijd als ook constant zijn in de tijd. Opgemerkt dient te worden dat ook in deze uitvoeringsvorm het 15 potentiaalverschil tussen de geregelde potentiaal van een aantal anodes en de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie die hieraan plaatsvindt buiten het eerder gegeven traject van 0 tot -500 mV kan liggen. Het feit dat het genoemde potentiaalverschil op enig moment tussen 0 en 20 -500 mV ligt in één van de MBC's, sluit vanzelfsprekend niet uit dat dit potentiaalverschil in één of meer van de andere MBC's hierbuiten ligt. Dit zelfde geldt ook voor het potentiaalverschil tussen de evenwichtspotentiaal van de reductiereactie aan de kathode en de geregelde potentiaal van 25 een aantal kathodes.

Met name in deze uitvoeringsvorm is het mogelijk om het potentiaal verschil tussen verschillende anodes dan wel kathodes en de oxidatiereacties respectievelijk reductiereacties die hieraan plaatsvinden te variëren door 30 een variatie in de samenstelling van het anodesubstraatfluidum respectievelijk kathodesubstraatfluidum. Dit kan met name door het aanbrengen

van een variatie in de oxideerbare verbinding dan wel de reduceerbare verbinding tussen de onderling MBC's.

Volgens een verdere voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding ligt de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de anode tussen +100 tot -600 mV, bij voorkeur 0 tot -500 mV, met meer voorkeur -100 tot -500 mV, met de meeste voorkeur -200 tot -450 mV ten opzichte van een Ag/AgCl elektrode.

Volgens weer een andere voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding ligt de evenwichtspotentiaal van de reductiereactie aan de kathode tussen 0 tot +1000 mV, bij voorkeur +100 tot +800 mV, met meer voorkeur +200 tot +700 mV ten opzichte van een Ag/AgCl elektrode.

De redox evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan een anode kan eenvoudig worden bepaald door in een MBC in een situatie, waarbij het oxidatiesubstraat niet-limiterend is, de potentiaal van de anode te verlagen. De potentiaal waar er juist geen stroom meer loopt in het systeem is gelijk aan de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie die aan de anode plaatsvindt.

Tevens kan voor goed gedefinieerde media de evenwichtspotentiaal theoretisch worden bepaald, zoals bekend is voor de vakman.

De werkwijze volgens de uitvinding is toepasbaar binnen een breed temperatuurtraject. Van belang is enkel dat de toegepaste temperatuur microbiële activiteit en vrije stroming van de monsterstroom en/of een eventueel gebruikt anodemengsel en /of kathodemengsel toestaat. Aldus wordt de werkwijze volgens de uitvinding uitgevoerd bij een temperatuur boven het vriespunt van de monsterstroom en/of een eventueel toegepast anodemengsel en/of kathodemengsel. De bovengrens van de toegepaste temperatuur wordt bepaald door

de temperatuur die wordt getolereerd door het toegepast micro-organisme. Er zijn micro-organismen bekend die kunnen groeien tot een temperatuur van 120°C (bij verhoogde druk). Aldus kan de werkwijze volgens de uitvinding worden toegepast
5 bij 0-120°C, bij voorkeur 5-80°C, met meer voorkeur 5-60°C, met de meeste voorkeur 5-45°C.

De uitvinding heeft verder betrekking op een apparaat dat geschikt is voor het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding. Het apparaat is bijvoorbeeld toepasbaar als
10 een biosensor en omvat:

- een aantal microbiële brandstofcellen omvattende een aantal kathodecompartimenten, voorzien van een kathode, een aantal anodecompartimenten, voorzien van een anode, waarbij tenminste één van de anode of kathode geschikt is om
15 een elektrochemisch-actieve microbiële populatie te huisvesten die betrokken kan zijn bij een overdracht van elektronen naar een anode respectievelijk van een kathode;

- middelen voor het toevoeren van een monsterstroom aan tenminste een deel van de microbiële populatie;
- 20 - middelen voor het bepalen van een verandering in de elektrische stroom die loopt tussen de kathode en de anode ten opzichte van een referentiemeting.

Het apparaat volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat tenminste één van de anode of kathode elektrisch
25 verbonden is aan een referentie elektrode, dat de inrichting verder middelen omvat voor het potentiostatisch regelen op een geregelde potentiaal van ten minste één van de aan een referentie elektrode verbonden anode respectievelijk kathode en verder de middelen voor het bepalen van een verandering in
30 de elektrische stroom tussen de kathode en de anode ten opzichte van een referentiemeting ingericht zijn voor het bepalen van een verandering in de stroomsterkte van de elektrische stroom tussen de kathode en de anode.

Bovenstaande technische kenmerken van het apparaat volgens de uitvinding en van de voorkeursuitvoeringsvormen hiervan zullen voor de vakman duidelijk zijn uit de voorgaande beschrijving van de werkwijze volgens de
5 uitvinding.

De uitvinding wordt nu nader uitgelegd aan de hand van de navolgende figuren en de bijgevoegde voorbeelden, die niet-limiterende uitvoeringsvormen van de uitvinding illustreren.

10 In Figuur 1 wordt schematisch weergegeven hoe aan de anode (A) van een microbiële brandstofcel organisch materiaal (OM), dat als oxideerbare verbinding aanwezig is in het anodefluidum, tezamen met water anaëroob wordt geoxideerd tot CO₂ en protonen door anodofiele micro-organismen. De
15 elektronen, die hierbij vrijkomen, worden door de anodofiele micro-organismen afgegeven aan de anode (A) en stromen via een potentiostaat (2) naar de kathode (C). Aan de kathode (C) worden de elektronen gebruikt voor de reductie van zuurstof tezamen met protonen tot water. De ladingsbalans in het
20 systeem wordt in stand gehouden, doordat protonen door het protonen-geleidend materiaal (1) van het anodecompartment naar het kathodecompartment kunnen stromen.

Aan de potentiostaat (2) is tevens een Ag/AgCl referentie elektrode (3) gekoppeld, die in de nabijheid van
25 de anode (A) is geplaatst in het anodecompartment. De potentiostaat (2) houdt de potentiaal van de anode (A) op een ingestelde waarde ten opzichte van de potentiaal van de referentie elektrode. De potentiaal van de anode wordt geregeld op een potentiaal van -300 mV ten opzichte van de
30 Ag/AgCl elektrode. De evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de anode is -420 mV ten opzichte van de Ag/AgCl elektrode. Aldus is $V_e - V_p = -420 - -300 = -120$ mV. Hierbij is het bijvoorbeeld mogelijk dat de geregelde

potentiaal van de anode wordt gevarieerd in de tijd van -415 tot -300 mV, maar ook bijvoorbeeld van -415 tot 100 mV ten opzichte van de Ag/AgCl elektrode. Ook hierbij zal voor een groot deel van het traject (binnen het traject $-415 \text{ mV} < V_p < +80 \text{ mV}$) worden voldaan aan de voorwaarde $0 > V_e - V_p \geq -500 \text{ mV}$.

Door de potentiostatische regeling van de anode is het mogelijk om de momentane stroomsterkte in het systeem te gebruiken als maat voor de metabole activiteit van de anodofiele micro-organismen op de anode. De stroomsterkte kan eenvoudig worden gemeten met behulp van een stroommeter (4) die in het elektrisch systeem is opgenomen. De meetwaarden van de stroommeter (4) kunnen via een datalijn (niet weergegeven) worden doorgegeven aan een dataverwerkingsapparaat (niet weergegeven), zoals een geprogrammeerde microcomputer. Deze kan momentane waarden van de meting vergelijken met een waarde van een referentiemeting.

Literatuurlijst

1. Byung Hong Kim, In Seop Chang, Geun Cheol Gil, Hyung Soo Park & Hyung Joo Kim, "Novel BOD (Biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell", Biotechnology Letters 25: 541-545, 2003
2. Mia Kim, Su Mi Youn, Sung Hye Shin, Ju Gu Jang, Seol Hee Han, Moon Sik Hyun, Geoffrey M. Gadd & Hyung Joo Kim, "Practical field application of a novel BOD monitoring system", The Royal Society of Chemistry 2003, J. Environ. Monit., 2003, 5, 640-643
3. Kui Hyung Kang, Jae Kyung Jang, The Hai Pham, Hyunsoo Moon, In Seop Chang & Byung Hong Kim, "A microbial fuel cell with improved cathode reaction as a low biochemical oxygen demand sensor", Biotechnology Letter 25: 1357-1361, 2003
4. Hyunsoo Moon, In Seop Chang, Kui Hyun Kang, Jae Kyung Jang & Byung Hong Kim, "Improving the dynamic response of a mediator-less microbial fuel cell as a biochemical oxygen demand (BOD) sensor", Biotechnology Letters 26: 1717-1721, 2004
5. WO 03/097861 A1, "Method and device for detecting toxic material in water using microbial fuel cell", International publication date: 27 november 2003
6. Daniel R. Bond & Derek R. Lovley, "Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes" Applied and Environmental microbiology, Mar. 2003, 1548-1555
7. Alain Bergel, Damien Féron & Alfonso Mollica, "Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm", Electrochemistry Communications 7, 2005, 900-904
8. Bruce E. Logan, Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Schröder, Jürg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman,

Willy Verstraete & Korneel Rabaey, "Microbial fuel cells:
Methodology and Technology", Environmental science &
technology, vol. 40, nr. 17, 2006

1033432

Conclusies

1. Werkwijze voor het bepalen van de potentiële toxiciteit van een monsterstroom omfattende:

- 5 - het verschaffen van een aantal microbiële brandstofcellen omfattende een aantal kathodecompartimenten, voorzien van een kathode, een aantal anodecompartimenten, voorzien van een anode, welke anode en kathode elektrisch verbonden zijn, en waarbij in het anodecompartiment een
- 10 anodesubstraatfluïdum aanwezig is omfattende een oxideerbare verbinding die aan de anode kan worden geoxideerd, in het kathodecompartiment een kathodesubstraatfluïdum aanwezig is omfattende een reduceerbare verbinding die aan de kathode kan worden gereduceerd, op tenminste één van de anode of kathode
- 15 een elektrochemisch-actieve microbiële populatie aanwezig is die betrokken is bij de overdracht van elektronen naar de anode respectievelijk van de kathode en waarbij verder middelen aanwezig zijn voor het toevoeren van een monsterstroom aan tenminste een deel van de microbiële
- 20 populatie;
- het toevoeren van de monsterstroom aan tenminste een deel van de microbiële populatie;
- het bepalen van de potentiële toxiciteit van de monsterstroom aan de hand van een verandering in de metabole
- 25 activiteit van tenminste het deel van de microbiële populatie ten opzichte van een referentiemeting aan de hand van een verandering in de elektrische stroom die loopt tussen de kathode en de anode;
- met het kenmerk, dat** tenminste één van de anode of kathode
- 30 elektrisch verbonden is aan een referentie elektrode, de metabole activiteit van tenminste het deel van de microbiële populatie wordt bepaald aan de hand van de stroomsterkte van de elektrische stroom tussen de kathode en de anode, en dat

ten minste één van de aan een referentie elektrode verbonden anode respectievelijk kathode dusdanig potentiostatisch wordt geregeld op een geregelde potentiaal (V_p) ten opzichte van de referentie elektrode dat op enig moment wordt voldaan aan de voorwaarde $0 > V_e - V_p \geq x = -500$ mV voor een potentiostatisch geregelde anode en/of $0 < V_e - V_p \leq y = +200$ mV voor een potentiostatisch geregelde kathode, waarbij V_e de waarde is ten opzichte van de referentie elektrode van de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de potentiostatisch geregelde anode respectievelijk de waarde ten opzichte van de referentie elektrode van de evenwichtspotentiaal van de reductiereactie aan de potentiostatisch geregelde kathode.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij $x = -450$ mV, -400 mV, -350 mV, -300 mV, -250 mV, -200 mV, -150 mV, -100 mV, -90 mV, -80 mV, -70 mV, -60 mV, -50 mV, -40 mV, -30 mV, -20 mV, of -10 mV of $y = +150$ mV, $+100$ mV, $+90$ mV, $+80$ mV, $+70$ mV, $+60$ mV, $+50$ mV, $+40$ mV, $+30$ mV, $+20$ mV, of $+10$ mV.

3. Werkwijze volgens een der conclusies 1-2, waarbij ten minste één van de geregelde potentialen wordt gevarieerd in de tijd.

4. Werkwijze volgens een der conclusies 1-3, waarbij een veelvoud van microbiële brandstofcellen wordt verschaft en waarbij de geregelde potentialen van de anodes dan wel de kathodes op enig tijdstip verschillen van elkaar.

5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij een veelvoud van anodes is aangebracht in een enkel anodecompartiment.

6. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij een veelvoud van kathodes is aangebracht in een enkel kathodecompartiment.

7. Werkwijze volgens een der conclusies 1-6, waarbij de evenwichtspotential van de oxidatiereactie aan de potentiostatisch geregelde anode ligt tussen +100 tot -600 mV, bij voorkeur 0 tot -500 mV, met meer voorkeur -100 tot -500 mV, met de meeste voorkeur -200 tot -450 mV ten opzichte van een Ag/AgCl elektrode.

8. Werkwijze volgens een der conclusies 1-7, waarbij de evenwichtspotential van de reductiereactie aan de potentiostatisch geregelde kathode ligt tussen 0 tot +1000 mV, bij voorkeur +100 tot +800 mV, met meer voorkeur +200 tot +700 mV ten opzichte van een Ag/AgCl elektrode.

9. Werkwijze volgens een der conclusies 1-8, waarbij de microbiële populatie waaraan de monsterstroom wordt toegevoerd zich in het anodecompartiment bevind.

10. Werkwijze volgens een der conclusies 1-8, waarbij de microbiële populatie waaraan de monsterstroom wordt toegevoerd zich in het kathodecompartiment bevind.

11. Werkwijze volgens conclusie 9, waarbij de monsterstroom wordt gemengd met het anodesubstraatfluidum tot een anodemengsel en in het anodemengsel de oxideerbare verbinding in een dusdanige hoeveelheid aanwezig is dat de hoeveelheid oxideerbaar substraat niet beperkend is voor de metabole activiteit van de microbiële populatie.

12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarbij het anodesubstraatfluidum ten opzichte van de monsterstroom een overmaat van de oxideerbare verbinding bevat.

13. Werkwijze volgens conclusie 10, waarbij de monsterstroom wordt gemengd met het kathodesubstraatfluidum tot een kathodemengsel en in het kathodemengsel de reduceerbare verbinding in een dusdanige hoeveelheid aanwezig is dat de hoeveelheid reduceerbaar substraat niet beperkend is voor de metabole activiteit van de microbiële populatie.

14. Werkwijze volgens conclusie 13, waarbij het kathodesubstraatfluidum ten opzichte van de monsterstroom een overmaat van de reduceerbare verbinding bevat.

15. Apparaat, bij voorkeur een sensor, omvattende:

5 - een aantal microbiële brandstofcellen omvattende een aantal kathodecompartimenten, voorzien van een kathode, een aantal anodecompartimenten, voorzien van een anode, waarbij tenminste één van de anode of kathode geschikt is om een elektro-actieve microbiële populatie te huisvesten die
10 betrokken kan zijn bij een overdracht van elektronen naar een anode respectievelijk van een kathode;

- middelen voor het toevoeren van een monsterstroom aan tenminste een deel van de microbiële populatie;

- middelen voor het bepalen van een verandering in de
15 elektrische stroom die loopt tussen de kathode en de anode ten opzichte van een referentiemeting;

met het kenmerk, dat tenminste één van de anode of kathode elektrisch verbonden is aan een referentie elektrode, dat de inrichting verder middelen omvat voor het potentiostatisch
20 regelen op een geregelde potentiaal van ten minste één van de aan een referentie elektrode verbonden anode respectievelijk kathode en verder de middelen voor het bepalen van een verandering in de elektrische stroom tussen de kathode en de anode ten opzichte van een referentiemeting ingericht zijn
25 voor het bepalen van een verandering in de stroomsterkte van de elektrische stroom tussen de kathode en de anode.

16. Apparaat volgens conclusie 15, waarbij in het anodecompartiment een anodesubstraatfluidum aanwezig is omvattende een oxideerbare verbinding die aan de anode kan
30 worden geoxideerd, in het kathodecompartiment een kathodesubstraatfluidum aanwezig is omvattende een reduceerbare verbinding die aan de kathode kan worden gereduceerd en de middelen voor het potentiostatisch regelen

van ten minste één van de aan een referentie elektrode verbonden anode respectievelijk kathode ingericht zijn om de geregelde potentiaal op een dusdanige waarde te regelen dat op enig moment wordt voldaan aan de voorwaarde $0 > V_e - V_p \geq x =$
 5 -500 mV voor een potentiostatisch geregelde anode en/of $0 <$
 $V_e - V_p \leq y = +200$ mV voor een potentiostatisch geregelde
 kathode, waarbij V_e de waarde is ten opzichte van de referentie elektrode van de evenwichtspotentiaal van de oxidatiereactie aan de potentiostatisch geregelde anode
 10 respectievelijk de waarde ten opzichte van de referentie elektrode van de evenwichtspotentiaal van de reductiereactie aan de potentiostatisch geregelde kathode.

17. Apparaat volgens conclusie 15, waarbij $x = -450$ mV, -400 mV, -350 mV, -300 mV, -250 mV, -200 mV, -150 mV, $-$
 15 100 mV, -90 mV, -80 mV, -70 mV, -60 mV, -50 mV, -40 mV, -30
 mV, -20 mV, of -10 mV of $y = +150$ mV, $+100$ mV, $+90$ mV, $+80$
 mV, $+70$ mV, $+60$ mV, $+50$ mV, $+40$ mV, $+30$ mV, $+20$ mV, of $+10$
 mV.

18. Apparaat volgens een der conclusies 15-17,
 20 waarbij de middelen voor het potentiostatisch regelen van de anode dan wel de kathode ten opzichte van de referentie elektrode ingericht zijn om de geregelde potentiaal te variëren in de tijd.

19. Apparaat volgens een der conclusies 15-18,
 25 omvattende een veelvoud van microbiële brandstofcellen en waarbij de middelen voor het potentiostatisch regelen van de anodes dan wel kathodes ten opzichte van een referentie elektrodes ingericht zijn om de geregelde potentialen van de anodes respectievelijk kathodes op enig tijdstip te laten
 30 verschillen van elkaar.

20. Apparaat volgens conclusie 19, waarbij een veelvoud van anodes is aangebracht in een enkel anodecompartiment.

21. Apparaat volgens conclusie 19, waarbij een veelvoud van kathodes is aangebracht in een enkel kathodecompartiment.

22. Apparaat volgens een der conclusies 16-21, waarbij de evenwichtspotential van de oxidatiereactie aan de potentiostatisch geregelde anode ligt tussen +100 tot -600 mV, bij voorkeur 0 tot -500 mV, met meer voorkeur -100 tot -500 mV, met de meeste voorkeur -200 tot -450 mV ten opzichte van een Ag/AgCl elektrode.

23. Apparaat volgens een der conclusies 16-22, waarbij de evenwichtspotential van de reductiereactie aan de potentiostatisch geregelde kathode ligt tussen 0 tot +1000 mV, bij voorkeur +100 tot +800 mV, met meer voorkeur +200 tot +700 mV ten opzichte van een Ag/AgCl elektrode.

15

1033432

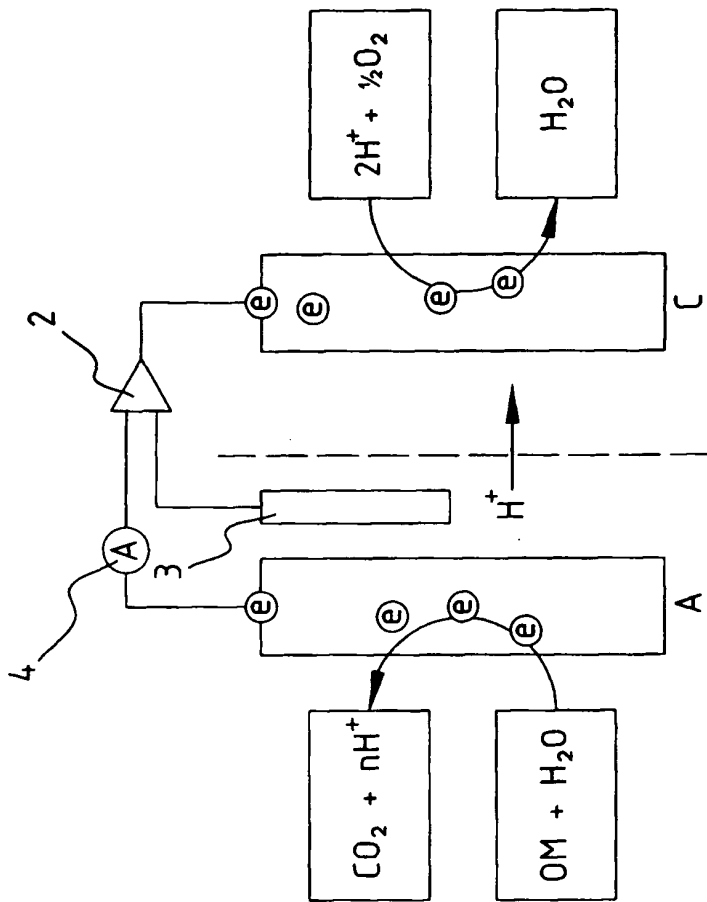


FIG. 1

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE 2S/2DO11/BW/6	
Nederlands aanvraag nr. 1033432	Indieningsdatum 20-02-2007	
	Ingeroepen voorrangdatum	
Aanvrager (Naam) Stichting Wetsus Centre for Sustainable Water Technology		
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type 29-03-2007	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 48193	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)		
Volgens de internationale classificatie (IPC) G01N33/18		
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK		
Onderzochte minimumdocumentatie		
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen	
IPC8	G01N	C12M
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen		
III.	GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES	(opmerkingen op aanvullingsblad)
IV.	GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING	(opmerkingen op aanvullingsblad)

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek
NL 1033432

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
INV. G01N33/18

Volgens de Internationale Classificatie van octrooen (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
G01N C12M

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het onderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)
EPO-Internal

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	WO 01/04626 A (KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY [KR]; KIM BYUNGHONG [KR]; CHANG INSEOP []) 18 januari 2001 (2001-01-18)	15-18, 22,23
Y	conclusies 1,2; figuur 4; voorbeeld 2	1-3,7-14
Y	WO 03/097861 A (KOREA BIOSYSTEMS CORP [KR]; KIM HYUNG JOO [KR]; CHOI DAE WON [KR]; HYU) 27 november 2003 (2003-11-27)	1-3,7-14
A	in de aanvraag genoemd bladzijde 3, regel 26 - bladzijde 4, regel 1; figuur 1	

Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

Leden van dezelfde octroofamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

A niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

D in de octrooiaanvraag vermeld

E eerdere octrooi(aanvraag), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

L om andere redenen vermelde literatuur

O niet-schriftelijke stand van de techniek

P tussen de voorrangdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

T na de indieningsdatum of de voorrangdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvraag, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

X de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

Y de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

& lid van dezelfde octroofamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid

31 Oktober 2007

Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Wilhelm, Jörg

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek
NL 1033432

C. (Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN		
Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	BERGEL ET AL: "Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm" ELECTROCHEMISTRY COMMUNICATION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, deel 7, nr. 9, september 2005 (2005-09), bladzijden 900-904, XP005032188 ISSN: 1388-2481 in de aanvraag genoemd	15-18, 22,23
A	figuur 1	1-14, 19-21
X	----- BOND DANIEL R ET AL: "Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY MAR 2003, deel 69, nr. 3, maart 2003 (2003-03), bladzijden 1548-1555, XP002457185 ISSN: 0099-2240 in de aanvraag genoemd	15-18, 22,23
A	bladzijde 1550, rechter kolom, alinea 2 -----	1-14, 19-21

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

NL 1033432

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 0104626	A	18-01-2001	AU 3460700 A 30-01-2001
			CA 2378580 A1 18-01-2001
			CN 1360677 A 24-07-2002
			EP 1236043 A1 04-09-2002
			JP 3557528 B2 25-08-2004
			JP 2003504621 T 04-02-2003
			KR 20010009030 A 05-02-2001
WO 03097861	A	27-11-2003	AU 2003224472 A1 02-12-2003
			CN 1646696 A 27-07-2005
			EP 1497451 A1 19-01-2005
			JP 2005521431 T 21-07-2005
			KR 20030084486 A 01-11-2003
			US 2005164331 A1 28-07-2005



File No. SN48193	Filing date (day/month/year) 20.02.2007	Priority date (day/month/year)	Application No. NL1033432
International Patent Classification (IPC) INV. G01N33/18			
Applicant Stichting Wetsus Centre for Sustainable Water Tech			

This opinion contains indications relating to the following items:

- Box No. I Basis of the opinion
- Box No. II Priority
- Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- Box No. IV Lack of unity of invention
- Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- Box No. VI Certain documents cited
- Box No. VII Certain defects in the application
- Box No. VIII Certain observations on the application

	Examiner Wilhelm, Jörg
--	---------------------------

WRITTEN OPINION**Box No. I Basis of this opinion**

1. This opinion has been established on the basis of the latest set of claims filed before the start of the search.
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - on paper
 - in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - contained in the application as filed.
 - filed together with the application in electronic form.
 - furnished subsequently for the purposes of search.
3. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes: Claims	1-14,19-21
	No: Claims	15-18,22,23
Inventive step	Yes: Claims	4-6,19-21
	No: Claims	1-3,7-18,22,23
Industrial applicability	Yes: Claims	1-23
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following documents:

D1: WO 01/04626 A (KOREA INST. SCI. TECHNOL.) 18 January 2001 (2001-01-18)

D2: WO 03/097861 A (KOREA BIOSYSTEMS CO.) 27 November 2003 (2003-11-27)

The document D1 discloses a microbial fuel cell comprising a cathode compartment (105) with a cathode (102) and an anode compartment (104) with an anode (101), wherein the anode (101) carries a population of microbes that can transfer electrodes to the anode. The device further comprises a sample introducing port (109), means for measuring the variation in current between anode and cathode ("recording unit"), and a potentiostat in combination with a reference electrode (113) for controlling the anode potential. All features of claim 15 are thus known from D1, the subject-matter of this claim is not new.

Document D2 discloses a method of testing the toxicity of a sample by introducing it into a microbial fuel cell (6), which comprises a cathode compartment with a cathode, and an anode compartment with an anode, and further comprises an electrochemically active microbial population. The toxicity of the sample is determined by exposing the microbial population to the sample and measuring the variation in current between anode and cathode, said current being determined by the metabolic activity of the microbial population.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as improving the precision of the measurement. The solution proposed in claim 1 of the present application, using a reference electrode and a potentiostat for keeping the anode potential constant, cannot be considered as involving an inventive step, because it has already been employed for the same purpose in a similar method, see D1.

Therefore, the skilled person would arrive at a method according to claim 1 when solving the above problem, and the subject-matter of this claim is not inventive.

Dependent claims 2, 3, 7-14, 16-18, 22 and 23 do not contain any features which, in combination with the features of an independent claim, meet the requirements of novelty and/or inventive step.

The combination of the features of dependent claims 4-6 and 19-21 is not disclosed or suggested by the available prior art.