

# **Stabilität und Leistungsfähigkeit von gezielt gezüchteten Biofilmen auf Anoden**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich  
genehmigte  
DISSERTATION  
von  
Kerstin Julia Dolch  
aus Villingen-Schwenningen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2014



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Zusammenfassung .....	1
I Einleitung .....	3
1 Mikrobielle Brennstoffzelle .....	3
1.1 Funktionsweise einer mikrobiellen Brennstoffzelle .....	4
1.2 Anwendungsmöglichkeiten .....	8
2 Exoelektrogene Organismen .....	14
2.1 Diversität der exoelektrogenen Mikroorganismen .....	15
2.2 Mechanismus der Atmung mit Eisen.....	18
3 Zielsetzung der Arbeit .....	25
II Material und Methoden .....	27
II.I Material .....	27
1 Bakterienstämme .....	27
2 Plasmide.....	29
3 Primer .....	30
4 Sonden .....	36
5 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	38
II.II Methoden.....	40
1 Anreicherung .....	40
2 Molekularbiologische Methoden .....	56
3 Agarose-Gelelektrophorese.....	80
4 Mikrobielle Brennstoffzellen .....	81

5 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	91
6 Mikroskopie .....	98
7 Analytische Methoden.....	100
III Ergebnisse .....	107
Teil I: Etablierung eines Charakterisierungsschemas für Elektrodenmaterialien .....	108
1 Etablierung eines gemeinsamen Mediums .....	108
2 Vergleich der Eisenreduktion und Stoffwechseleigenschaften von <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i> .....	110
3 Charakterisierungsschema für Elektrodenmaterialien mit <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i> .....	111
Teil II: Anwendung des Charakterisierungsschemas.....	118
1 Mikrobielle Brennstoffzellen mit einer Co-Kultur von <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i> .....	119
2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit <i>G. metallireducens</i> .....	122
3 Mikrobielle Brennstoffzellen mit <i>D. propionicus</i> .....	123
4 Vergleich der vier exoelektrogenen Mikroorganismen.....	125
Teil III: Anwendung der mikrobiellen Brennstoffzellen .....	126
1 Durchflusssystem.....	127
2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit Abwasser .....	129
IV Diskussion .....	139
Teil I: Etablierung eines Charakterisierungsschemas für Elektrodenmaterialien .....	140
1 Etablierung eines gemeinsamen Mediums .....	140
2 Vergleich der Eisenreduktion und Stoffwechseleigenschaften von <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i> .....	143
3 Charakterisierungsschema für Elektrodenmaterialien mit <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i> .....	144
4 Fazit Teil I .....	152

---

Teil II: Anwendung des Charakterisierungsschemas.....	152
1 Mikrobielle Brennstoffzellen mit einer Co-Kultur von <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i> .....	152
2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit <i>G. metallireducens</i> .....	153
3 Mikrobielle Brennstoffzellen mit <i>D. propionicus</i> .....	154
4 Vergleich der vier exoelektrogenen Mikroorganismen.....	155
5 Fazit von Teil II .....	156
Teil III: Anwendung der mikrobiellen Brennstoffzellen .....	157
1 Durchflusssystem.....	157
2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit Abwasser .....	158
3 Fazit Teil III .....	163
5 Literaturverzeichnis .....	165
Anhang .....	VII
1 Sequenzen der Barcodes .....	VII
1.1 <i>S. oneidensis</i> barcode .....	VII
1.2 <i>G. sulfurreducens</i> barcode .....	VII
1.3 <i>G. metallireducens</i> barcode .....	VIII
1.4 <i>E. coli</i> barcode .....	IX
2 Liste der Publikationen und Manuskripte .....	XI
3 Publikationen und Manuskripte.....	XII
4 Danksagung .....	XLVI



---

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
C <sub>q</sub>	engl. <i>cycle of quantification</i> - Zyklusanzahl der Quantifizierung
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FMN	Flavinmononukleotid
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i> - Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LOD	engl. <i>limit of detection</i> – Limit der Detektion
MADN	engl. <i>normalized median of absolute deviation</i> – normalisierter Median der absoluten Abweichung
NHE	engl. <i>normal hydrogen electrode</i> – Normal-Wasserstoff-Elektrode
OD	optische Dichte
qPCR	quantitative PCR
RT	Raumtemperatur
SD	engl. <i>standard deviation</i> - Standardabweichung
TOC	engl. <i>total organic carbon</i> - totaler organischer Kohlenstoff



## Zusammenfassung

Mit dem beschlossenen Atomausstieg im Jahr 2022 stellt sich die Frage, wie die Energieversorgung, ohne die Bedürfnisse der in der Zukunft lebenden Menschen zu beeinträchtigen, aufrecht erhalten werden kann. Daher sind nachhaltige und innovative Konzepte gefragt, die zum einen Strom aus erneuerbaren Quellen liefern und zum anderen den Stromverbrauch verringern. Ein solcher Ansatz ist die Integration einer mikrobiellen Brennstoffzelle in ein Klärwerk.

Die Funktionsweise einer mikrobiellen Brennstoffzelle beruht auf der Oxidation von organischem Kohlenstoff an der Anode und der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser an der Kathode. Dabei fungieren Mikroorganismen als Biokatalysatoren an der Anode. Diese Mikroorganismen können unter anoxischen Bedingungen leben und haben die Fähigkeit, die bei den Stoffwechselfvorgängen anfallenden Elektronen auf unlösliche Elektronenakzeptoren wie Eisen(III)-Oxide zu übertragen. Anstelle des Eisen(III)-Oxids kann eine Anode aus Graphit als terminaler Elektronenakzeptor dienen und die Elektronen aufnehmen. Organismen, die Elektronen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren übertragen können, werden als exoelektrogen bezeichnet und haben eine verlängerte respiratorische Elektronentransferkette, mit der die Elektronen vom Cytoplasma auf die Zelloberfläche transportiert werden. Der terminale Elektronentransfer auf den unlöslichen Elektronenakzeptor erfolgt entweder durch direkten Kontakt, per Elektronenshuttle oder per leitfähiger Zellanhänge (sogenannter Nanowires).

Zwei Modellorganismen für exoelektrogene Lebensweise sind *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens*. Während *S. oneidensis* durch direkten Kontakt mit der Anode oder über Sekretion von Shuttlen die Elektronen übertragen kann, braucht *G. sulfurreducens* den direkten Kontakt, kann dafür aber mehrschichtige und leitfähige Biofilme auf der Anode bilden.

Im ersten Schritt wurde ein Charakterisierungsschema für den quantitativen Vergleich von Elektrodenmaterialien mit *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* etabliert. Dabei konnte eine nicht lineare Abhängigkeit der Konditionierungszeit, der Stromdichte und der sessilen Zellzahl von der spezifischen Oberfläche des Elektrodenmaterials festgestellt

werden. Unabhängig vom Material konnte eine bessere Leistung von *G. sulfurreducens* im Vergleich zu *S. oneidensis* gezeigt werden. Bei der Co-Kultivierung der beiden Stämme in mikrobiellen Brennstoffzellen zeigte das Graphitvlies einen synergistischen Effekt in Bezug auf die Anodenpopulation. Elf Mal so viele sessile *S. oneidensis* Zellen und 1,7 Mal so viele sessile *G. sulfurreducens* Zellen wurden im Vergleich zu den Reinkultur-Brennstoffzellen auf den Anodenoberflächen detektiert. Mit dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 konnte kein synergistischer Effekt beobachtet werden.

Bei der Anwendung des Charakterisierungsschemas mit *G. metallireducens* konnte gezeigt werden, dass der Organismus durch Sauerstoff im Anodenraum inhibiert wird und nur 37% der Stromdichte von *G. sulfurreducens* erreichte. Bei mikrobiellen Brennstoffzellen mit *D. propionicus* konnte gezeigt werden, dass anaerobe Atmung und Gärung gleichzeitig stattfanden.

Daher wurde ein Biofilm bestehend aus *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens* und *G. metallireducens* auf Graphitvlies als Anode gezüchtet, bevor anschließend ein Durchflusssystem gestartet wurde. Nach sieben Tage bestand die Anodenpopulation zu  $7,6 \pm 2,6\%$  (SD) aus *S. oneidensis*, zu  $92,1 \pm 2,5\%$  (SD) aus *G. sulfurreducens* und zu  $0,3 \pm 0,3\%$  (SD) aus *G. metallireducens* Zellen. Die Stromdichte lag bei  $0,729 \pm 0,022 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD).

Ein solcher Anoden-Biofilm wurde anschließend in mikrobiellen Brennstoffzellen mit synthetischem Abwasser als Substrat und 1% Klärschlamm verwendet und die Leistung dieser Brennstoffzellen mit der von Kontroll-Brennstoffzellen ohne vorinkubierten Anoden verglichen. Die mikrobiellen Brennstoffzellen erreichten mit nicht-vorinkubierten Anoden eine 5,5fach höhere Stromdichte und 2,7fach höhere Coulomb Effizienz als die mit vorinkubierten Anoden. Jedoch akkumulierte der organische Kohlenstoff in den mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden doppelt so hoch. Dabei waren in den mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierter Anode von der anfänglichen Populationsdichte noch 10,5% an *S. oneidensis*, 61,5% an *G. sulfurreducens* und 17,9% an *G. metallireducens* Zellen detektierbar.

## I Einleitung

Ein Leben ohne elektrische Energie ist für uns heute nicht mehr vorstellbar. Es ist selbstverständlich, dass per Schalter jeder Raum die gewünschte Helligkeit und Temperatur bekommt. Gleichzeitig nimmt das Bewusstsein der Menschen bezüglich der Endlichkeit der verfügbaren Ressourcen jedoch zu. Auch werden die erheblichen Risiken, die durch das Betreiben von Kohle- und Kernkraftwerken für die Umwelt bestehen, immer deutlicher erkannt. Die Nutzung erneuerbarer Energietechnologien wie Windkraftanlagen, Staudämme und Solaranlagen verspricht zwar eine teilweise Verbesserung der Situation, bringt gleichwohl auch Nachteile mit sich, wie z. B. Lärmemission oder einen enormen Flächenbedarf. Außerdem sind diese Formen der Energiegewinnung abhängig von äußeren Bedingungen wie Wind, Regen und Sonnendauer. Daher ist es notwendig, alternative Energiequellen zu finden und die vorhandenen weiter zu entwickeln. Ein relativ neuer, vielversprechender Ansatz ist der Einsatz von mikrobiellen Brennstoffzellen in einem Klärwerk,

### 1 Mikrobielle Brennstoffzelle

Als 1911 M. Potter, Professor für Botanik an der Universität von Durham, eine Veröffentlichung über die Verwendung einer galvanischen Zelle mit *E. coli* zur Stromgewinnung vorlegte (Potter, 1911), war das Interesse daran sehr gering. Auch in den darauf folgenden Jahren änderte sich dies kaum. Die nächste Veröffentlichung war erst 1930, als die erste Halbzelle vorgestellt wurde (Cohen, 1930). In den 60er Jahren des 20. Jahrhundert änderte sich dies leicht mit der Erkenntnis, dass durch den zusätzlichen Einsatz von Methylenblau in einer mikrobiellen Brennstoffzelle Strom produziert werden kann (Davis & Yarbrough, 1962).

Erst mit dem Beginn des 21. Jahrhunderts änderte sich das Interesse an mikrobiellen Brennstoffzellen grundlegend. Eine Schlüsselfunktion spielte dabei die Arbeit von Kim *et al.*, in der gezeigt wurde, dass *Shewanella oneidensis* ohne Zusatz von Elektronenschutteln Elektronen auf die Anode einer Brennstoffzelle übertragen kann (Kim *et al.*, 1999). Indikatoren dieses Interessenwandels sind z. B. der Anstieg an Publikationen (Schröder, 2012) oder die Gründung neuer Forschungsgruppen weltweit,

die sich intensiv mit der Erforschung von mikrobiellen Brennstoffzellen beschäftigen. Fast jede Arbeitsgruppe hat jedoch ihre eigenen Brennstoffzellaufbauten entwickelt und betreibt diese unter ihren eigenen Laborstandards, was eine Schwierigkeit dieser rasanten Interessenszunahme darstellt. Dies macht einen quantitativen Vergleich der Leistungen schier unmöglich. Doch aus wirtschaftlichen Gründen ist es wichtig zu wissen, wo noch Optimierungsbedarf besteht und was sich bereits bewährt hat (Logan *et al.*, 2006). Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit ein Charakterisierungsschema für den quantitativen Vergleich von Elektrodenmaterialien in mikrobiellen Brennstoffzellen etabliert werden.

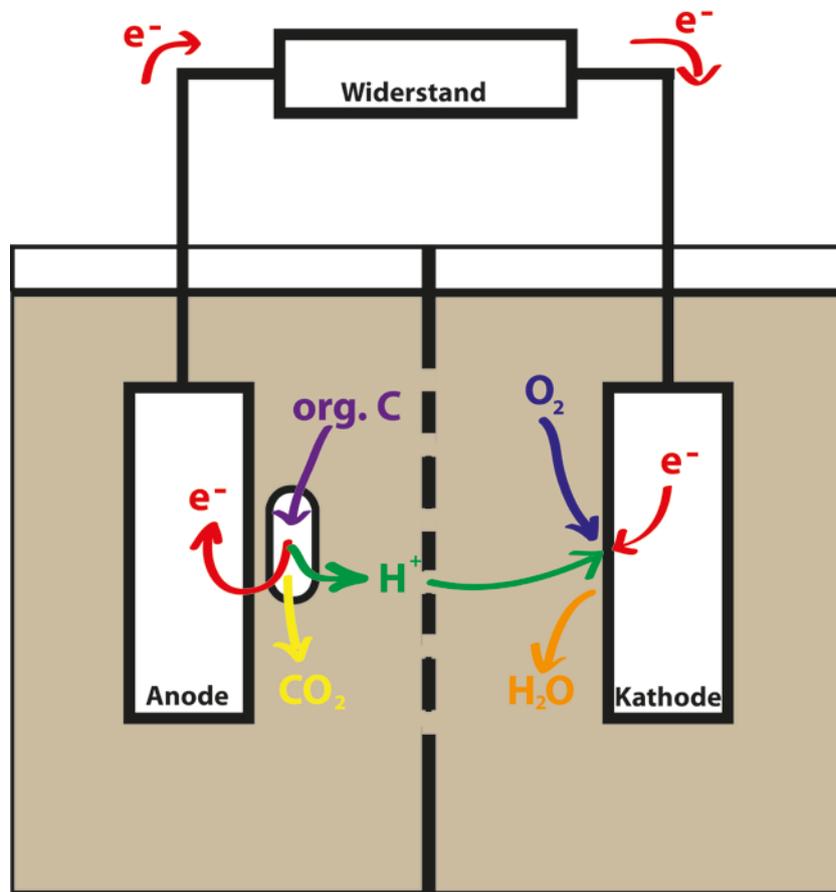
### **1.1 Funktionsweise einer mikrobiellen Brennstoffzelle**

Das Prinzip einer mikrobiellen Brennstoffzelle beruht darauf, dass auf die Arbeitselektrode (Anode) Elektronen übertragen werden, die durch einen elektrischen Widerstand zur Gegenelektrode (Kathode) fließen und dort zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser verwendet werden. Gleichzeitig werden dafür an der Kathode Protonen benötigt, die an der Anode frei werden, und zur Kathode gelangen müssen. Daher werden die beiden Elektrodenräume durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt (Abb. 1). Im Folgenden werden die einzelnen Bauteile genauer beschrieben.

#### **1.1.1 Anode**

An der Anode werden in mikrobiellen Brennstoffzellen die Elektronen durch Bakterien bereitgestellt, die durch die Oxidation von Kohlenstoffverbindungen die anfallenden Elektronen auf einen unlöslichen Elektronenakzeptor übertragen können. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie Bakterien die Übertragung umsetzen können, was unter 2.2 genauer erörtert wird. Eine Gemeinsamkeit ist jedoch die Notwendigkeit von anoxischen Bedingungen. Daher gibt es zwei wichtige Voraussetzungen: Erstens muss der Anodenraum sauerstofffrei und zweitens das Anodenmaterial kompatibel mit den Mikroorganismen sein. Dies bedeutet, es darf weder aus toxischen Materialien bestehen noch durch die Bakterien in Langzeitversuchen zersetzt werden. Außerdem ist eine hohe und raue Oberfläche von Vorteil, da die Bakterien dann besser einen Biofilm bilden können. Inerte Metalle wie Platin und Titan haben sich in der Vergangenheit als gute Elektrodenmaterialien bewiesen, allerdings sind sie sehr teuer (Kumar *et al.*, 2013). Ein

wesentlicher Aspekt der Forschung an mikrobiellen Brennstoffzellen ist deshalb die Entwicklung und Charakterisierung günstiger Elektrodenmaterialien für Anoden und Kathoden.

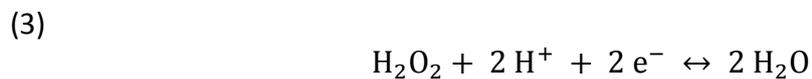
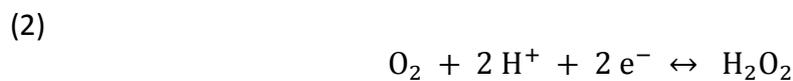
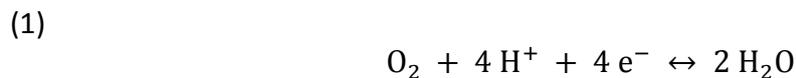


**Abb. 1: Schematische Funktionsweise einer mikrobiellen Brennstoffzelle.** An der Anode wird von Mikroorganismen organischer Kohlenstoff ( $\text{org. C}$ ) zu  $\text{CO}_2$ , Elektronen ( $e^-$ ) und Protonen ( $\text{H}^+$ ) oxidiert. An der Kathode wird der Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) mit den Elektronen und den Protonen zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) reduziert.

### 1.1.2 Kathode

An der Kathode findet die Reduktion von Sauerstoff statt. Dies ist eine langsam ablaufende Reaktion, die allerdings durch den Einsatz von teuren Edelmetallen beschleunigt werden kann. Eine langsame Reaktion ist aber durchaus sinnvoll. Wäre die Reduktion von Sauerstoff schnell und unabhängig von Katalysatoren, dann würde alles an Luft korrodieren. Als Folge würde es einen hohen oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffradikale geben und alles würde schneller Altern und Sterben – auch wir Menschen.

Die Beschleunigung der Reduktion von Sauerstoff kann entweder auf chemischen, enzymatischen oder mikrobiologischen Weg erreicht werden. Beim chemischen Weg hat sich Platin als Katalysator bewährt. Durch die hohen Kosten von Platin wurden auch andere Materialien wie Graphit getestet. Während es bei Platin zu einem 4-Elektronentransfer (1) kommt, kann an Graphit der Peroxid-Weg mit Wasserstoffperoxid als Zwischenprodukt (2) gefunden werden. Das Wasserstoffperoxid kann auf zwei unterschiedliche Wege weiter zu Wasser reduziert werden (3 + 4) (Erable *et al.*, 2012).



Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung einer luftatmenden Kathode. Dabei hat die Kathode auf der einen Seite direkten Kontakt mit der semipermeablen Membran und auf der anderen Seite mit Luft. Dies hat zum Vorteil, dass der Weg zwischen Anode und Kathode minimiert werden kann und damit Spannungsverluste verringert werden. Da keine Kathodenflüssigkeit verwendet wird, kann es zum einen nicht zu einer Alkalisierung der Kathode kommen und dadurch verminderter Leistung der mikrobiellen Brennstoffzelle. Zum anderen ist die geringe Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser nicht mehr limitierend und die Energiekosten sind niedriger, da nicht mehr aktiv begast werden muss (Erable *et al.*, 2012). Bisher wurde in Luft-atmenden Kathoden als Katalysator Platin verwendet. Eine kostengünstigere Alternative ist dagegen Nickel (Szöllósi *et al.*, 2014).

Bei der enzymatischen Reduktion von Sauerstoff werden Oxidoreduktasen wie Lakkase oder Bilirubin Oxidase eingesetzt. Lakkase wird z. B. von *Trametes versicolor* produziert und hat ein ähnlich hohes Redoxpotential wie  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ . Die Limitierung dieser Möglichkeit zur verbesserten Sauerstoffreduktion ist jedoch die kurze Halbwertszeit der Enzyme (Lapinsonnière *et al.*, 2012).

Im Gegensatz dazu ist der Einsatz einer mikrobiologischen Sauerstoffreduktion an der Kathode ein vielversprechender Ansatz für Langzeitversuche, da Bakterien sich selbst erneuern. Einige Studien zeigen die Möglichkeit einer Biofilmbildung an der Kathode. Diese Bakterien sind in der Lage, die Elektronen von der Kathode aufzunehmen und zur Reduktion von Sauerstoff zu verwenden (Erable *et al.*, 2012). Dadurch kann eine Leistungssteigerung der Brennstoffzelle bewirkt werden. Bisher sind jedoch noch nicht viele Bakterienstämme auf ihre Fähigkeit, von der Kathode Elektronen anzunehmen und damit Sauerstoff zu reduzieren, untersucht worden. Ein Bakterienstamm, der dies kann, ist *Shewanella loihica* PV-4, der durch Biofilmbildung und Produktion von Flavin die Reduktion von Sauerstoff an der Kathode katalysiert (Liu *et al.*, 2012). Für Flavin konnte eine Redox-Bifurikation gezeigt werden, die es ermöglicht, dass Flavin zum einen in der Lage ist Elektronen auf eine Anode (-0,1 V vs. NHE) abzugeben und auch Elektronen von einer Kathode (-0,4 V vs. NHE) aufzunehmen. Dies entspricht einer Veränderung des Redoxpotentials von 300 mV (Okamoto *et al.*, 2014a). Dennoch sind noch umfangreiche Forschungsarbeiten nötig, bis diese Art der Sauerstoffreduktion an einer Kathode zum Einsatz kommen kann.

### **1.1.3 Semipermeable Membran**

Das letzte wichtige Bauteil ist die semipermeable Membran. Eine ideale Membran wäre nur für Protonen durchlässig und ließe weder Sauerstoff noch Hydroxid-Ionen durch. Doch dies ist in der Praxis nicht verwirklichtbar. Es gibt allerdings einen kausalen Zusammenhang zwischen Durchlässigkeit der Membran für Protonen und Leistung der mikrobiellen Brennstoffzelle. Denn wenn die Protonen schneller an die Kathode gelangen, kann an dieser mehr Sauerstoff reduziert werden und damit werden mehr Elektronen verbraucht. Daher wäre eine gut durchlässige Membran optimal. Der Nachteil ist aber, dass dann auch mehr Sauerstoff durchgelassen wird und dadurch die Coulomb Effizienz abnimmt, da das Substrat mit Sauerstoff oxidiert wird (Zhang *et al.*, 2010). Dieses Problem besteht auch bei dem Ansatz eine mikrobielle Brennstoffzelle ohne Membran zu bauen. Diese Aufbauten zeigten zwar mehr Leistung, jedoch auch eine geringere Coulomb Effizienz (Liu *et al.*, 2004). Des Weiteren ist dieser Aufbau nur für Brennstoffzellen mit Sauerstoff-toleranten Organismen geeignet.

Die häufigste Membran ist eine Protonentauscher-Membran, die nur für Protonen durchlässig ist. Eine weitere Membran ist eine Anionentauscher-Membranen, bei der die Hydroxid-Ionen von der Kathode zur Anode wandern. Da aber bei der Verwendung eines mikrobiellen Konsortiums auf der Anode ein Absinken des pH-Werts zum Absterben der Bakterien führen kann, wird diese Art der Membran nicht häufig eingesetzt. Die Verwendung einer Bipolar-Membran hingegen sollte ein Gleichgewicht zwischen der Anode, an der Protonen entstehen, und der Kathode, an der Hydroxid-Ionen entstehen, bewirken. Im Rahmen einer Bachelorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Protonentauscher-Membran in mikrobiellen Brennstoffzellen am effektivsten ist (Bär, 2014).

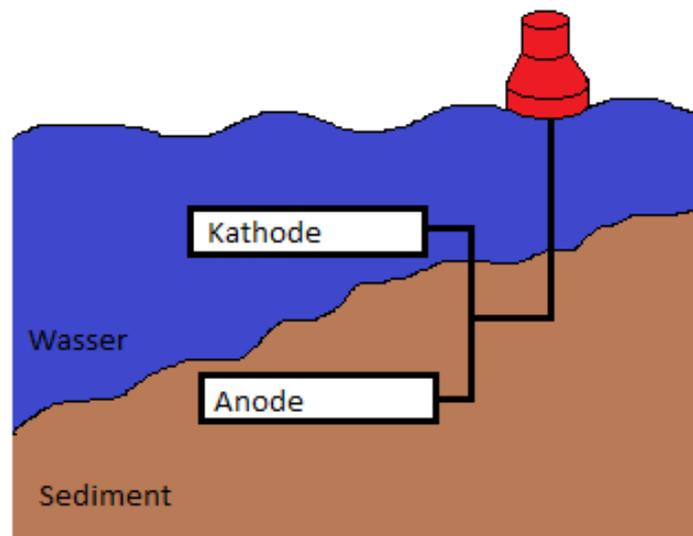
### **1.2 Anwendungsmöglichkeiten**

So hoch wie die Variabilität der Materialien für Anode, Kathode und Membran in mikrobiellen Brennstoffzellen ist, so sind entsprechend die Möglichkeiten mikrobielle Brennstoffzellen zu verwenden. Während ein paar der Ideen bereits in der Praxis zum Einsatz kamen, sind viele Techniken noch nicht fertig ausgereift und werden bisher nur in Laboren getestet. Im Folgenden werden exemplarisch ein paar der Anwendungsbereiche kurz vorgestellt.

#### **1.2.1 Mikrobielle Brennstoffzelle im Sediment**

Eine bereits in der Praxis erprobte, mikrobielle Brennstoffzelle ist die mikrobielle Brennstoffzelle im Sediment (Tender *et al.*, 2008). Dabei wird die Anode in das Sediment eines Sees oder Meers eingebracht, in dem es organisches Substrat gibt, das von den dort natürlich vorkommenden Mikroorganismen oxidiert werden kann. Die Anode dient dabei als Elektronenakzeptor. Die Kathode hingegen befindet sich im sauerstoffhaltigen Wasser und an ihr läuft die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser ab (Bond *et al.*, 2002) (Abb. 2). Eine der installierten Meerwasser-Brennstoffzellen konnte ungefähr 36 mW Leistung erbringen, was über ein Jahr gerechnet 26 alkalinen D-Batterien entspricht. Dies reichte aus, um die Lufttemperatur, den Druck, die relative Luftfeuchtigkeit und die Wassertemperatur zu messen und die Daten zu übertragen. Der größte Vorteil einer mikrobiellen Brennstoffzelle im Sediment ist ihre Langlebigkeit und geringere

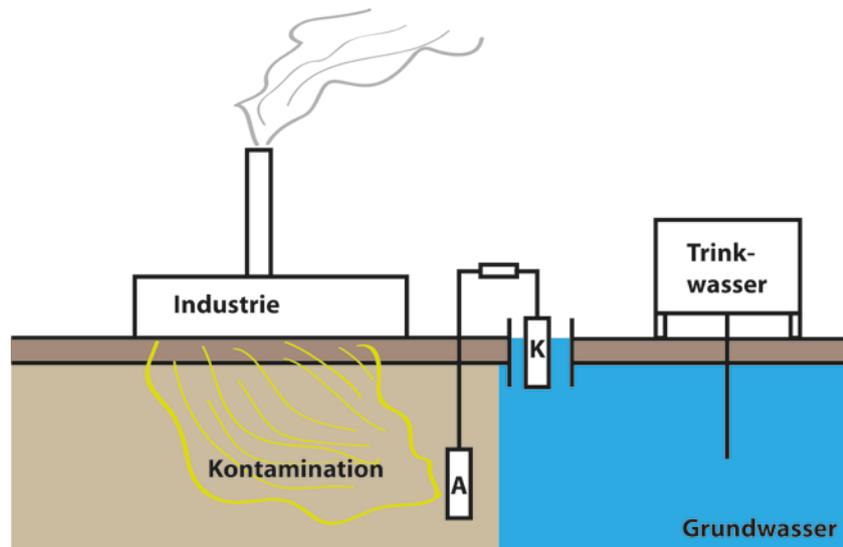
Wartungsintensität im Vergleich zu Batterie-betriebenen Messstationen (Tender *et al.*, 2008).



**Abb. 2: Mikrobielle Brennstoffzelle im Sediment.** Die Anode ist im anoxischen Sediment installiert und elektrisch mit einer Kathode verbunden, die im oxischen Wasser liegt. Durch die Oxidation von organischem Kohlenstoff im Sediment durch Bakterien kann Strom generiert werden, mit dem eine offshore Messboje (rot) betrieben werden kann.

### 1.2.2 Mikrobielle Brennstoffzelle für die Bioremediation

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist der Einsatz der mikrobiellen Brennstoffzelle in der Bioremediation. Dabei wird ausgenutzt, dass Bakterien wie *Geobacter metallireducens* organische Kohlenstoffverbindungen wie Toluol verstoffwechseln können (Aklujkar *et al.*, 2009) und natürlich im Boden vorkommen. Nach z. B. einer Erdölkontamination besteht die Gefahr, dass das Erdöl ins Grundwasser gelangt und dieses dann nicht mehr als Trinkwasser verwendet werden kann. Durch die Integration von Elektroden in die verseuchte Erde kann der Abbau beschleunigt werden, indem die Bakterien einen zusätzlichen Elektronenakzeptor (Anode) erhalten. Im besten Fall bleibt das Grundwasser vom Erdöl verschont (Lovley, 2006) (Abb. 3).



**Abb. 3: Mikrobielle Brennstoffzelle für die Bioremediation.** Nach einer Erdölkontamination kann eine mikrobielle Brennstoffzelle in den Boden installiert werden, so dass natürlich vorkommende Organismen, die das Erdöl abbauen können, einen zusätzlichen Elektronenakzeptor (Anode - A) erhalten. An der Kathode (K) findet wie bisher die Reduktion von in Wasser gelöstem Sauerstoff statt.

### 1.2.3 Mikrobielle Brennstoffzelle in der Grundlagenforschung

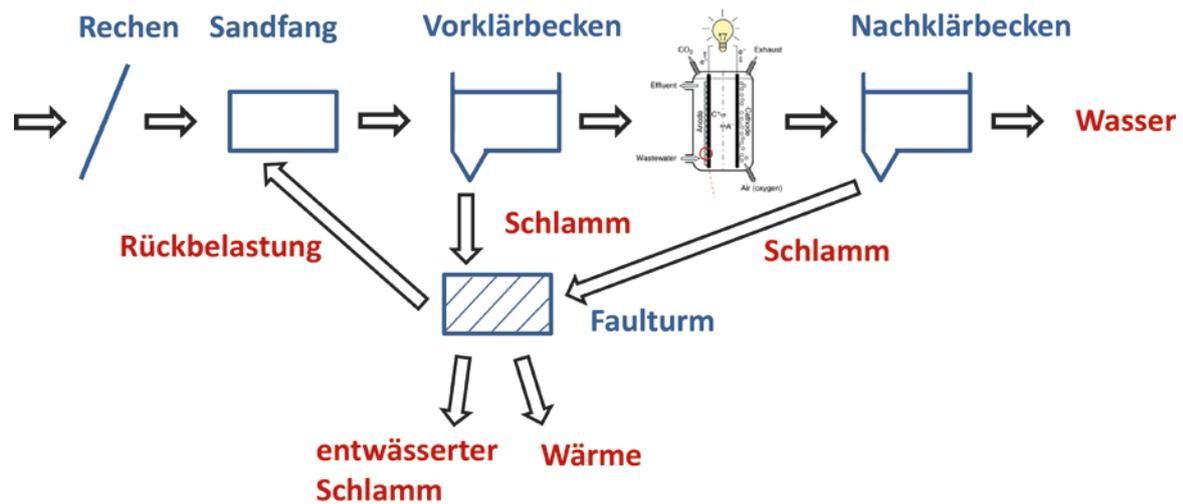
Ein weiteres großes Anwendungsgebiet ist die mikrobielle Brennstoffzelle in der Grundlagenforschung. Dabei steht die Optimierung der Leistung der mikrobiellen Brennstoffzelle im Vordergrund, die auf unterschiedlichsten Wegen erreicht werden kann. Ein Ansatzpunkt dabei ist die Identifizierung und Charakterisierung von neuen exoelektrogenen Bakterienstämmen, die noch leistungsstärker sind. Ein weiterer ist die Aufklärung des Elektronentransfers bei bereits bekannten Organismen, um durch gezielte genetische Manipulation zu einer Leistungssteigerung zu kommen. Beide Ansätze setzen jedoch ein Wissen über Elektrodenmaterialien voraus. Daher ist es wichtig neue Elektrodenmaterialien zu entwickeln und gleichzeitig auch zu testen, wie die Interaktion zwischen Mikroorganismus und Elektrodenmaterial ist. Durch den Einsatz von kostengünstigeren Materialien kann wiederum die Anwendung von mikrobiellen Brennstoffzellen zur Gewinnung von Energie und zum Abbau von organischen Kohlenstoffverbindungen wirtschaftlich rentabler werden.

Um eine hohe Durchsatzrate für Bakterienstämme und Elektrodenmaterial mit geringen Kosten im Labor zu haben, hat sich der Einsatz von kleinen Aufbauten in hoher Stückzahl als hilfreich gezeigt (Call & Logan, 2011a).

#### **1.2.4 Mikrobielle Brennstoffzelle im Abwasser**

Ein vielversprechender Einsatzbereich ist die mikrobielle Brennstoffzelle im Abwasser. In Kombination mit den bereits vorhandenen anaeroben Verfahren für die Behandlung von Abwasser soll die mikrobielle Brennstoffzelle als Ergänzung dienen (Sievers *et al.*, 2010). Denn während es bei den anderen anaeroben Verfahren wie der Schlammverbrennung oder dem Faulturm wichtig ist, dass eine hohe organische Kohlenstoff-Konzentration vorliegt, ist dies bei mikrobiellen Brennstoffzellen nicht nötig (Di Lorenzo *et al.*, 2009). Dabei muss unterschieden werden, ob die mikrobielle Brennstoffzelle in Industrieabwasser, wie von einer Brauerei, betrieben werden soll oder in einem Klärwerk. Der Hauptunterschied ist die Zusammensetzung der Abwässer. Während die Kohlenstoffbelastung in Industrieabwasser um einiges höher und gleichbleibender ist als in einem Haushaltsabwasser, kommt es bei letzteren bedingt durch Niederschläge und Tag-Nacht-Rhythmus zu Schwankungen. In beiden Fällen ist das organische Substrat für die Mikroorganismen kostenlos und ausreichend vorhanden. Der Einsatz einer mikrobiellen Brennstoffzelle in einem Klärwerk verspricht jedoch nicht nur die Gewinnung von Energie, sondern auch gleichzeitig das Einsparen von Energie bei der Reinigung des Abwassers und führt somit zu geringeren Betriebskosten.

Die Reinigung von Abwasser in einem Klärwerk erfolgt mehrstufig und eine vereinfachte schematische Zeichnung ist in Abbildung 4 zu sehen. Nach der Beseitigung von Grobstoffen, erfolgt die Oxidation des organischen Kohlenstoffs durch Bakterien. Die erste biologische Reinigung des Abwassers findet unter anoxischen Bedingungen im Vorklärbecken statt, in dem auch gleichzeitig die Denitrifikation abläuft. Dabei werden die höher molekularen Kohlenstoffverbindungen vergoren. Im Nachklärbecken erfolgt die zweite biologische Reinigung unter oxischen Bedingungen. Dabei muss aktiv mit Sauerstoff begast werden, was mit hohen Stromkosten verbunden ist (16 -28 kWh pro Einwohner pro Jahr) (Sievers *et al.*, 2010). Bei der zweiten biologischen Reinigung werden niedermolekulare Kohlenstoffverbindungen zu CO<sub>2</sub> oxidiert und somit die Konzentration von organischem Kohlenstoff im Wasser minimiert. Bei der aeroben



**Abb. 4: Mikrobielle Brennstoffzelle im Klärwerk.** Eine mögliche Installation einer mikrobiellen Brennstoffzelle in einem Klärwerk ist sinnvoll, nachdem grobe Abfallstoffe mittels Rechen zurückgehalten wurden und sich im Sandfang Sand und Kies abgesetzt hat. Anschließend beginnt im Vorklärbecken unter anoxischen Bedingungen die Vergärung der organischen Kohlenstoffverbindungen. Die Produkte davon können in der mikrobiellen Brennstoffzelle dann als Substrat dienen, bevor im Nachklärbecken der Schlamm vom Wasser getrennt wird. Der angefallene Schlamm wird im Faulturn zur Gewinnung von Wärme genutzt. Der entwässerte Schlamm kann entweder getrocknet und verbrannt werden oder als Düngemittel eingesetzt werden. Vom Faulturn gibt es eine Rückbelastung in den Sandfang, um die Wassermenge und Mikroorganismenkulturen aufrecht zu erhalten.

Oxidation des organischen Kohlenstoffs durch Mikroorganismen fällt allerdings viel Biomasse an, die ständig beseitigt werden muss. Eine Möglichkeit ist die Gewinnung von Energie durch Methanogenese im Faulturn, dies lohnt sich aber nur in großen Klärwerken, in denen sehr viel Schlamm anfällt. Bei kleineren Klärwerken ist dies nicht rentabel. Daher wird dort der Schlamm getrocknet, bevor er anschließend verbrannt wird. Dabei wird die bei der Verbrennung gewonnene Energie für das Trocknen des Schlamms benötigt. Somit wird netto gesehen keine Energie produziert.

Ein großer Vorteil der Installation einer mikrobiellen Brennstoffzelle im Klärwerk ist daher, dass unter anoxischen Bedingungen im Vergleich zu oxischen Stoffwechselforgängen weniger Biomasse entsteht (Franks & Nevin, 2010). Als Folge würden weniger Kosten durch die Beseitigung des Klärschlamms anfallen.

Unabhängig wie das Abwasser gereinigt wird, ist ein wichtiger Kennwert dabei der Gehalt an totalem organischem Kohlenstoff (engl. *total organic carbon* – TOC). Zu Beginn ist der Wert im Abwasser sehr hoch. Es sind hauptsächlich Proteine, Kohlenhydrate und

Lipide vorhanden, die von hydrolytischen Organismen zu Oligopeptiden, Aminosäuren, Oligo- und Monosacchariden, Glycerol und langkettige Fettsäuren verstoffwechselt werden. Diese Stoffe können von Gärern in kurze Fettsäuren, organische Säuren und Wasserstoff umgesetzt werden (Kong *et al.*, 2008). Diese organischen Säuren und der Wasserstoff können nun als Substrat für die Bakterien in der mikrobiellen Brennstoffzelle dienen. Gleichzeitig aber gibt es auch im Abwasser eine hohe Anzahl an methanogenen Organismen (Kim *et al.*, 2005), die zum einen Acetat (acetoklastische Methanogene) und zum anderen Wasserstoff und CO<sub>2</sub> (hydrogenotrophe Methanogene) in Methan umsetzen können. Da Methan ein Treibhausgas ist, ist seine Produktion nicht erwünscht. Allerdings ist die Affinität der acetoklastischen methanogenen Organismen für Acetat gering (Parameswaran *et al.*, 2009). Die Methanproduktion sollte somit keinen allzu großen Einfluss haben, wenn das Acetat nicht in den mikrobiellen Brennstoffzellen angehäuft wird. Folgerichtig konnten Jung und Regan zeigen, dass bei einer hohen Stromproduktion in einer mikrobiellen Brennstoffzelle und damit einer hohen Oxidationsrate für organischen Kohlenstoff, acetoklastische Methanogene verdrängt wurden (Jung & Regan, 2011).

Die Bildung von Methan in mikrobiellen Brennstoffzellen stellt somit eine Elektronensenke dar, da die Elektronen aus Acetat anstatt auf die Anode abgegeben in Methan gespeichert werden. Ein wichtiger Wert für den Vergleich von mikrobiellen Brennstoffzellen ist daher die Coulomb Effizienz. Sie drückt aus, wie hoch der Anteil der Elektronen, die auf die Anode übertragen werden, im Verhältnis zu der maximal erreichbaren Elektronenausbeute ist (Logan *et al.*, 2006). Bei mikrobiellen Brennstoffzellen, die mit Acetat und Klärschlamm betrieben werden, ist die Coulomb Effizienz meist höher als wenn mit natürlichem Abwasser gemessen wird (Hays *et al.*, 2011; Logan, 2012). Dies liegt vermutlich an schwerabbaubaren Kohlenstoffverbindungen des Abwassers, die in mikrobiellen Brennstoffzellen nicht einfach oxidiert werden können. Ein weiteres Problem wurde bereits bei der Auswahl der semipermeablen Membran angesprochen. Durch die Diffusion von Sauerstoff von der Kathodenkammer in die Anodenkammer kommt es zu einer Verringerung der Coulomb Effizienz, da die Organismen meist eine höhere Affinität für Sauerstoff als für die Anode haben und daher Elektronen auf Sauerstoff übertragen anstatt auf die Anode. Neben Methan ist daher auch Sauerstoff eine Elektronensenke.

Nichtsdestotrotz wurden in den letzten Jahren vermehrt Studien über die Produktion von Energie durch mikrobielle Brennstoffzelle mit Abwasser publiziert. Zwei dieser sehr anwendungsorientierten Veröffentlichungen sollen im Folgenden stellvertretend vorgestellt werden. Ieropoulos *et al.* konnten zeigen, dass es möglich ist mit mehreren in Serie geschalteten Brennstoffzellen ein normal erhältliches mobiles Telefon zu laden. Dabei wurde Schlamm als Inokulum verwendet und Urin als Substrat (Ieropoulos *et al.*, 2013). Jedoch bedarf dieser Aufbau viel Platz. Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass sie eine mikrobielle Brennstoffzelle mit Abwasser betreiben konnten und dabei genügend Energie produzierten, um die Fütterung, Begasung, Überwachung und Kommunikation per Funksignal der Anlage zu gewährleisten. Dies bedeutet die Schaffung eines autarken Systems, das zusätzlich sogar noch Energie lieferte (Ledezma *et al.*, 2013). Die Messungen beider Studien wurden aber nur unter Laborbedingungen und in Laborgröße durchgeführt.

Um aber in einem Klärwerk eine Brennstoffzelle installieren zu können, muss vor allem das Problem des „upscalings“ gelöst werden, denn es gibt keinen linearen Zusammenhang zwischen Anodengröße und produzierter Leistung. Dies resultiert aus der Entstehung höherer elektrischer Verluste und vermehrtem Überpotential in größeren Aufbauten. Die Lösung ist daher die Anordnung vieler Brennstoffzeleinheiten hintereinander anstelle einer großen Anode (Oh *et al.*, 2010).

Ein weiterer Faktor ist die Rentabilität, da die Kosten für die Verwendung von teuren Materialien nicht durch die Produktion von Strom wieder reingeholt werden. Daher ist die Suche nach kostengünstigeren und vielleicht sogar leistungsfähigeren Elektrodenmaterialien angebracht. Genauso von Interesse ist eine effektive Nutzung der Anodenfläche durch Bakterien. Daraus folgt die Frage, welche Organismen überhaupt in der Lage sind, Elektronen auf die Anode zu übertragen und wodurch sie sich von anderen Organismen unterscheiden.

## **2 Exoelektrogene Organismen**

Einige Mikroorganismen können im Gegensatz zu Pflanzen und Tieren auch ohne Sauerstoff leben. Anstatt Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu benutzen, können sie Gärung oder anaerobe Atmung mit Metallen, Nitrat, Schwefel- oder Kohlenstoffverbindungen wie Fumarat betreiben. Ein weiterer Unterschied ist, dass im

Vergleich zu Sauerstoff, der membrangängig ist und somit im Cytoplasma der Zelle reduziert werden kann, viele der alternativen Elektronenakzeptoren nicht membrangängig sind. In diesem Fall müssen die Elektronen aus dem Periplasma auf die Zelloberfläche transportiert werden, um dort den terminalen Elektronenakzeptor zu reduzieren. Mikroorganismen, die dies können, werden exoelektrogen genannt. Diese Eigenschaft kann in mikrobiellen Brennstoffzellen nun ausgenutzt werden, indem die exoelektrogenen Mikroorganismen als Biokatalysatoren eingesetzt werden.

## 2.1 Diversität der exoelektrogenen Mikroorganismen

Die Eigenschaft exoelektrogen zu sein, lässt sich mit der Theorie über die Entwicklung des Lebens auf der Erde begründen. Zu Beginn herrschten anoxische Bedingungen und das Leben entstand somit ohne Sauerstoff. Eisen ist ein ubiquitär vorhandener Elektronenakzeptor und wird von vielen Phyla an der Basis des Stammbaums des Lebens als Elektronenakzeptor benutzt. Daher ist die Eisenatmung vermutlich eine der ersten Formen der Atmung (Childers & Lovley, 2001). Mit der frühen Entstehung der Eisenatmung lässt sich auch begründen, dass es eine hohe Diversität bei den Eisenreduzierern gibt. Dabei gibt es keine bestimmte Nische für exoelektrogene Mikroorganismen. Es gibt sowohl thermophile, psychrophile, aber auch acidophile oder alkaliphile Organismen.

Ein thermophiler Vertreter ist das Archaeum *Acidianus manzaensis*, das zu den Crenarchaeota gehört. Es kann mit Wasserstoff oder Schwefel als Elektronendonator und Eisen oder Sauerstoff als Elektronenakzeptor autotroph bei 80°C und einem pH von 1,2 - 1,5 wachsen (Yoshida *et al.*, 2006). Ein weiterer Crenarchaeota ist *Pyrobaculum islandicum*. Es ist ein hyperthermophiler Eisenreduzierer, der mit Wasserstoff oder organische Verbindungen wächst (Childers & Lovley, 2001).

Psychrophile Vertreter hingegen können u. a. bei den Proteobacteria gefunden werden. *Shewanella frigidimarina* und *S. gelidimarina* wurden beide aus gefrorenem Meerwasser isoliert und können auch unter 0°C wachsen und dabei Eisen reduzieren (Bowman *et al.*, 1997).

Ein acidophiler Mikroorganismus ist *Acidiphilium cryptum*, der bei einem pH von 1,9 bis 5,9 wachsen kann. Als Elektronendonator wird Glucose verwendet, die komplett zu CO<sub>2</sub> oxidiert wird (Harrison, 1981). Sauerstoff und Eisen können sogar gleichzeitig als

Elektronenakzeptoren verwendet werden (Küsel *et al.*, 1999). Der Grund dafür ist das hohe Redoxpotential von Eisen(III)/Eisen(II) bei pH 2, das fast so gut ist wie das Redoxpotential von O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Dies sind also theoretisch ideale Bedingungen, um unter sauren Bedingungen Eisen als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden. Dennoch gibt es nicht viele bekannte saure Eisenreduzierer.

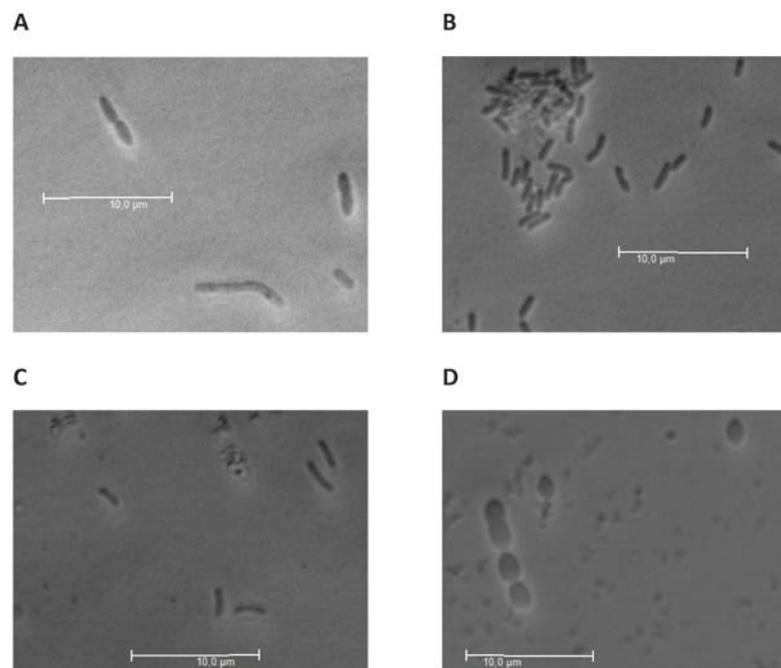
Hingegen der höchste pH, bei dem Eisenreduktion bisher beobachtet wurde, war 11. *Alkaliphilus metalliredigens* kann bei diesem pH Lactat oder Hefeextrakt oxidieren und die entstehenden Elektronen für Reduktion von Eisen nutzen (Ye *et al.*, 2004).

Diese kleine Auswahl an exoelektrogenen Organismen zeigt bereits, wie unterschiedlich die Lebensbedingungen sind und wie groß die Diversität ist. Unter neutralen Bedingungen ist die Diversität jedoch nochmal ausgeprägter und am besten erforscht. Die meisten neutrophilen Organismen gehören zu den Proteobacteria. *S. oneidensis* MR-1 gehört zu den  $\gamma$ -Proteobacteria und ist ein Modellorganismus für extrazellulären Elektronentransfer (Abb. 5 A). Es wurde nach Dr. James H. Shewan und seinem Isolierungsort, dem Sediment des Sees Oneida in New York, USA benannt (Venkateswaran *et al.*, 1999). Es ist ein fakultativ anaerobes Stäbchen mit einer polaren Flagelle (Hau & Gralnick, 2007). Die optimale Wachstumstemperatur ist 30°C (Venkateswaran *et al.*, 1999), bei 4°C ist aber auch noch Wachstum zu beobachten (Hau & Gralnick, 2007). *S. oneidensis* besticht durch die Verwendung von bis zu 20 verschiedenen Elektronenakzeptoren u. a. Sauerstoff, Eisen, Fumarat und Nitrat (Hau & Gralnick, 2007). Das Elektronendonorspektrum hingegen ist eher klein. *S. oneidensis* oxidiert mit Sauerstoff Lactat, Acetat, Pyruvat, Glucose, Propionat, Ethanol, Formiat und einige Aminosäuren zu CO<sub>2</sub>. Unter anoxischen Bedingungen fehlen zwei Enzyme des Citratzyklus, dadurch können Acetat und Formiat nicht verstoffwechselt werden. Während Formiat das zentrale Intermediat ist, wird Acetat als Endprodukt ausgeschieden (Scott & Nealson, 1994).

Der zweite Modellorganismus für extrazellulären Elektronentransfer ist *Geobacter sulfurreducens* PCA und gehört zu den  $\delta$ -Proteobacteria (Abb. 5 B). Er wurde aus dem Sediment eines mit Kohlenwasserstoff belasteten Bachs in Norman, Oklahoma, USA isoliert. Es ist ein unbewegliches Stäbchen mit einem Wachstumsoptimum zwischen 30 - 35°C (Caccavo *et al.*, 1994). Als Elektronendonator kann Wasserstoff, Acetat (Caccavo *et al.*, 1994) und Lactat (Aklujkar *et al.*, 2009) mit Eisen, Schwefel, Fumarat und Malat als

Elektronenakzeptor (Caccavo *et al.*, 1994) dienen. Anfänglich wurde davon ausgegangen, dass es sich um einen strikten Anaerobier handelt, Lin *et al.* konnte aber zeigen, dass *G. sulfurreducens* aerotolerant ist und mit bis zu 10% Sauerstoff auskommt und diesen auch als Elektronenakzeptor verwenden kann (Lin *et al.*, 2004).

Phylogenetisch am nächsten verwandt dazu ist *G. metallireducens* GS-15, der aus dem Sediment des Potomac Fluss in Maryland, USA isoliert wurde (Abb. 5 C). *G. metallireducens* ist ein strikt anaerobes Stäbchen mit einem Temperaturoptimum von 30 – 35°C (Lovley *et al.*, 1993). Als Elektronendonoren kommt eine große Anzahl an verschiedenen Kohlestoffverbindungen in Frage. Neben einfachen organischen Säuren wie Acetat, können auch komplexere und aromatische Verbindungen wie Phenol, Toluol und Alkohole verstoffwechselt werden. Als Elektronenakzeptoren dienen dabei Nitrat oder Eisen(III) (Aklujkar *et al.*, 2009). Feist *et al.* konnten des Weiteren zeigen, dass *G. metallireducens* auch in der Lage ist durch die Verwendung eines reduktiven Citratzyklus CO<sub>2</sub> zu fixieren (Feist *et al.*, 2014).



**Abb. 5: Lichtmikroskopaufnahmen von exoelektrogenen Mikroorganismen. A) *S. oneidensis* MR-1, B) *G. sulfurreducens* PCA, C) *G. metallireducens* GS-15 und D) *D. propionicus* Lindhorst (1pr3).**

*Desulfobulbus propionicus* Lindhorst (1pr3) gehört auch zu den  $\delta$ -Proteobacteria und zeichnet sich durch eine Zitronen-ähnliche Form aus (Abb. 5 D). Weitere Merkmale sind die große Temperaturtoleranz (10 – 43°C) sowie die Fähigkeit zum einen Lactat zu Acetat und Propionat zu vergären, wobei das Propionat wiederum mit Sulfat oder Nitrat weiter oxidiert werden kann. Zum anderen aber die Fähigkeit, Lactat mit Elektronenakzeptoren wie Eisen, Nitrat oder Sulfat zu Acetat und CO<sub>2</sub> zu oxidieren (Widdel & Pfennig, 1982; Laanbroek *et al.*, 1982).

So unterschiedlich die jeweiligen Habitate der exoelektrogenen Organismen sind, haben sie doch gemeinsam, dass sie zum Atmen die Elektronen aus dem Cytoplasma auf die Zelloberfläche transportieren müssen. Da aber die Möglichkeit Eisen zu reduzieren nicht spezifisch für eine Evolutionslinie der Mikroorganismen ist, liegt es daher nahe, dass die Fähigkeit Eisen zu reduzieren sich mehrmals parallel entwickelt hat und es daher auch mehrere Mechanismen dafür geben muss.

### **2.2 Mechanismus der Atmung mit Eisen**

Eine verlängerte respiratorische Elektronentransferkette ist als Mechanismus notwendig, da Eisen(III) unter alkaliphilen und neutralen Bedingungen einen nicht-membrangängigen Elektronenakzeptor darstellt. Nur unter sauren pH-Bedingungen ist Eisen(III) löslich. Allerdings konnte nur für *A. rubrum* Eiseneinschlüsse im Cytoplasma gezeigt werden (Matsuzawa *et al.*, 2000). Daher wird angenommen, dass es bei allen anderen Gram-negativen Vertretern, unabhängig vom pH-Optimum, einen Elektronentransfer vom Cytoplasma über die Cytoplasmamembranen in das Periplasma oder auf die Zelloberfläche geben muss. Dabei spielen *c*-Typ Cytochrome eine entscheidende Rolle. Bei dieser Familie der Cytochrome wird die Hämgruppe über das Bindemotiv CXXCH kovalent an das Apoprotein gebunden. Die Funktion der *c*-Typ Cytochrome ist der Transport von Elektronen und somit die Katalyse der Oxidation oder Reduktion der Substrate (Stevens *et al.*, 2004).

In *A. cryptum* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* konnten mehrere *c*-Typ Cytochrome detektiert werden. Die Beteiligung der Cytochrome an der Eisenreduktion ist aber bisher noch nicht gezeigt (Magnuson *et al.*, 2010; Khare *et al.*, 2006; Cort *et al.*, 2011; Dolch, 2010; Giudici-Ortoni *et al.*, 2000; Yarzabal *et al.*, 2002; Malarte *et al.*, 2005; Cavazza *et al.*, 1996; Elbehti & Lemesle-Meunier, 1996). Diese *c*-Typ Cytochrome besitzen alle nur

eine oder maximal zwei Hämgruppen. Es wird angenommen, dass dies die Stabilität in sauren Umgebungen erhöht (Giudici-Orticoni *et al.*, 2000).

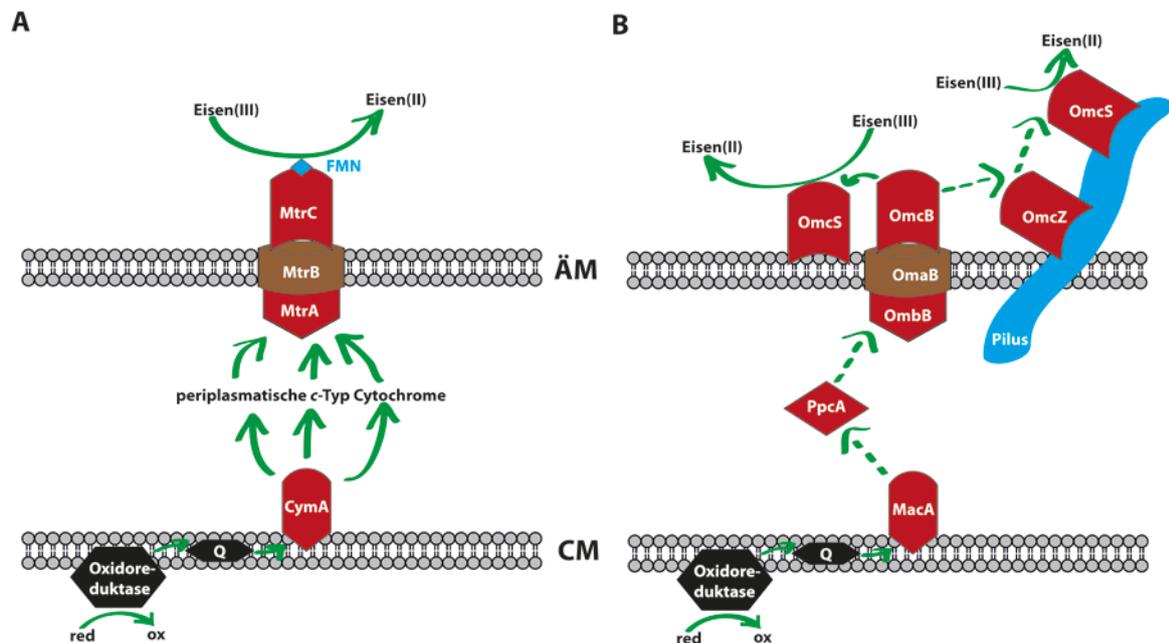
Unter alkalischen Bedingungen hingegen wurden bisher noch keine Studien über *c*-Typ Cytochrome veröffentlicht. Daher gibt es keinerlei Theorien über den Mechanismus des Elektronentransfers.

Bei den neutrophilen Eisenreduzierern wurden die beiden thermophilen Archaeen *Geoglobus ahangari* und *Pyrobaculum islandicum* auf das Vorhandensein von *c*-Typ Cytochromen untersucht. In beiden Stämme konnten keine *c*-Typ Cytochrome nachgewiesen werden (Kashefi *et al.*, 2002; Childers & Lovley, 2001). Daher ist es möglich, dass sich bei den Archaea ein anderer Mechanismus für den Elektronentransfer entwickelt hat.

Bei neutrophilen Proteobacteria sind die Mechanismen bereits besser aufgeklärt und im nachfolgenden sollen diese an den Beispielen *Shewanella* spp. und *Geobacter* spp. beschrieben werden.

### **2.2.1 Verlängerte respiratorischer Elektronentransferkette bei *Shewanella* spp.**

In *S. oneidensis* MR-1 wurde der Elektronentransfer vom Cytoplasma über die innere und äußere Membran bisher am besten aufgeklärt. Im Genom sind 41 *c*-Typ Cytochrome kodiert, die z. T. eine redundante Wirkung haben. In der Cytoplasmamembran ist die Oxidoreduktase verankert, die die Elektronen in den Menachinol-Pool (Q) abgibt. Von dort gelangen die Elektronen auf CymA (engl. *cytoplasmic membrane protein A*), dessen Funktion nicht durch andere Proteine ersetzt werden kann. CymA wirkt dann wie ein Verteiler, der die Elektronen auf verschiedene periplasmatische *c*-Typ Cytochrome überträgt. Im Periplasma besteht dann ein Netzwerk aus *c*-Typ Cytochromen, die zum einen die Elektronen weitergeben, aber zum anderen auch speichern können (Schütz *et al.*, 2009). So gelangen die Elektronen zu einem in der äußeren Membran verankerten Membrankomplex. Dieser durchspannt die äußere Membran und besteht aus MtrABC (engl. *metal reducing protein A, B, C*). Während MtrA und MtrC je ein Dekahäm sind, ist MtrB ein  $\beta$ -Fass-Protein, das die Pore durch die äußere Membran bildet (Abb. 6 A). An diesen Membrankomplex kann dann noch von außen OmcA (engl. *outer membrane cytochrome A*) angelagert sein. Während an das MtrC



**Abb. 6: Schematischer und vereinfachter Elektronentransfer in *S. oneidensis* und in *G. sulfurreducens*.** An der cytoplasmatischen Membran (CM) sitzt die Oxidoreduktase und leitet die Elektronen auf den Menachinol-Pool (Q) weiter. Von dort werden die Elektronen über *c*-Typ Cytochrome (rot) durch das Periplasma zur äußeren Membran (ÄM) geleitet, in der ein Porin (braun) ist. Auf der Zelloberfläche sind dann *c*-Typ Cytochrome lokalisiert, die entweder direkt das Eisen(III) zu Eisen(II) reduzieren können, oder die Elektronen weiterleiten. **A)** *S. oneidensis* mit den Proteinen CymA (*cytoplasmic membrane protein A*), Mtr (*metal reducing protein*) und Flavinmononukleotid (FMN). **B)** *G. sulfurreducens* mit den Proteinen MacA (*membrane-associated cytochrome*), PpcA (*periplasmic cytochrome*) und Om (*outer membrane*). In blau ist noch der Pilus dargestellt.

Flavinmononukleotid (FMN) binden kann (Okamoto *et al.*, 2013), bindet Riboflavin an OmcA (Okamoto *et al.*, 2014b).

Ein Analogon von MtrC ist MtrF, das aber unter Eisen-reduzierenden Bedingungen nicht exprimiert wird. Für MtrF konnten über die Kristallstruktur zwei mögliche Bindestellen für FMN gezeigt werden (Clarke *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Verlängerte respiratorische Elektronentransferkette bei *Geobacter* spp.

Bei *G. sulfurreducens* PCA wurden 89 putative *c*-Typ Cytochrome im Genom gefunden. Davon haben 78 Proteine mehr als eine Hämgruppe (Butler *et al.*, 2010) und eins hat möglicherweise bis zu 27 Hämgruppen (Méthé *et al.*, 2003). Die hohe Anzahl erschwert die Auflösung des Elektronentransportweges. Bisher ist bekannt, dass die Oxidoreduktase wieder in der cytoplasmatischen Membran verankert ist und die

---

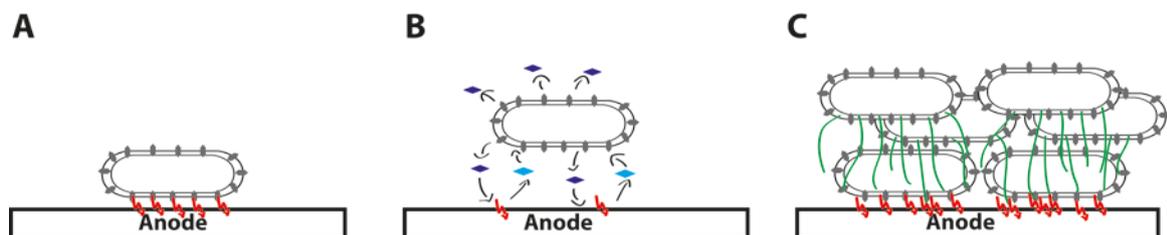
Elektronen auf den Menachinol-Pool weiter leitet. Von dort werden die Elektronen auf MacA (engl. *membrane-associated cytochrome A*) einem *c*-Typ Cytochrom mit 2 Hämgruppen übertragen. Im Periplasma ist das PpcA (engl. *periplasmic cytochrome A*) lokalisiert, das drei Hämgruppen hat. In der äußeren Membran ist eine große Anzahl an *c*-Typ Cytochrome zu finden, die genaue Funktion der einzelnen Proteine ist jedoch nicht bekannt. Es wurden jedoch zwei Membrankomplexe ähnlich dem MtrABC-Komplex in *S. oneidensis* gefunden. Der eine besteht aus OmbB-OmaB-OmcB und der andere aus OmbC-OmaC-OmcC (engl. *outer membrane – Om*) (Liu *et al.*, 2014). Diese Komplexe sind nicht wichtig für die Reduktion von Fumarat, aber von Eisen(III), wobei die Elektronen noch auf OmcS weitergeleitet werden. OmcS ist auch assoziiert mit dem Pilus, der aus PilA aufgebaut ist, und für die Reduktion von Eisen(III) notwendig ist (Leang *et al.*, 2010). OmcZ hingegen ist nicht an der Reduktion von Eisen(III) beteiligt, sondern ist für den Elektronentransfer in dicken Biofilmen verantwortlich (Nevin *et al.*, 2009) und in der extrazellulären Matrix zu finden (Inoue *et al.*, 2010) (Abb. 6 B).

Bei *G. metallireducens* sind 76 putative *c*-Typ Cytochrome im Genom identifiziert worden, wobei 66 davon mehr als eine Hämgruppe binden (Butler *et al.*, 2010). Das PilA zeigt 76% Homologie zu der Proteinsequenz von PilA von *G. sulfurreducens* (Smith *et al.*, 2014). Tremblay *et al.* konnten zeigen, dass die Typ IV Pili in *G. metallireducens* essentiell für die Reduktion von Eisen oder die Anodenatmung sind. Des Weiteren zeigten sie, dass die Reduktion von Eisen(III)-Oxid in *G. metallireducens* 17 Mal schneller ist als in *G. sulfurreducens* (Tremblay *et al.*, 2012). Als weitere Gene konnten *ppcA* und *macA* im Genom gefunden werden, jedoch gibt es keine homologen Proteine für OmcS und OmcB (Smith *et al.*, 2014). Im Vergleich der Reduktion von unlöslichen Eisen(III)-Oxiden und löslichem Eisen(III)-Citrat, sind über 20 *c*-Typ Cytochrome hochreguliert (Smith *et al.*, 2014).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Elektronen über *c*-Typ Cytochrom-vermittelten Elektronentransport auf die Zelloberfläche gelangen. Für den terminalen Transfer auf den Elektronenakzeptor wie z. B. eine Anode gibt es wiederum auch verschiedene Mechanismen.

### 2.2.3 Mechanismen des terminalen Elektronentransfers

Für den Ablauf des terminalen Elektronentransfers bei Gram-negativen Bakterien gibt es drei Hypothesen, wie dies ablaufen könnte. Die erste Möglichkeit ist der direkte Elektronentransfer (Abb. 7 A). Dabei wird davon ausgegangen, dass die an die äußere Membran gebundenen c-Typ Cytochrome direkten Kontakt zur Anode haben, d.h. dass die Bakterienzelle direkten Kontakt zur Anode haben muss. Diese Möglichkeit des Elektronentransfers ist limitiert durch die Oberfläche der Anode und erklärt die Bildung eines mehrschichtigen Biofilms dadurch, dass der gesamte Biofilm leitend ist und Elektronen über mehrere Zellschichten weitergeleitet werden können.



**Abb. 7: Mechanismen des Elektronentransfers.** A) Direkter Elektronentransfer, B) Shuttle-vermittelter Elektronentransfer und C) Nanowires. Die Übertragung der Elektronen auf die Anode ist durch rote Pfeile dargestellt. Reduzierte Elektronenshuttle sind in dunkelblau und oxidierte Elektronenshuttle in hellblau gezeigt. Nanowires sind in grün abgebildet.

Die zweite Möglichkeit ist der Shuttle-vermittelte Elektronentransfer (Abb. 7 B). Durch den Kontakt zwischen Elektronenshuttle und äußeren Membranzytochromen kommt es zur Übertragung von Elektronen auf das Elektronenshuttle (Reduktion). Als Elektronenshuttle können synthetische Stoffe wie Methylenblau, Anthraquinone-2,6-disulfonat (AQDS) oder Neutralrot verwendet werden oder die Bakterien sind in der Lage ihre eigenen herzustellen wie Riboflavin und Flavinmononukleotid (FMN). Die reduzierten Elektronenshuttles gelangen dann durch Diffusion an die Anode und übertragen dort die Elektronen (Oxidation). Dabei werden sie in ihren Ausgangszustand zurückversetzt und können erneut Elektronen von den äußeren Membranzytochromen aufnehmen. Danach kann der Kreislauf von vorne beginnen. Der Nachteil der Nutzung von Elektronenshuttlen ist, dass es in einem Durchflusssystem zum Auswaschen der Elektronenshuttle kommt. Entweder müssen die artifiziellen ständig neu dazu gegeben werden, was Kosten verursacht, oder die endogenen Elektronenshuttle müssen unter

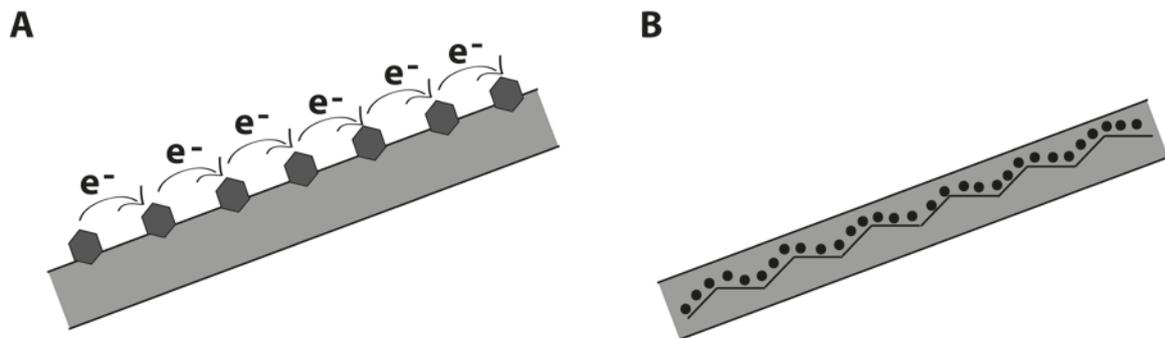
---

Energieaufwand von den Bakterienzellen immer neu produziert werden. Bei *S. oneidensis* konnte die Bildung von Riboflavin und FMN nachgewiesen werden und dass 70% des Stroms in mikrobiellen Brennstoffzellen mittels Elektronenshuttle übertragen werden (Marsili *et al.*, 2008). Für *G. sulfurreducens* konnte gezeigt werden, dass Cystein als Elektronenshuttle genutzt werden kann (Doong & Schink, 2002) und es dabei in mikrobiellen Brennstoffzellen zu einer Leistungssteigerung kommt (Qu *et al.*, 2012). Jedoch werden von *Geobacter* spp. keine eigenen produziert (Nevin & Lovley, 2000).

Die dritte Möglichkeit ist der Elektronentransfer mittels „Nanowire“ (Abb. 7 C). Unter Nanowires werden sehr dünne Zellanhänge verstanden. Diese Zellanhänge sind dann in der Lage in einem Biofilm den Elektronentransfer der Bakterien zu vermitteln, die keinen direkten Kontakt mit der Anode haben. Für *S. oneidensis* wird postuliert, dass diese Nanowires Ausstülpungen der äußeren Membran mit Periplasma im Inneren sind und so eine Zelloberflächenerweiterung darstellen (Pirbadian *et al.*, 2014). Bei *G. sulfurreducens* hingegen sind die Nanowires Typ IV Pili, die aus PiliA-Filamenten und daran angehefteten äußeren Membrancytochromen bestehen (Klimes *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2013). Da diese Zellanhänge sehr dünn sind, ist es schwierig die Leitfähigkeit physikalisch zu messen. Für *G. sulfurreducens* konnte gezeigt werden, dass der Biofilm leitfähig ist. Im Vergleich dazu konnte keine Leitfähigkeit der Biofilme von den zwei Kontroll-Biofilmbildern *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* gemessen werden. Die Autoren gehen so weit, dass sie postulieren, dass ein Biofilm mit einem hohen Anteil von *G. sulfurreducens* Zellen immer leitfähig ist (Malvankar *et al.*, 2012). Für *S. oneidensis* hingegen konnte eine Leitfähigkeit der Nanowires gemessen werden, gleichzeitig aber auch für Nanowires von *Synechocystis* PCC6803 und *Pelotomaculum thermopropionicum* (Gorby *et al.*, 2006).

Die Frage nach dem Mechanismus der Leitfähigkeit wird kontrovers diskutiert. Es gibt zwei Hypothesen, die auf sehr verschiedenen Ansätzen beruhen. Die erste erklärt die Leitfähigkeit von Nanowires damit, dass die Elektronen von einem Cytochrome zum nächsten weitergeleitet werden und die zweite, dass die Elektronen durch PiliA transportiert werden (Boesen & Nielsen, 2013) (Abb. 8). Das erste Modell schlägt vor, dass die an die Pili gebunden Cytochrome für den Elektronentransfer zuständig sind (engl. *multistep electron hopping*) (Bonanni *et al.*, 2013; Snider *et al.*, 2012). Es gibt in

*G. sulfurreducens* mehr als 50 Multihäm Cytochrome, die alle verschiedene Redoxpotentiale haben und so beim Weiterreichen der Elektronen eingreifen könnten (Snider *et al.*, 2012). Auch die Nanowires bei *S. oneidensis* sind mit äußeren Membrancytochromen bestückt (Pirbadian *et al.*, 2014).



**Abb. 8: Leitfähigkeit in Nanowires. A)** „Multistep electron hopping“-Modell und **B)** „metallic-like conduction“-Modell. Genauere Erklärungen im Text.

Das zweite Modell schlägt vor, dass die Nanowires wie Metalle leitfähig sind (engl. *metallic-like conduction*) (Malvankar *et al.*, 2012; Malvankar & Lovley, 2014). In dem nicht konservierten Teil der Proteinstruktur von PilA gibt es bei *G. sulfurreducens* fünf aromatische Aminosäuren, die nicht in der Aminosäuresequenz von PilA von nicht leitfähigen Organismen vorkommen. Wenn diese durch Alanin ersetzt werden, bildet *G. sulfurreducens* weiterhin normal dicke Biofilme und die äußeren Membrancytochrome sind normal verteilt. Allerdings sind diese Biofilme weniger leitfähig und nicht in der Lage Eisen(III)-Oxide zu reduzieren (Vargas *et al.*, 2013). Dies ist im Einklang mit Rollefson *et al.*, die zeigen konnten, dass die Biofilmbildung und der Elektronentransfer separate, aber komplementäre Phänotypen sind (Rollefson *et al.*, 2009). Die reduzierte Leitfähigkeit wird auf das Fehlen der pi-Orbitale der aromatischen Aminosäuren zurückgeführt. Daraus hat sich die Hypothese entwickelt, dass überlappende pi-pi-Orbitale der aromatischen Aminosäuren für den Transfer der Elektronen zuständig sind (Vargas *et al.*, 2013).

Gegen das erste Modell und somit für das zweite Modell spricht, dass zum einen die Cytochrome einen Abstand von bis zu 200 nm zueinander haben und dass ein Elektronentransfer über so eine große Distanz bisher nicht bewiesen werden konnte.

Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass Nanowires mit denaturierten Cytochromen immer noch leitfähig sind (Malvankar & Lovley, 2014).

In Computermodellen wurde untersucht, in wie weit die einzelnen Mechanismen des terminalen Elektronentransfers eine Rolle bei mikrobiellen Brennstoffzellen mit *S. oneidensis* spielen. Renslow *et al.* entwickelten ein Computermodell, mit dem sie das Verhalten von *S. oneidensis* in einer mikrobiellen Brennstoffzelle simulierten. Dabei kamen sie zu dem Fazit, dass Biofilme mit *S. oneidensis* einen metabolischen Vorteil haben, da die Elektronen sowohl per Diffusion als auch über leitenden Kontakt übertragen werden können. Jedoch stellten sie auch fest, dass unter normalen Bedingungen der Stoffwechsel des Biofilms nicht durch Diffusions-bedingten Elektronentransfer gesteigert wird, sondern vielmehr dass dieser Elektronentransfer nur zum Einsatz kommt, wenn über den leitenden Kontakt keine Elektronen übertragen werden können (Renslow *et al.*, 2013a).

Merkey und Chopp entwickelten hingegen ein Computermodell, mit dem sie theoretisch testeten, wie sich zwei verschiedene Stämme in einer mikrobiellen Brennstoffzelle gleichzeitig verhalten. Sie testeten damit, wann sich ein exoelektrogener Mikroorganismus, der per Shuttle seine Elektronen auf eine Anode überträgt oder wann sich ein exoelektrogener Mikroorganismus, der leitfähige Biofilme bildet, durchsetzt. In den ersten paar Tagen setzte sich der Stamm mit Shuttlen durch, im Langzeitversuch aber der andere Stamm (Merkey & Chopp, 2014).

Diese Computermodelle zusammen mit dem Wissen, dass eine bewusste Selektion auf eine optimale Zusammensetzung der Anodenpopulation in mikrobiellen Brennstoffzellen mit Abwasser zu höheren Behandlungsraten und effizienteren Energiegewinnung führt (Ishii *et al.*, 2013), lässt den Einsatz von mikrobiellen Brennstoffzellen in einem Klärwerk vielversprechend aussehen. Und gleichzeitig ist klar, dass noch praktischer Optimierungsbedarf besteht.

### **3 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, einen stabilen und leistungsfähigen Biofilm auf einer Anode in einer mikrobiellen Brennstoffzelle zu züchten und damit Strom aus Abwasser zu produzieren.

Dazu sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein Charakterisierungsschema etabliert werden, anhand dessen ein quantitativer Vergleich von Elektrodenmaterialien unter gleichen Bedingungen mit *S. oneidensis* MR-1 und *G. sulfurreducens* PCA möglich war. Dieses Schema bestand aus elektrochemischen Parametern wie Konditionierung und Lastkurve und biologischen wie Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und quantitativer PCR (qPCR).

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte mit dem Charakterisierungsschema untersucht werden, ob es eine Leistungssteigerung gibt, wenn beide Organismen gleichzeitig verwendet werden. Damit sollte das Elektrodenmaterial, das die Etablierung eines stabilen, gemischten Biofilms auf der Anode ermöglichte, gefunden werden.

Gleichzeitig sollte das Schema noch für die elektrochemische Charakterisierung zweier weitere exoelektrogene Mikroorganismen - *G. metallireducens* GS-15 und *D. propionicus* Lindhorst (1pr3) – verwendet werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollten mikrobielle Brennstoffzellen für die Anwendung getestet werden. Dazu sollte das Elektrodenmaterial, das die Bildung des stabilsten Biofilms ermöglichte mit einer Kombination aus geeigneten Mikroorganismen gestartet werden. Durch eine Vorinkubation der Anode mit den Mikroorganismen sollte sich ein stabiler Biofilm bilden, der anschließend zum einen in einem Durchflusssystem und zum anderen in einer Brennstoffzelle mit Abwasser weiterbestehen sollte. Im Vergleich dazu sollten Brennstoffzellen ohne vorinkubierte Anode parallel mit Abwasser gestartet werden. Als Vergleichsparameter sollte zusätzlich der TOC-Gehalt gemessen und die Coulomb Effizienz berechnet werden. Um am Ende die vorinkubierten Bakterien noch quantitativ bestimmen zu können, sollte in jedes Genom eine spezifische und synthetische DNA-Sequenz integriert werden, anhand derer die Zellzahl in einem multiplex qPCR Assay bestimmt werden konnte.

## II Material und Methoden

### II.I Material

#### 1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgelistet. Die Klärschlammproben wurden im Städtischen Klärwerk Karlsruhe dem Rückfluss entnommen und enthielten 1,7% Festmasse.

**Tab. 1: Bakterienstämme.** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme sind in der Stammsammlung von Johannes Gescher (JG) hinterlegt.

Stammnummer	Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
JG7	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Wildtyp	(Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999)
JG22	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Z1	<i>aciq</i> , <i>PN25-tetR</i> , <i>SpR</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argFV169</i> ), $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	(Lutz & Bujard, 1997)
JG98	<i>E. coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>RP4-1360</i> $\Delta$ ( <i>araBAD</i> )567 $\Delta$ <i>dapA1341::[erm pir(wt)]</i>	(Saltikov & Newman, 2003)
JG144	<i>E. coli</i> $\lambda$ pir S17-1	<i>thi pro recA hsdR [RP4-2Tc::Mu-Km::Tn7]</i> $\lambda$ pir <i>Tpr Smr</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
JG156	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Wildtyp	(Lovley <i>et al.</i> , 1993)
JG407	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	Wildtyp	DSM12127

## Material und Methoden

---

Stammnummer	Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
JG473	<i>Desulfobulbus propionicus</i> Lindhorst (1pr3)	Wildtyp	DSM2032
JG493	<i>S. oneidensis</i> <i>barcode</i>	synthetische Sequenz; 71982:: <i>Barcode</i>	diese Arbeit
JG543	<i>G. sulfurreducens</i> <i>barcode</i>	synthetische Sequenz; 453226:: <i>kan Barcode</i>	diese Arbeit
JG715	<i>E. coli barcode</i>	synthetische Sequenz; 1308612:: <i>tet Barcode</i>	diese Arbeit
JG850	<i>G. metallireducens</i> <i>barcode</i>	synthetische Sequenz; 254254:: <i>kan Barcode</i> pk18mob	diese Arbeit

## 2 Plasmide

Alle Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 2 aufgeführt.

**Tab. 2: Plasmide.** Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz
pAH123	Int <sub>Φ80</sub>	(Haldimann & Wanner, 2001)
pAH162	Tet <sup>r</sup>	(Haldimann & Wanner, 2001)
pAH162_E.c.barcode	Tet <sup>r</sup> , synthetische Sequenz für <i>E. coli barcode</i>	diese Arbeit
pASK-IBA43	Amp <sup>r</sup>	IBA, Göttingen
pJET1.2/blunt Cloning Vector	Amp <sup>r</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
pJET_G.s.barcode	Kan <sup>r</sup> , synthetische Sequenz für <i>G. sulfurreducens barcode</i>	diese Arbeit
pk18mob	Kan <sup>r</sup>	(Oberender <i>et al.</i> , 2012)
pk18mob_amp	Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pk18mob_amp_G.m.barcode	Kan <sup>r</sup> , synthetische Sequenz für <i>G. metallireducens barcode</i>	diese Arbeit
pMQ150	deletion vector, den/arsh, <i>ura3</i> , Kan <sup>r</sup> , <i>sacB</i> , R6K-ori	(Shanks <i>et al.</i> , 2006)
pMQ150_S.o.barcode	Kan <sup>r</sup> , synthetische Sequenz für <i>S. oneidensis barcode</i>	diese Arbeit
pSCVAM	Kan <sup>r</sup> , R6K-ori	A. Förster, unveröffentlicht
puc57	Amp <sup>r</sup> , synthetische Sequenz für <i>E. coli barcode</i>	GenScript, Picataway, USA

### 3 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 3 aufgeführt.

**Tab. 3: Primer.** Die Sequenz für die Überhänge zu den Plasmiden ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet. Die synthetischen Sequenzen sind in violetter Schrift und die Überhänge zu der Kanamycin-Kassette in rot dargestellt. Die Bindung ans Genom ist in grüner Schriftfarbe markiert. Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert.

Nummer	Primernamen	Sequenz 5`-> 3`	Funktion
1	up_for Barcoding S.o.	<u>AACGACGGCCAGTGCC</u> <u>AAGCTTGCATGCCTGCA</u> <u>GGTCTCGCCAAACGGCT</u> GGTT	Vorwärtsprimer für Homologiebox „upstream“ in <i>S. oneidensis</i> mit Überhang zu pMQ150
2	up_rev Barcoding S.o.	GCTCACACGGAGAGCA AGGAGAACGCACACCA ATGCCAAGTACAGTCAA GATAAAAACCTGTTACC CAGT	Rückwärtsprimer für Homologiebox „upstream“ in <i>S. oneidensis</i> und mit synthetischer Sequenz für <i>S. oneidensis</i>
3	down_for Barcoding S.o.	CGTTCTCCTTGCTCTCCG TGTGAGCCTACAGCGGC ATCCGAGCCGTGTTTAC TGCTCTATGCCTTGAG	Vorwärtsprimer für Homologiebox „downstream“ in <i>S. oneidensis</i> und mit synthetischer Sequenz für <i>S. oneidensis</i>
4	down_rev Barcoding S.o.	<u>TGACCATGATTACGAAT</u> <u>TCGAGCTCGGTACCCGG</u> <u>GAGCAGAGACGAGTAA</u> TAGGG	Rückwärtsprimer für Homologiebox „downstream“ in <i>S. oneidensis</i> mit Überhang zu pMQ150
5	pMQ150for	<u>CTGGCGAAAGGGGGAT</u> GTG	Vorwärtstestprimer für den Nachweis von pMQ150
6	pMQ150rev	<u>CATTAGGCACCCCAGGC</u> <u>TTTAC</u>	Rückwärtstestprimer für den Nachweis von pMQ150

Nummer	Primername	Sequenz 5`-> 3`	Funktion
7	qPCR S.o. for	GACTGTACTTGGCATTG G	qPCR Vorwärtsprimer für <i>S. oneidensis</i> barcode
8	qPCR S.o. rev	GATCCATTAGCACAGAC TTA	qPCR Rückwärtsprimer für <i>S. oneidensis</i> barcode
9	Test 1st Cross S.o. for	GGT GAG CTG ATG CGT GCT	Vorwärtstestprimer für die erfolgreiche Rekombination von pMQ150 in <i>S. oneidensis</i>
10	Test 1st Cross S.o. rev	GGT AAA TGC TGA TAC CAA TCC	Rückwärtstestprimer für die erfolgreiche Rekombination von pMQ150 in <i>S. oneidensis</i>
11	600bp_up_for	GTAGGCAAGGGAGAAC AGC	Vorwärtsprimer für Homologiebox „upstream“ in <i>G. sulfurreducens</i>
12	600bp_up_rev	ATTTTGAGACACAACGT GGCCCCCACCTCCACC AGG	Rückwärtsprimer für Homologiebox „upstream“ in <i>G. sulfurreducens</i> und mit Überhang zur Kanamycin- Kassette
13	600bp_down_f or	ACTTCTCCTGTCCTTCAC CTCGGTGTCCTTCCTGCC AAGTGTCTGTTTCATGTT CTTCTCTCCTCCTCTAT CCGGCCGATCGTATCGG GAGTTTCTCCTGCTCG	Vorwärtsprimer für Homologiebox „downstream“ in <i>G. sulfurreducens</i> mit Überhang zur synthetischen Sequenz von <i>G. sulfurreducens</i>
14	600bp_down_ rev	AGGCTGGATCGCCTGG GT	Rückwärtsprimer für Homologiebox „downstream“ in <i>G. sulfurreducens</i>
15	kan_for	CTGGTCCTGGTGGAGGT GGGGGGCCACGTTGTG TCTCAAAT	Vorwärtsprimer für Kanamycin- Kassette mit Überhang zur genomischen Sequenz von <i>G. sulfurreducens</i>

Nummer	Primername	Sequenz 5`-> 3`	Funktion
16	kan_rev	CACTTGGCAGGAAGGA CACCGAGGTGAAGGAC AGGAGAAGTGAGGTGA GATGCAAGGAGGAGAC GGAGAGGTAGGTCGAT AGAACCGTTAGAAAAAC TCATCGAGCATC	Rückwärtsprimer für Kanamycin-Kassette mit Überhang zur synthetischen Sequenz von <i>G. sulfurreducens</i>
17	G.s. in 600bp up for	GAAACCCGCTACCTGGC	Vorwärtssequenzierungsprimer für <i>G. sulfurreducens</i>
18	qPCR G.s. Barcoding for	CGGTTCTATCGACCTAC C	qPCR Vorwärtsprimer für <i>G. sulfurreducens</i> barcode
19	qPCR G.s. Barcoding rev	CTGCTTGATGAACGAGA G	qPCR Rückwärtsprimer für <i>G. sulfurreducens</i> barcode
20	pJET1.2_for:	<u>CGACTCACTATAGGGAG</u> <u>AGCGGC</u>	Vorwärtstestprimer für den Nachweis von pJET1.2
21	pJET1.2_rev:	<u>AAGAACATCGATTTTC</u> <u>ATGGCAG</u>	Rückwärtstestprimer für den Nachweis von pJET1.2
22	KanR_end_for	GGAAGTGCCTCGGTGA G	Vorwärtsprimer für Sequenzierung der Kanamycin-Kassette
23	Primer G.s. for	AACGACCTGCTCAGCCT G	Rückwärtsprimer für Sequenzierung, bindet im Genom von <i>G. sulfurreducens</i>
24	G.s. im Genom down-rev	TTTCAGGGCCTCATCCT GG	Rückwärtsprimer für Sequenzierung, bindet im Genom von <i>G. sulfurreducens</i>

Nummer	Primername	Sequenz 5`-> 3`	Funktion
25	pK18mob Amp-for	TGGCAGGTTGGGCGTC GCTTGGTCGGTCATTT GAACCCAGAGTCCCGC TATTAACGCTTACAATT CAGG	Vorwärtsprimer für die Amplifizierung der Ampicillin-Resistenz aus dem Plasmid pASK-IBA43 mit Überhang zur genomischen Sequenz von <i>G. metallireducens</i>
26	pK18mob Amp-rev	GCAGGGGATCAAGATC TGATCAAGAGACAGGA TGAGGATCGTTTCGCTT ACTACCAATGCTTAATC AGTG	Rückwärtsprimer für die Amplifizierung der Ampicillin-Resistenz aus dem Plasmid pASK-IBA43 mit Überhang zur synthetischen Sequenz
27	pK18mob-for	<u>GCGAAACGATCCTCATC</u> <u>CT</u>	Vorwärtsprimer für die Linearisierung des Plasmids pK18mob ohne ursprüngliche Kanamycin-Resistenz
28	pK18mob-rev	<u>GCGGGACTCTGGGGTTC</u>	Rückwärtsprimer für die Linearisierung des Plasmids pK18mob ohne ursprüngliche Kanamycin-Resistenz
29	pK18mob Kontrolle-for	<u>CAGGCTGCGCAACTGTT</u> <u>G</u>	Vorwärtsprimer für die Kontrolle, ob die Ampicillin-Kassette im pK18mob Plasmid ist
30	pK18mob Kontrolle-rev	<u>CCCAGGCTTTACTTTTA</u> <u>TG</u>	Rückwärtsprimer für die Kontrolle, ob die Ampicillin-Kassette im pK18mob Plasmid ist
31	pK18mob Fragment for	<u>TAACGCCAGGGTTTTCC</u> <u>CAGTCACGACGTTGTAA</u> <u>AACGACGGCCAGTGCCC</u> ATACCCTTCCTTCTCCAG	Vorwärtsprimer für Homologiebox „upstream“ in <i>G. metallireducens</i> mit Überhang zu pK18mob

Nummer	Primernamen	Sequenz 5' -> 3'	Funktion
32	G.m. up-rev	CAGAGATTTTGAGACAC AACGTGGCGAAAGAGT GGCGCTACGGA	Rückwärtsprimer für Homologiebox „upstream“ in <i>G. metallireducens</i> mit Überhang zur Kanamycin- Kassette
33	G.m. down-for	GTGCTCTGTATGATACC GACTTGCCGACAAGCCT TGCTGGTTCCTCTACGA TGGCGGGATGGGCTTT GGAGA	Vorwärtsprimer für Homologiebox „downstream“ in <i>G. metallireducens</i> mit Überhang zur synthetischen Sequenz von <i>G. metallireducens</i>
34	pK18mob Fragment rev	<u>AATTCGAGCTCGGTACC</u> <u>CGGGGATCCTCTAGAGT</u> <u>CGACCTGCAGGCATGCC</u> TGATTGCGACCAGTTCA C	Rückwärtsprimer für Homologiebox „downstream“ in <i>G. sulfurreducens</i> mit Überhang zu pK18mob
35	G.m. kan-for	CCCAGCTCCGTAGCGCC ACTCTTTCGCCACGTTGT GTCTCAAAT	Vorwärtsprimer für Kanamycin- Kassette mit Überhang zur genomischen Sequenz von <i>G. metallireducens</i>
36	G.m. kan-rev	CGTAGAGGAACCAGCA AGGCTTGTCGGCAAGTC GGTATCATACAGAGCAC GGCTTAGAAAACTCAT CGAGCATC	Rückwärtsprimer für Kanamycin- Kassette mit Überhang zur synthetischen Sequenz von <i>G. metallireducens</i>
37	G.m. qPCR-for	CCGTGCTCTGTATGATA C	qPCR Vorwärtsprimer für <i>G. metallireducens barcode</i>
38	G.m. qPCR-rev	CAGGATTTCTCGAATTT CTC	qPCR Rückwärtsprimer für <i>G. metallireducens barcode</i>

Nummer	Primername	Sequenz 5`-> 3`	Funktion
39	G.m. im Genom- for	<u>CAGGTCCTGCATTCCCC</u> A	Vorwärtsprimer für Sequenzierung, bindet im Genom von <i>G. metallireducens</i>
40	G.m. im Genom -rev	<u>GCTCGCTCTCATCGGCT</u> T	Rückwärtsprimer für Sequenzierung, bindet im Genom von <i>G. metallireducens</i>
41	puc57- pAH162_for	<u>GACGGATGGCCTTTTTG</u> <u>CGTGGCCAGTGCCAAGC</u> <u>TTGCATGCCTGCAGGTC</u> CAAGCTTGCATGCCTGC CTGCAG	Vorwärtsprimer für puc57 mit Überhang zu pAH162
42	puc57- pAH162_rev	<u>TCAGTGATAAGCTGTCA</u> <u>AACATGAGAATTCGAGC</u> <u>TCGGTACCCGGGGATCT</u> TCGAGCTCGGTACCCGG	Rückwärtsprimer für puc57 mit Überhang zu pAH162
43	pAH162_for	<u>ATCAAATTAAGCAGAAG</u> <u>GCC</u>	Vorwärtsprimer für Sequenzierung, bindet in pAH162
44	pAH162_rev	<u>TCATCGCCATTAATTAC</u> <u>TG</u>	Rückwärtsprimer für Sequenzierung, bindet in pAH162
45	P1_phi80_for	<u>CTGCTTGTGGTGGTGAA</u> T	Vorwärtsprimer für Sequenzierung, bindet vor der Phagenbindestelle Φ80
46	P4_phi80_rev	<u>TAAGGCAAGACGATCA</u> GG	Rückwärtsprimer für Sequenzierung, bindet nach der Phagenbindestelle Φ80
47	E. coli qPCR- for	<u>GAAGGATAGTATGGGT</u> GTCA	qPCR Vorwärtsprimer für <i>E. coli</i> <i>barcode</i>
48	E. coli qPCR- rev	<u>GATCCTCCGCTTTCTCTC</u>	qPCR Rückwärtsprimer für <i>E. coli</i> <i>barcode</i>

Nummer	Primername	Sequenz 5`-> 3`	Funktion
49	S.o. SYBR GREEN for	TAT TCA AGT GCT TCT ATT AG	qPCR Vorwärtsprimer für <i>S. oneidensis</i> MR-1
50	S.o. SYBR GREEN rev	AAG AAC TTC TAC TCA ACA	qPCR Rückwärtsprimer für <i>S. oneidensis</i> MR-1
51	G.s. SYBR GREEN for	TCTGGTTTATGGAAGAA GTTTGG	qPCR Vorwärtsprimer für <i>G. sulfurreducens</i> PCA
52	G.s. SYBR GREEN rev	TGTTAAAGGTCTGATGT GTGAGA	qPCR Rückwärtsprimer für <i>G. sulfurreducens</i> PCA
53	Bacteria 27F	AGAGTTTGATCMTGGC TCAG	Vorwärtsprimer für 16S Sequenz von Bacteria (Rainey <i>et al.</i> , 1992)
54	Bacteria 1525R	AGAAAGGAGGTGWTCC ARCC	Rückwärtsprimer für 16S Sequenz von Bacteria (Rainey <i>et al.</i> , 1992)

#### 4 Sonden

Für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) Experimente wurden die Sonden und wenn nötig die Helferoligonukleotide aus Tabelle 4 verwendet. Die Hydrolyse-Sonden aus Tabelle 5 wurden für die quantitative PCR (qPCR) eingesetzt.

**Tab. 4: FISH-Sonden.** Alle verwendeten Sonden wurden bei Eurofins (Hamburg) mit entweder FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) oder Cy3 (Cyanin 3) am 5'-Ende bestellt. Alle Helfersonden wurden bei Sigma-Aldrich (Steinheim) gekauft. Die verwendete Formamid-Konzentration (FA) ist angegeben.

Sonde	Ziel	Sequenz (5' -> 3')	Spezifität	Referenz	FA [%]
ARCH915	16S rRNA	GTGCTCCCCCGCC AATTCCT	Archaeen Domäne	(Amann <i>et al.</i> , 1990a)	20
EUB399-I	16S rRNA	GCTGCCTCCCGTA GGAGT	Eubacteria Domäne	(Amann <i>et al.</i> , 1990a)	0 - 50
GEO1	16S rRNA	AGAATCCAAGGA CTCCGT	<i>G. metallireducens</i>	(Summers <i>et al.</i> , 2010)	20
HGEO1-1	Helfersonde für GEO1	GAAGGTCCCCCCC TTTTCCCGC		diese Arbeit	
HGEO1-2	Helfersonde für GEO1	GGGCTTATCCGGT ATTAGCACC		diese Arbeit	
GEO2	16S rRNA	GAAGACAGGAGG CCCGAAA	<i>G. sulfurreducens</i>	(Richter <i>et al.</i> , 2007)	20
HGEO2-1	Helfersonde für GEO2	GTCCCCCCTTTTC CCGCAAGA		(Richter <i>et al.</i> , 2007)	
HGEO2-2	Helfersonde für GEO2	CTAATGGTACGCG GACTCATCC		(Richter <i>et al.</i> , 2007)	
GEO3-A	16S rRNA	CCGCAACACCTAG TACTCATC	<i>Geobacter</i> Cluster	(Richter <i>et al.</i> , 2007)	30
GEO3-B	16S rRNA	CCGCAACACCTAG TTTCATC	<i>Geobacter</i> Cluster	(Richter <i>et al.</i> , 2007)	30
HGEO3-3	Helfersonde für GEO3	GTTTACGGCGGG TACTACC		(Richter <i>et al.</i> , 2007)	
HGEO3-4	Helfersonde für GEO3	CACTGCAGGGGT CAATAC		(Richter <i>et al.</i> , 2007)	
SHEW227	16S rRNA	AGCTAATCCCACC TAGGTWCATC	<i>Shewanella</i> spp.	(Huggett <i>et al.</i> , 2008)	40

**Tab. 5: Hydrolyse-Sonden.** Alle Hydrolyse-Sonden wurden bei Biomers (Ulm) gekauft. An das 5'-Ende sind verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe (Hexachloro-6-carboxy-fluorescein [HEX], 6-Carboxy-X-rhodamin [ROX], Cyanin 5 [CY5] und 6-Carboxy-Fluorescein [FAM]) gebunden und am 3'-Ende entsprechende „Quencher“, die die Fluoreszenz unterdrücken (engl. *black hole quencher* - BHQ).

Name	Spezifität	Sequenz (5' -> 3')	am 5'	am 3'
Hydrolyse-Sonde S.o.B	<i>S. oneidensis</i> <i>barcode</i>	CGTTCTCCTTGCTCTCCGTGT	HEX	BHQ-1
Hydrolyse-Sonde G.s.B	<i>G. sulfurreducens</i> <i>barcode</i>	CTCACCTCACTTCTCCTGTCCTTC	ROX	BHQ-2
Hydrolyse-Sonde G.m.B	<i>G. metallireducens</i> <i>barcode</i>	TGCTGGTTCCTCTACGATGGC	Cy5	BHQ-2
Hydrolyse-Sonde E.c.B	<i>E. coli barcode</i>	TCCCTGAATCCCAACTCGCTC	Fam	BHQ-1

## 5 Chemikalien, Enzyme und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurde, soweit nicht anders vermerkt, bei Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Life Technologies (Darmstadt), Roche (Mannheim), AppliChem (Darmstadt), VWR (Darmstadt) oder Riedel-de Haën (Seelze) bestellt. Verwendete Enzyme, Reagenzien und Kits sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Kits, Enzyme und Farbstoffe.**

Produkt	Hersteller
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Appllichem (Darmstadt)
50 bp DNA Ladder	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
6x DNA Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
Alkaline Phosphatase	Roche (Grenzach-Whylen)
BamHI	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
Citiflour AF1	Citiflour Lt. (London, England)
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit	Biozym (Hessisch Oldendorf)
DyNAmo ColorFlash Probe Green qPCR Kit	Biozym (Hessisch Oldendorf)
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
HindIII	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
innuPREP Stool DNA Kit	Analytik Jena (Jena, Deutschland)
iProof High-Fidelity Polymerase	Biorad (München)
MangoMix	Bioline (Luckenwalde)
MidoriGreen	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Sall	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
SYTO 45	Invitrogen (Darmstadt)
T5-Exonuklease	Epicentre (Madison, USA)
Taq-DNA Ligase	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
Vectashield H1000	Linaris (Wertheim)
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega (Mannheim)
Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System	Promega (Mannheim)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)

## II.II Methoden

### 1 Anreicherung

#### 1.1 Aerobe Anreicherung

Aerobe Kulturen von *Shewanella* und Kulturen von *Escherichia* Stämmen wurden bei 30°C bzw. 37°C in LB-Medium (engl. *Lysogeny broth* - LB; 20 g/l) bei 130 - 150 rpm kultiviert (innova®44, Eppendorf, Hamburg). Antibiotika wurden falls nötig entsprechend zugegeben. Das Medium für Kulturen von *E. coli* WM3064 wurde mit 0,3 mM 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) komplementiert.

Für die Transformation von *E. coli* wurden elektrokompetente Zellen in SOB Medium (engl. *super optimal broth* – SOB) gezüchtet (Tab. 7) und anschließend das SOC Medium (engl. *super optimal broth with catabolite repression* – SOC) (Tab. 8) für die Regeneration der elektroporierten Zellen verwendet.

**Tab. 7: Zusammensetzung des SOB.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
Trypton	20 g/l	2%
Hefeextrakt	5 g/l	0,5%
NaCl	0,58 g/l	10 mM
1 M KCl	2,5 ml/l	2,5 mM
Aqua dest.	ad 1 l	

**Tab. 8: Zusammensetzung des SOC.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
SOB	944 ml/l	-
1 M MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	20 ml/l	20 mM
10% Glucose	36 ml/l	0,36%

## 1.2 Anaerobe Anreicherung

Für die Untersuchung der Interaktion von Bakterien mit verschiedenen Anodenmaterialien wurde vorab ein Medium entwickelt, in dem alle vier ausgewählten Modellorganismen wachsen konnten (Tab. 9). Die aerobe Vorkultur von *S. oneidensis* MR-1 wurde zuerst in das PBS-Medium (Tab. 10) überimpft (0,1% Inokulum). Die Spurenelemente (Tab. 11) wurden der Reihe nach in Reinstwasser gelöst, anschließend autoklaviert und bei 4°C gelagert.

**Tab. 9: Anaerobes Medium I.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
10fach Salze (Tab. 12)	100 ml/l	-
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,21 g/l	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
Dinatrium-Fumarat	6,4 g/l	40 mM
Natrium-Nitrat	0,85 g/l	10 mM
Natrium-Lactat (50% (w/w))	4,48 g/l	20 mM
Natrium-Acetat	0,82 g/l	10 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
Aqua dest.	ad 980 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
0,5 M Cystein	2 ml/l	1 mM
400 mM Eisen(III)-Citrat	2,5 ml/l	1 mM
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
2,6 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2 ml/l	5,1 mM
pH 7,2		

**Tab. 10: Zusammensetzung des PBS-Mediums.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
NaCl	8 g/l	137 mM
KCl	0,2 g/l	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,78 g/l	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/l	1,76 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,18 g/l	8,9 mM
Fumarsäure	11,6 g/l	100 mM
NaOH Flocken	8 g/l	200 mM
Natrium-Lactat (50% (w/w))	11,2 g/l	50 mM
Caseinhydrolysat	1 g/l	0,1 % (w/v)
<i>Shewanella</i> Spurenelemente 100x (Tab. 11)	10 ml/l	-
1 M MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	1 mM
100 mM CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,1 mM
pH 7,4		
Aqua dest.	ad 1 l	

Für das PBS-Medium wurden die Salze eingewogen und in Reinstwasser gelöst. Bevor das Volumen mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt wurde, wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Medium à 50 ml in 100 ml-Flaschen abgefüllt, mit einem Gummistopfen und Lochdeckel verschlossen und an der Anaerobisierungsanlage die Gasphase gewechselt. Dazu wird unter Schütteln mit 99% Stickstoff begast und unter Vakuum entgast. Die Zyklen dauerten je nach Anaerobisierungsanlage 1 - 2 min und es wurden ca. 15 Zyklen gefahren. Danach wurde der Überdruck abgelassen und die Flaschen autoklaviert. Nach Inkubation im PBS-Medium konnte *S. oneidensis* in das Medium, in dem alle vier Bakterien wachsen konnten (Anaerobes Medium I) (Tab. 9) überimpft werden (10% Inokulum). *G. sulfurreducens* PCA, *G. metallireducens* GS-15 und *D. propionicus* Lindhorst (1pr3) wurden im anaeroben Medium I (Tab. 9) gezüchtet (10% Inokulum) und in diesem auch eingefroren (siehe 1.3.).

**Tab. 11: *Shewanella* Spurenelemente 100x.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> EDTA	2,5 g/l	67,2 µM
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	22 mg/l	1,3 µM
NaCl	58,4 mg/l	10 µM
Fe(II)Cl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O	107,4 mg/l	5,4 µM
CoCl <sub>2</sub>	64,9 mg/l	5 µM
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	28,8 mg/l	1 µM
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	5,0 mg/l	0,2 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	350 mg/l	56,6 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	94,4 mg/l	3,9 µM
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	118,9 mg/l	5 µM
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	39,5 mg/l	1,5 µM
Aqua dest.	ad 1 l	

Alle CO<sub>2</sub>-gepufferten Medien wurden strikt anaerob hergestellt, d.h. nach dem Einwiegen der Salze und Auffüllen auf das gewünschte Volumen, wurde das Medium in eine 1 l Flasche abgefüllt und mit Aluminiumfolie verschlossen. Anschließend wurde das Medium unter Rühren auf einer Platte aufgekocht, damit kein Sauerstoff mehr im Medium gelöst war. Nach dem Aufkochen wurde die Flasche mit einem Gummistopfen und Lochdeckel verschlossen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach konnte mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> für ca. 30 min begast werden.

Es wurde ein 10faches Konzentrat der Salze in Reinstwasser angesetzt (Tab. 12) und autoklaviert. Für die NB-Spurenelemente (Tab. 13) wurde im ersten Schritt die Nitritotriessigsäure in Reinstwasser unter Zugabe von KOH bis pH 6,5 titriert. Anschließend wurden alle weiteren Salze schrittweise gelöst. Zum Schluss wurde das Volumen auf 1 l mit Reinstwasser eingestellt und autoklaviert. Die NB Spurenelemente wurden dann bei 4°C gelagert.

Die Salze für die Selenit-Wolframat Lösung (Tab. 14) wurden in Reinstwasser gelöst und auf 1 l eingestellt.

**Tab. 12: 10fach Salze.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,2 g/l	30 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,2 g/l	10 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	2,0 g/l	40 mM
KCl	3,8 g/l	50 mM
NaCl	3,6 g/l	60 mM
Aqua dest.	ad 1 l	

**Tab. 13: NB Spurenelemente 100x.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
Nitrilotriessigsäure	2,14 g/l	11,2 mM
mit KOH auf pH 6,5 einstellen		
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l	0,5 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l	1,1 mM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,17 g/l	0,7 mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l	0,7 mM
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l	1,8 mM
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0,005 g/l	10,5 $\mu\text{M}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,005 g/l	80,9 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,11 g/l	0,5 mM
$\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,11 g/l	0,4 mM
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l	0,6 mM
Aqua dest.	ad 1 l	

**Tab. 14: Selenit-Wolframat.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
NaOH	0,5 g/l	13 mM
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	3 mg/l	17 µM
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	4 mg/l	12 µM
Aqua dest.	ad 1 l	

**Tab. 15: Vitaminlösung.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
Biotin	2 mg/l	8,1µM
Folsäure	2 mg/l	4,5 µM
Pyridoxin-HCl	10 mg/l	48,6 µM
Thiamin-HCl	5 mg/l	14,8 µM
Riboflavin	5 mg/l	13,3 µM
Nicotinsäure	5 mg/l	40,6 µM
DL-CaPantothenat	5 mg/l	10,5 µM
Vitamin B12	0,1 mg/l	0,07 µM
p-Aminobenzoessäure	5 mg/l	36,5 µM
Liponsäure	5 mg/l	24,2 µM
Aqua dest.	ad 1 l	

Nach dem Autoklavieren wurden die CO<sub>2</sub>-gepufferten Medien mit sterilen und anaeroben Lösungen komplementiert. Die Vitaminlösung (Tab. 15) wurde in sterile Flaschen mit Gummistopfen und Lochdeckel sterilfiltriert, mit sterilen Stickstoff anaerobisiert und danach im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Die Hefeextraktlösung und die Cysteinlösung wurden auch wie die Vitaminlösung hergestellt. Für die Eisen(III)-Citrat-Lösung wurde 9,8 g Eisen(III)-Citrat abgewogen und mit Reinstwasser in der Mikrowelle so lange gekocht, bis alle Partikel gelöst waren. Anschließend wurde mit 1 M NaOH langsam der pH-Wert auf 7 eingestellt, mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt, anaerobisiert und autoklaviert.

Die Natrium-Ascorbat- und die Kalziumchlorid-Lösungen konnten hingegen in anaerobe Flaschen mit Gummistopfen abgefüllt werden, dann anaerobisiert und schließlich autoklaviert werden.

Nach dem Komplementieren wurden alle CO<sub>2</sub>-gepufferten Medien mit steriltrierter und anaerober 1 M NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Dazu wurden dem Medium Proben entnommen und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß der pH mit dem pH-Meter FiveEasy ausgestattet mit der pH-Sonde InLab Micro (Mettler-Toledo, Gießen) gemessen. Anschließend wurde dem Medium entsprechend 1 M NaOH zugegeben, erneut eine Probe entnommen und gemessen. Dies wurde so oft wiederholt, bis der pH eingestellt war. Danach wurde das Medium im Dunkeln gelagert.

Für die Kultivierung wurden entweder 10 ml der Medien in sterile, anaerobe Hungates mit einer Spritze und Ausgleichskanüle gefüllt und anschließend steril mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> für 2 - 5 min begast, oder es wurden mittels Gasdruck 20 - 200 ml in entsprechende anaerobe und sterile Glasflaschen überführt. Dazu wurde steril mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> Druck in die Mediumsflasche gegeben. In diese Flasche wurde eine zweite Kanüle gesteckt, darauf ein Metalladapter und eine weitere Kanüle. Die letzte Kanüle wurde nun in eine sterile, anaerobe Kultivierungsflasche gesteckt, in der bereits eine Ausgleichskanüle steckte. Nun wurde erst kurz die Gasphase gewechselt, bevor die Mediumsflasche so gehalten wurde, dass durch diese Doppelkanülenkonstruktion Medium aus der Mediumsflasche in die kleinere Kultivierungsflasche fließen konnte. War das gewünschte Volumen erreicht, wurde zuerst die Mediumsflasche wieder abgestellt, dann die Ausgleichskanüle in der Kultivierungsflasche gezogen und dann die Doppelkanülenkonstruktion abgebaut.

Für die großen Brennstoffzellen wurden die Bakterienstämme in dem anaeroben Medium II, entsprechend ihrer Elektronendonator- und Elektronenakzeptor-Spezifität, kultiviert (Tab. 16).

Für *S. oneidensis* konnte direkt mit der LB-Kultur das anaerobe Medium II angeimpft werden (1 % Inokulum), da als Elektronendonator nur 20 mM Natrium-Lactat und als Elektronenakzeptor 40 mM Dinatrium-Fumarat verwendet wurde. Für *G. sulfurreducens* hingegen wurde ein Medium mit 10 mM Natrium-Acetat, 20 mM Natrium-Lactat und 40 mM Dinatrium-Fumarat angefertigt. *G. metallireducens* wurde mit 10 mM Natrium-Acetat, 4,4 mM Natrium-Propionat und 10 mM Natrium-Nitrat gezüchtet.

**Tab. 16: Grundmedium für anaerobes Medium II.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
10fach Salze (Tab. 12)	100 ml/l	-
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,21 g/l	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
entsprechender Elektronendonator	-	-
entsprechender Elektronenakzeptor	-	-
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
Aqua dest.	ad 960 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
20% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,2% (w/v)
0,5 M Cystein	5 ml/l	2,5 mM
400 mM Eisen(III)-Citrat	2,5 ml/l	1 mM
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,4 mM
2% Pepton aus Casein	10 ml/l	0,02%
pH 7,2		

Für die Transformation von den *Geobacter* Stämmen wurden diese in speziellen Medien nach Coppi *et al.* (Coppi *et al.*, 2001) und Oberender *et al.* (Oberender *et al.*, 2012) gezüchtet (Tab. 17 - Tab. 21). Für *G. sulfurreducens* wurde der pH-Wert auf 6,7 eingestellt und für *G. metallireducens* auf 7,0. Des Weiteren wurden für *G. metallireducens* spezielle Spurenelemente (SL-10, Tab. 20) verwendet.

**Tab. 17: Medium für die Transformation von *G. sulfurreducens*.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42 g/l	3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,22 g/l	1 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g/l	4 mM
KCl	0,38 g/l	5 mM
NaCl	0,36 g/l	6 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,04 g/l	0,3 mM
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l	0,4 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
Dinatrium-Fumarat	6,4 g/l	40 mM
Natrium-Acetat	1,24 g/l	15 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
0,1% Resazurin	0,5 ml/l	0,000 05%
100 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	1 ml/l	0,1 mM
Aqua dest.	ad 970 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
0,5 M Cystein	10 ml/l	5 mM
pH 6,7		

**Tab. 18: Medium für die Regeneration von *G. sulfurreducens*.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,17 g/l	38 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,09 g/l	12 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g/l	4 mM
KCl	0,38 g/l	5 mM
NaCl	0,36 g/l	6 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,04 g/l	0,3 mM
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l	0,4 mM
Dinatrium-Fumarat	6,4 g/l	40 mM
Natrium-Acetat	1,24 g/l	15 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
0,1% Resazurin	0,5 ml/l	0,000 05%
100 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	1 ml/l	0,1 mM
pH 6,7		
Aqua dest.	ad 970 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
0,5 M Cystein	10 ml/l	5 mM
pH 6,7		

**Tab. 19: Medium für die Transformation von *G. metallireducens*.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42 g/l	3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,22 g/l	1 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g/l	4 mM
KCl	0,38 g/l	5 mM
NaCl	0,36 g/l	6 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,04 g/l	0,3 mM
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l	0,4 mM
NaNO <sub>3</sub>	1,27 g/l	15 mM
Natrium-Acetat	1,23 g/l	15 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
SL-10 (Tab. 20)	1 ml/l	-
100 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	1 ml/l	0,1 mM
Aqua dest.	ad 970 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
0,5 M Cystein	10 ml/l	5 mM
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
pH 7,0		

**Tab. 20: Spurenelemente SL-10.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
25% HCl	10 ml/l	0,25%
FeCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	1,5 g/l	7,5 mM
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg/l	0,5 mM
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	100 mg/l	0,5 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg/l	0,1 mM
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	190 mg/l	0,8 mM
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2 mg/l	0,01 mM
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	24 mg/l	0,1 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	36 mg/l	0,1 mM
Aqua dest.	ad 1 l	

**Tab. 21: Medium für die Regeneration von *G. metallireducens*.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,22 g/l	31 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,31 g/l	19 mM
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/l	28 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,6 g/l	4 mM
KCl	0,1 g/l	1 mM
NaCl	0,1 g/l	2 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l	0,7 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l	0,5 mM
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l	0,4 mM
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,005 g/l	25 µM
NaMoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,001 g/l	5 µM
NaNO <sub>3</sub>	1,27 g/l	15 mM
Natrium-Acetat	2,46 g/l	30 mM
SL-10 (Tab. 20)	1 ml/l	-
pH 7,0		
Aqua dest.	ad 980 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
pH 7,0		

Die Wachstumsversuche mit den vier Wildtyp-Stämmen wurde im Anaerobenmedium I durchgeführt (Tab. 9). Für den direkten Vergleich der Eisenreduktion von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* wurde das Anaerobenmedium I verwendet, wobei alle Elektronenakzeptoren durch Eisen(III)-Citrat ersetzt wurden (Tab. 22). Dafür wurde zuerst das Eisen(III)-Citrat wie die 400 mM Eisen(III)-Citrat für das anaerobe Medium I hergestellt, anschließend wurden die restlichen Zutaten zugegeben.

**Tab. 22: Anaerobes Medium I mit Eisen(III)-Citrat als Elektronenakzeptor.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
Eisen(III)-Citrat	9,8 g/l	40 mM
10fach Salze (Tab. 12)	100 ml/l	-
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,21 g/l	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
Lactat	2,24 g/l	10 mM
Natrium-Acetat	0,41 g/l	5 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
Aqua dest.	ad 980 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
0,5 M Cystein	2 ml/l	1 mM
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
2,6 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2 ml/l	5,1 mM
pH 7,2		

### 1.3 Stammkulturhaltung

Von allen Stämmen wurden Gefrierkulturen hergestellt. Dazu wurden *Shewanella* und *Escherichia* Kulturen in LB gezüchtet und davon je 900 µl mit 100 µl DMSO in Gefrierkulturgefäße gefüllt. Anschließend wurden die Gefäße in flüssigem Stickstoff

Schock gefroren, bevor sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Zum erneuten Animpfen der Kulturen konnte jeweils mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Zellmasse entnommen werden.

Beide *Geobacter* Stämme wurden im jeweiligen Medium kultiviert und unter Sauerstoffausschluss wurden je  $100\ \mu\text{l}$  DMSO mit  $900\ \mu\text{l}$  Kultur in Gefrierkulturgefäße gefüllt. Für *D. propionicus* Lindhorst (1pr3) wurde  $1\ \text{ml}$  Kultur mit  $50\ \mu\text{l}$  DMSO Schock gefroren. Das weitere Vorgehen war wie bei den aeroben Stämmen. Allerdings musste zur Regeneration des Stammes ein ganzes Gefrierkulturgefäß im Kühlschrank unter anoxischen Bedingungen langsam aufgetaut werden. Danach konnte die komplette Kultur in  $10\ \text{ml}$  des entsprechenden Mediums überführt werden.

### 1.4 Platten

Sowohl für *Shewanella* als auch für *Escherichia* Stämme wurden LB-Agar Platten ( $20\ \text{g Agar/l}$ ) verwendet, unter aeroben Bedingungen gegossen und entsprechend bei  $30^{\circ}\text{C}$  bzw.  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Des Weiteren wurden für die Selektion auf Doppelcrossover-Ereignisse bei der Mutation von *S. oneidensis*  $10\%$  (w/v) Saccharose-LB-Agarplatten verwendet. Dazu wurde ein 1,5fach konzentrierter LB-Agar autoklaviert und anschließend wieder erhitzt. Diesem Konzentrat wurde eine 3fach konzentrierte, sterilfiltrierte Saccharose-Lösung im Verhältnis 2:1 zugegeben.

Für die *Geobacter* Stämme wurden mit dem entsprechenden Medium  $1,5\%$  Agarplatten unter anoxischen Bedingungen gegossen (Tab. 23 + Tab. 24). Dazu wurde  $96$  bzw.  $97,25\ \text{ml}$  Medium mit  $1,5\ \text{g Agar}$  anaerobisiert und autoklaviert. Die Flasche wurde danach auf  $60^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und komplementiert. Die Platten wurden unter anoxischen Bedingungen gegossen und in anaeroben Gefäßen mit  $80\% \text{ N}_2 / 20\% \text{ CO}_2$  erstarren lassen. Dazu wurden entweder Anaerobentöpfe mit Gasanschluss verwendet und für  $20\ \text{min}$  mit  $80\% \text{ N}_2 / 20\% \text{ CO}_2$  begast, oder es wurden Anaerobentöpfe ohne Gasventil verwendet und dann mit  $1,68\ \text{g NaHCO}_3$  und  $1\ \text{M HCl}$  eine  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre hergestellt. Die Kultivierung fand bei  $30^{\circ}\text{C}$  statt.

**Tab. 23: Agar-Medium für *G. sulfurreducens*.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42 g/l	3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,22 g/l	1 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g/l	4 mM
KCl	0,38 g/l	5 mM
NaCl	0,36 g/l	6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
Dinatrium-Fumarat	6,4 g/l	40 mM
Natrium-Acetat	1,24 g/l	15 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
0,1% Resazurin	0,5 ml/l	0,000 05%
100 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	1 ml/l	0,1 mM
Aqua dest.	ad 960 ml	
pH 6,7		
autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
0,5 M Cystein	10 ml/l	5 mM
54 mM CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	5 ml/l	0,3 mM
81 mM MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	5 ml/l	0,4 mM

**Tab. 24: Agar-Medium für *G. metallireducens*.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
NaHCO <sub>3</sub>	3,36 g/l	40 mM
NaNO <sub>3</sub>	1,27 g/l	15 mM
KCl	0,1 g/l	1,3 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,11 g/l	2,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,86 g/l	6,3 mM
pH auf 7,0		
Aqua dest.	ad 972,5 ml	
autoklavieren		
400 mM Eisen(III)-Citrat	2,5 ml/l	1 mM
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
SL-10 (Tab. 20)	1 ml/l	-
Vitaminlösung	10 ml/l	-
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
0,8 M MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,8 mM
0,1 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,1 mM
3 M Natrium-Acetat	10 ml/l	30 mM

## 2 Molekularbiologische Methoden

### 2.1 DNA-Isolierung

Für die Isolierung von DNA wurde das innuPREP Stool DNA Kit (Analytik Jena) verwendet und nach Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen gearbeitet. Für die Eichgerade der qPCR wurde erst die Verdünnungsreihe in sechs Schritten im Triplikat angesetzt und dann DNA isoliert. Von Flüssigkulturen wurde je 1 ml Probe bei 16873 g für 2 min zentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg), 800 µl Überstand verworfen und mit dem restlichen Überstand resuspendiert.

Für die Isolierung der DNA von Anoden wurde diese halbiert und jede Hälfte im separaten 1,5 ml-Reaktionsgefäß weiterverwendet. Im letzten Schritt der DNA-Isolierung wurden alle Proben mit je 100 µl Elutionspuffer eluiert.

## 2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) dient zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die Oligonukleotide, welche als Primer in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3 dargestellt. Als Polymerase wurde die iProof-Polymerase benutzt, wenn das PCR-Produkt anschließend zur Klonierung weiterverwendet wurde. Die Reaktion wurde in 50  $\mu\text{l}$  Volumina (Tab. 25) in den Thermocyclern C1000 oder S1000 (Biorad, München) durchgeführt (Tab. 26).

Um zwei PCR-Fragmente zu einem PCR-Fragment zusammensetzen, wurde eine 2-step PCR mit der iProof-Polymerase angesetzt (Tab. 27). Eine Voraussetzung ist, dass die beiden Fragmente 25-30 nt Überhänge zueinander haben.

**Tab. 25: Komponenten einer iProof PCR.**

Komponente	Menge
Vorwärtsprimer (2 pmol/ $\mu\text{l}$ )	12,5 $\mu\text{l}$
Rückwärtsprimer (2 pmol/ $\mu\text{l}$ )	12,5 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	10 $\mu\text{l}$
5x GC Puffer	10 $\mu\text{l}$
100% DMSO	2,5 $\mu\text{l}$
10 mM dNTPs	1 $\mu\text{l}$
iProof (2 units * $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Template (50 – 100 ng * $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,5 $\mu\text{l}$

**Tab. 26: PCR-Programm.** Schritt 2 - 4 wurde 30 Mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	98°C	2:30 min	Initiale Denaturierung
2	98°C	0:10 min	Denaturierung
3	55°C	0:30 min	Anlagern der Primer
4	72°C	1 kb/min	Synthese
5	72°C	5:00 min	Finale Elongation
6	12°C		Ende

Für die Überprüfung ob eine Transformation erfolgreich verlaufen war, wurde mit dem MangoMix eine Kolonie-PCR angesetzt (Tab. 28; Tab. 29). Der Vorteil des MangoMix ist, dass es ein fertiger 2facher Mastermix ist, allerdings hat die Polymerase keine proof-reading Funktion. Daher wurde auf die Verwendung von MangoMix verzichtet, wenn die Amplifikate anschließend kloniert werden sollten.

Vor der Weiterverwendung der PCR-Fragmente, wurden sie mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega nach Herstellerangaben auf gereinigt.

**Tab. 27: Komponenten einer 2-step PCR.**

Komponente	Menge
Vorwärtsprimer (2 pmol/ $\mu$ l)	12,5 $\mu$ l
Rückwärtsprimer (2 pmol/ $\mu$ l)	12,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l
5x GC Puffer	10 $\mu$ l
100% DMSO	2,5 $\mu$ l
10 mM dNTPs	1 $\mu$ l
iProof (2 units * $\mu$ l <sup>-1</sup> )	0,5 $\mu$ l
Template Teil 1 (50 – 100 ng * $\mu$ l <sup>-1</sup> )	3 $\mu$ l
Template Teil 2 (50 – 100 ng * $\mu$ l <sup>-1</sup> )	3 $\mu$ l

**Tab. 28: Komponenten einer MangoMix-PCR.**

Komponente	Menge
2x MangoMix	15 $\mu$ l
Vorwärtsprimer (2 pmol/ $\mu$ l)	7,5 $\mu$ l
Rückwärtsprimer (2 pmol/ $\mu$ l)	7,5 $\mu$ l
Template (50 – 100 ng * $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 Kolonie

**Tab. 29: PCR-Programm einer MangoMix Reaktion.** Schritt 2 - 4 wurde 30 Mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	95°C	2:30 min	Initiale Denaturierung
2	95°C	0:30 min	Denaturierung
3	50°C	0:30 min	Anlagern der Primer
4	72°C	2kb/min	Synthese
5	72°C	5:00 min	Finale Elongation
6	4°C		Ende

## 2.3 Klonierungstechniken

### 2.3.1 Restriktion

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden innerhalb der Sequenz. Dadurch wird aus einem ringförmigen Plasmid ein lineares DNA-Fragment mit spezifischen Überhängen an den 3'-Enden. Entsprechend können auch die Enden eines anderen DNA-Fragments mit entsprechenden Überhängen versehen werden. Die Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) verwendet. Die Inkubationszeit betrug für „high fidelity“ Enzyme 30 min und für alle anderen Enzyme 1 h. Die Reaktion wurde durch Wechsel des Puffers bei der Aufreinigung mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System gestoppt.

### 2.3.2 Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation eines linearen Vektors, der nur mit einem Enzym geschnitten wurde, zu verhindern, wurde der Vektor dephosphoryliert. Dies erfolgte mit dem Dephosphorylierungs-Kit von Roche. Dazu wurden 44 µl linearer Vektor mit 1 µl Alkalischer Phosphatase und 5 µl Dephosphorylierungspuffer 1 h bei 37°C inkubiert.

### 2.3.3 Isothermale *in vitro* Ligation

Zum Einfügen eines PCR-Produktes in einen linearen Vektor wurde die isothermale *in vitro* Ligation nach Gibson *et al.* (Gibson *et al.*, 2009) (Tab. 30 – 33) verwendet. Dazu müssen das PCR-Fragment und das linearisierte Plasmid an den Enden 35 nt Überhang zueinander haben. Es wurde je ein 20 µl Ansatz gestartet (Tab. 30). Der Mastermix

besteht aus drei Enzymen (Tab. 31). Als erstes wirkt die hitzelabile T5-Exonuklease, die an 5'-Enden Nukleotide abspaltet. Diese muss in einem speziellen Aufbewahrungspuffer gelagert werden (Tab. 33). Danach wird der Ansatz bei 50°C für 1 h inkubiert, wobei die T5-Exonuklease inaktiviert wird. Homologe und freie 3'-Enden lagern sich aneinander und dienen als Startpunkt für das nächste Enzym, die iProof Polymerase. Zuletzt verknüpft die Taq-DNA Ligase das Rückgrat der DNA.

**Tab. 30: Zusammensetzung eines *in vitro* Ligationsansatzes.**

Substanz	Menge
<i>in vitro</i> Ligation-Mastermix	15 µl
DNA	5 µl

**Tab. 31: Zusammensetzung des *in vitro* Ligation-Mastermix.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
5-fach Reaktionspuffer (Tab. 32)	200 µl/ml	1-fach
iProof Polymerase (2 U/µl)	12,5 µl/ml	0,025 U/µl
Taq-DNA Ligase (40 U/µl)	100 µl/ml	4 U/µl
T5-Exonuklease (0,1 U/µl) in Aufbewahrungspuffer	40 µl/ml	0,004 U/µl
ddH <sub>2</sub> O	597,5 µl/ml	-

Der Mastermix wurde in 15 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

**Tab. 32: Zusammensetzung des 5-fach Reaktionspuffers.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 7,5	500 µl/ml	500 mM
1 M MgCl <sub>2</sub>	50 µl/ml	50 mM
0,01 M dNTP-Mix	10 µl/ml	1 mM
1 M DTT	50 µl/ml	50 mM
0,1 M NAD	50 µl/ml	5 mM
PEG-8000	250 mg/ml	25%
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 ml	

**Tab. 33: Zusammensetzung des Aufbewahrungspuffers für die T5-Exonuklease.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 7,5	50 µl/ml	50 mM
1 M NaCl	100 µl/ml	100 mM
1 M DTT	1 µl/ml	1 mM
0,05 M EDTA	2 µl/ml	0,1 mM
Triton X-100	1 mg/ml	0,1%
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 ml	

## 2.4 Transformationstechniken

### 2.4.1 Herstellung von chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Eine *E. coli* Kultur wurde in 5 ml LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,3 – 0,4 gezüchtet und dann für 15 min auf Eis inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt. Der Ansatz wurde bei 6000 rpm für 1 min abzentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf) und der Überstand verworfen. Am Ende wurde das Pellet in 1 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen und Aufnahme in 0,5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung waren die chemisch kompetenten Zellen gebrauchsfertig.

### 2.4.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden je 150 µl Zellen mit 20 µl Plasmid bzw. Wasser (Negativkontrolle) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 2,5 min ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt, bevor erneut für 10 min auf Eis inkubiert wurde. Bei Ampicillin als Selektionsmarker konnte sofort auf Agar-Platten mit der entsprechenden Ampicillin-Konzentration ausplattiert werden.

### 2.4.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Es wurde eine Übernachtskultur in LB gezüchtet, um am nächsten Tag 50 ml SOB (Tab. 7) mit 1% dieser Übernachtskultur anzuimpfen. Diese Kultur wurde bis zu einer OD bei 600 nm von 0,5 – 0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur für 20 – 30 min

auf Eis inkubiert, um den Stoffwechsel zu verlangsamen. Danach wurden die Zellen dreimal für 5 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5810 R mit Rotor LL025 F-34-6-38, Eppendorf). Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Pellet mit 4°C kaltem, sterilem Reinstwasser resuspendiert, um eine Suspension mit möglichst geringer Salzkonzentration zu erhalten. Beim letzten Schritt wurden die Zellen in 2 ml Reinstwasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

### **2.4.4 Elektroporation von *E. coli* Zellen**

Um auch die Salzkonzentration von Klonierungsreaktionen zu verringern, wurden die *in vitro*-Klonierungsansätze dialysiert. Dazu wurde in eine Petrischale Reinstwasser gegeben und eine Dialysemembran (Milipore GmbH, Eschborn; VSWP 02500, Typ: VS, 0,025 µm Porengröße) auf die Wasseroberfläche gelegt. Auf diese Dialysemembran wurde der Klonierungsansatz als Tropfen pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 min entsalzt.

Für die Elektroporation wurden je 100 µl kompetente Zellen in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette, 0,1 cm elektrischer Abstand, Biorad, München) gegeben. Von dem dialysierten *in vitro*-Klonierungsansatz wurde alles dazu gegeben. Als Positivkontrolle wurde der entsprechende Ausgangsvektor verwendet und für die Negativkontrolle Reinstwasser. Anschließend wurde mit dem Elektroporator (MicroPulser, Biorad, München) eine Spannung von 1,75 kV angelegt und danach sofort 500 µl SOC (Tab. 8) dazugegeben. Die Suspension wurde in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Hälfte des Ansatzes wurde sofort ausplattiert, der Rest wurde bei Raumtemperatur stehen gelassen und erst am nächsten Tag auf entsprechende LB-Agarplatten ausplattiert.

### **2.4.5 Konjugation von *E. coli* mit *S. oneidensis***

Für die Konjugation wurde der *E. coli* Stamm WM3064 verwendet, da dieser Stamm zum einen die nötige genetische Voraussetzung für Konjugation hat (*tra*-Gene) und zum anderen nur mit Zugabe von 0,3 mM DAP wächst. Die zweite Eigenschaft erleichtert nach der Konjugation das Entfernen des *E. coli* Stammes durch Benutzung von LB-Agarplatten ohne den Zusatz von DAP.

Von *E. coli* und *S. oneidensis* wurde jeweils eine Übernachtskultur unter Zugabe von Antibiotika und DAP angesetzt. Am nächsten Tag wurde je 1 ml der Kulturen in 2 ml

neues Medium überführt und erneut bei 30°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und je mit 250 µl LB-Medium resuspendiert und zusammen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt. Der gesamte Ansatz wurde auf eine LB-DAP-Agarplatte für 6 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde mit 2 ml LB-Medium der Ansatz von der LB-DAP-Agarplatte gewaschen und in ein steriles Gefäß überführt. Dieser Ansatz diente als Ausgangssuspension für eine Verdünnungsreihe (1:1; 1:5; 1:25 und 1:125) mit LB-Medium. Von jedem Verdünnungsschritt wurden 100 µl auf eine LB-Agarplatte (ohne DAP) mit entsprechender Antibiotika-Konzentration ausplattiert.

#### 2.4.6 Herstellung von elektrokompetenten *G. sulfurreducens* Zellen

30 ml *G. sulfurreducens* Kultur wurde bis zu einer OD bei 600 nm von 0,2 im Medium für die Transformation von *G. sulfurreducens* (Tab. 17) gezüchtet. Nach Einschleusen der Kultur in die anaerobe Kammer (Coy Lab Products, Michigan, USA), wurde die Kultur 30 min im Kühlschrank gelagert. Alle weiteren Schritte wurden wenn möglich auf einem Eisblock ausgeführt. Danach wurden 10 ml Kultur in sterile, anaerobe 15 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde für 1,5 min bei 6500 rpm zentrifugiert (CompactStar CS4, VWR, Darmstadt). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml kaltem Elektroporationspuffer (Tab. 34) resuspendiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand erneut verworfen und das Zellpellet mit je 1 ml DMSO-Elektroporationspuffer (10% DMSO (v/v)) resuspendiert und die Ansätze zusammengeführt. Der Elektroporationspuffer wurde sterilfiltriert und anschließend steril anaerobisiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 300 µl DMSO-Elektroporationspuffer aufgenommen.

**Tab. 34: Elektroporationspuffer für Transformation von *G. sulfurreducens*.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
HEPES pH 7,0	0,24 g/l	1 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,20 g/l	1 mM
Saccharose	60,4 g/l	175 mM
Aqua dest.		ad 1 l

#### **2.4.7 Elektroporation von *G. sulfurreducens* Zellen**

Für die Elektroporation von *G. sulfurreducens* wurde das PCR-Produkt erst dialysiert und dann in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, bevor es in die anaerobe Kammer eingeschleust wurde. In kühl gelagerte Elektroporationsküvetten wurden 100 µl elektrokompetente *G. sulfurreducens* Zellen mit 20 µl dialysiertem PCR-Produkt vermischt. Als Negativkontrolle wurden nur elektrokompetente Zellen ohne PCR-Produkt verwendet. Nach dem Elektropuls (1,75 kV) wurde je 1 ml Regenerationsmedium (Tab. 18) zugegeben und der ganze Ansatz jeweils in 9 ml Medium für Transformation (Tab. 17) für 5 h bei 30°C inkubiert. Von der Negativkontrolle wurde auf Agarplatten mit 25 µg \* ml<sup>-1</sup> Kanamycin 300 µl und als Positivkontrolle 300 µl auf Agarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert. Vom eigentlichen Elektroporationsansatz wurde 150 µl und 300 µl auf Agarplatten mit 25 µg \* ml<sup>-1</sup> Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden unter 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 30°C inkubiert.

#### **2.4.8 Herstellung von elektrokompetenten *G. metallireducens* Zellen**

Es wurde eine anaerobe 100 ml Kultur von *G. metallireducens* im Medium für die Transformation (Tab. 19) bis zu einer OD bei 600 nm von 0,4 – 0,5 gezüchtet und 30 min auf Eis inkubiert, bevor alle weiteren Schritte unter anoxischen Bedingungen stattfanden. Die Bakterienkultur wurde bei 5000 rpm für 3 min zentrifugiert (CompactStar CS 4, VWR, Darmstadt), der Überstand jeweils verworfen und mit sterilem, anaerobem Reinstwasser resuspendiert. Dies wurde zweimal wiederholt und beim dritten Mal wurde das Pellet mit 1 ml Reinstwasser aufgenommen. Wenn möglich wurden die Zellen gekühlt.

#### **2.4.9 Elektroporation von *G. metallireducens* Zellen**

Für die Transformation wurden 100 µl elektrokompetente *G. metallireducens* Zellen in eine Elektroporationsküvette gegeben und mit 180 ng dialysiertem Plasmid oder ohne (Negativkontrolle) mit 1,8 kV gepulst. Danach wurde 1 ml Medium für Regeneration (Tab. 21) zugegeben und der gesamte Ansatz unter sterilen, anaeroben Bedingungen für 5 h bei 30°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz in 10 ml Medium für die Transformation mit 50 µg \* ml<sup>-1</sup> Kanamycin überführt. Nach drei Wochen wurde auf

Agarplatten mit  $50 \mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$  Kanamycin ausplattiert und unter 80%  $\text{N}_2$  / 20%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre bei 30°C inkubiert.

## 2.5 Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob Plasmide bzw. fertige Bakterienstämme der erwarteten Sequenz entsprachen, wurde eine Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die Plasmide wurden mit dem Wizard Plus Minipreps DNA Purification System isoliert und PCR-Produkte mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mittels des Programms Geneious (Biomatters, Auckland, Neuseeland) mit den theoretischen Sequenzen abgeglichen.

## 2.6 Detaillierte Beschreibungen der Klonierung der Stämme mit Barcode

Eine spezifische synthetische DNA Sequenz („Barcode“) wurde in eine nicht-codierende DNA-Region der Stämme *S. oneidensis* MR-1, *G. sulfurreducens* PCA, *G. metallireducens* GS-15 und *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebaut (Gao *et al.*, 2010). Diese Sequenzen wurden mit dem Programm GeneDesign erstellt (Richardson *et al.*, 2010).

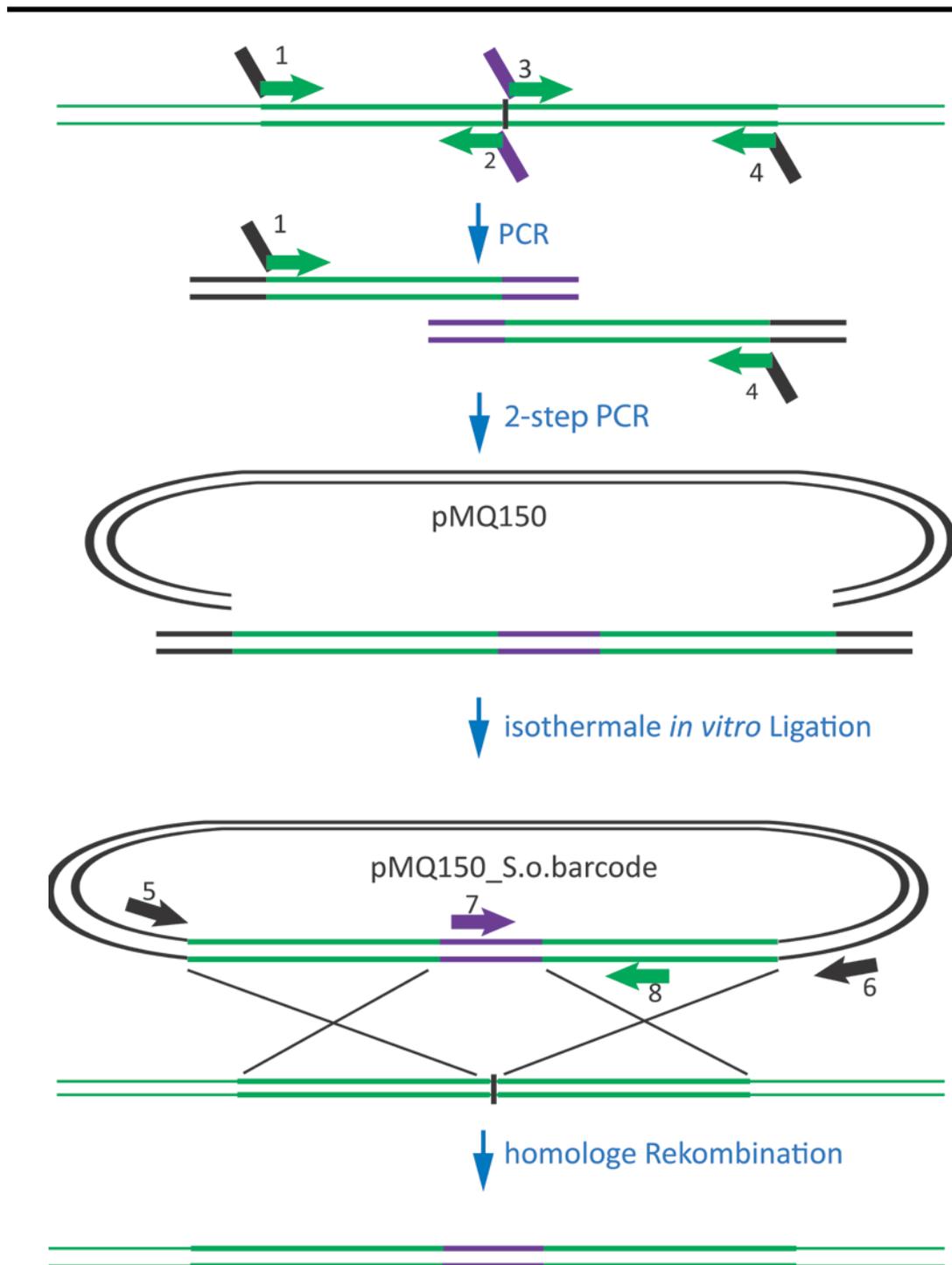
### 2.6.1 Klonierung und Transformation des *S. oneidensis* barcodes

Für die Klonierung des *S. oneidensis* barcode Stamms wurde das Plasmid pMQ150 mit BamHI und Sall linearisiert (siehe 2.3.1). Für die Klonierung wurden die Primer 1 und 4 (Tab. 3) mit jeweils einem homologen Überhang zu den Endes des linearen pMQ150 entworfen. Primer 1 und 2 amplifizieren ein 500 bp großes Fragment, das vor der Insertionsstelle im Genom liegt. Primer 3 und 4 amplifizieren das 500 bp Fragment, das sich an die Insertionsstelle anschließt. Primer 2 und 3 kodieren jeweils für die synthetische Sequenz mit einer Überschneidung von 25 nt zueinander (Abb. 9). Die Primer 1 und 4 wurden verwendet, um in einer 2-step PCR (Tab. 26 + Tab. 27) die Einzelstücke zusammen zu bauen. Das Plasmid wurde mit der isothermalen *in vitro* Ligation fertiggestellt (siehe 2.3.3.) und in *E. coli* WM3064 transformiert (siehe 2.4.3. und 2.4.4.). Die erhaltenen Kolonien wurden mit den Primern für das Plasmid pMQ150 (# 5 und 6, Tab. 3) auf die erfolgreiche Transformation des Plasmids mit einer MangoMix-PCR (Tab. 28 + Tab. 29) getestet und sequenziert (siehe 2.5.).

Mit einem richtigen Klon wurde weitergearbeitet und eine Konjugation mit *S. oneidensis* MR-1 angesetzt (siehe 2.4.5.). Der Ansatz wurde auf LB-Agarplatten mit  $25 \mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$

Kanamycin ausplattiert. Dieser Schritt ermöglicht eine Selektion auf *S. oneidensis* Zellen, die das Plasmid ins Genom eingebaut haben (engl. *first cross*). Die erhaltenen Kolonien wurden mit einer Mango-PCR (Tab. 28 + Tab. 29) und den qPCR-Primern (# 7 und 8, Tab. 3) auf das Vorhandensein der synthetischen Sequenz im Genom von *S. oneidensis* überprüft. Anschließend wurde mit einer positiven Kolonie die Integration des Plasmids mittels einer PCR mit den Primern 5 und 10 bzw. 6 und 9 (Tab. 3) getestet. Das größere der beiden PCR-Fragmente wurde mit den Primern 5 und 10 zum Sequenzieren geschickt.

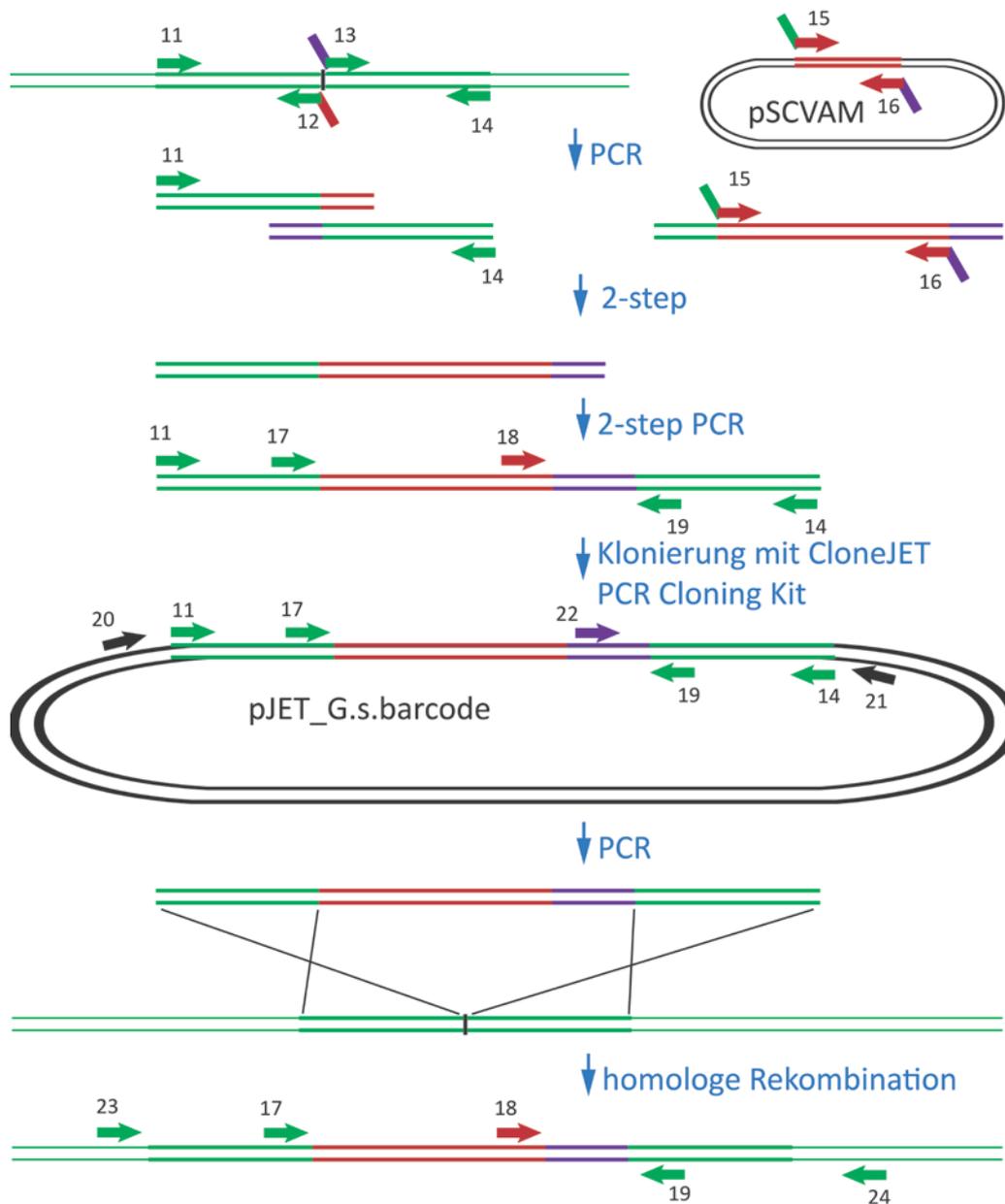
Von dieser Kolonie wurde eine Übernachtskultur in LB-Medium angesetzt und am nächsten Tag eine Verdünnungsreihe auf 10% Saccharose-LB-Agarplatten (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) ausplattiert (engl. *second cross*). In diesem Schritt wird durch einen Selektionsdruck (Saccharose) eine zweite Rekombination gewollt herbeigeführt. Im Rückgrat des pMQ150 ist das Gen *sacB* kodiert, das die Ausbildung eines Polymers ausgehend von Saccharose im Periplasma katalysiert und somit bei Anwesenheit von Saccharose letal für *Shewanella* ist. Einige Kolonien wurden mit der „Pick & Patch“ Methode erst auf einer 10% Saccharose-LB-Agarplatte, dann auf einer LB-Agar mit 25 µg \* ml<sup>-1</sup> Kanamycin und zuletzt auch auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Alle Kolonien, die mit Saccharose und LB wuchsen, nicht aber mit Kanamycin waren für die weitere Untersuchung von Interesse. Diese wurden erneut mit den qPCR Primern (# 7 und 8, Tab. 3) in einer Mango-PCR (Tab. 28 + Tab. 29) getestet. Von einer positiven Kolonie wurde eine weitere iProof-PCR (Tab. 25 + Tab. 26) mit den Primern 9 und 10 (Tab. 3) angesetzt und das PCR Produkt mit den Primern 8 - 10 sequenziert (siehe 2.5.) (Abb. 9).



**Abb. 9: Klonierungsstrategie für den *S. oneidensis* barcode.** Im ersten Schritt werden je 500 nt vor und nach der Insertionsstelle im Genom (grün) mit den Primern 1 – 4 per PCR amplifiziert. Die Primer 1 und 4 haben einen Überhang zum Plasmid pMQ150 (schwarz) und die Primer 2 und 3 kodieren die synthetische Sequenz (violett) mit Überhang zueinander. Im nächsten Schritt wird in einer 2-step PCR mit den Primern 1 und 4 das Konstrukt fertig gestellt. Mittels isothermaler *in vitro* Ligation wird dieses mit dem geschnittenen Plasmid pMQ150 ligiert und mit den Primern 5 – 8 sequenziert. Über Konjugation und homologe Rekombination wird die synthetische Sequenz ins Genom von *S. oneidensis* integriert.

### 2.6.2 Klonierung und Transformation des *G. sulfurreducens barcodes*

Für die Klonierung des *G. sulfurreducens barcodes* wurde mit den Primern 11 und 12 (Tab. 3) ein 602 bp großes Fragment vor der Insertionsstelle und mit den Primern 13 und 14 ein 601 bp großes Fragment nach der Insertionsstelle amplifiziert. Der Primer 12 hat einen Überhang zur Kanamycin-Kassette und der Primer 13 kodiert für die synthetische Sequenz. Mit den Primern 15 und 16 wurde die Kanamycin-Kassette mit entsprechenden Überhängen für die 600 bp „upstream“ bzw. die synthetische Sequenz amplifiziert. Alle PCR-Fragmente wurden erst einzeln mit einer iProof PCR (Tab. 25 + Tab. 26) hergestellt, bevor die Einzelfragmente über zwei 2step PCRs (Tab. 26 + Tab. 27) zusammengesetzt wurden. Das fertige Fragment wurde mit den Primern 11, 14, 17 – 19 sequenziert (siehe 2.5.). Zur Sicherung wurde das Fragment gleichzeitig mit dem CloneJET™ PCR Cloning Kit in *E. coli* S17-1 kloniert. Dazu wurde der bereits geschnitten vorliegende pJET1.2/blunt Cloning Vector mit dem Fragment nach Herstellerangaben ligiert und anschließend für 3 h dialysiert. Anschließend wurde der Ansatz in elektrokompetente *E. coli* S17-1 transformiert (siehe 2.4.3. und 2.4.4.) und nach einer Inkubationszeit von 1:30 h bei 37°C auf LB-Agarplatten mit 100 µg \* ml<sup>-1</sup> Ampicillin ausplattiert. Die erhaltenen Klone wurde mit den Primern pJET1.2\_for und pJET1.2\_rev (#20 und 21, Tab. 3) mit einer Mango-PCR (Tab. 28 + Tab. 29) überprüft. Von einem Klon wurde eine Übernachtskultur angesetzt und davon das Plasmid isoliert. Das Insert des Plasmids wurde über Sequenzierungen verifiziert (Primer 17, 19 – 22, Tab. 3). Daneben diente das Plasmid als Template für eine PCR mit den Primern 11 und 14. Das so erhaltene PCR-Fragment wurde zur Transformation in *G. sulfurreducens* PCA (siehe 2.4.6. und 2.4.7.) verwendet. Zur Selektion wurden die Kolonien erst auf Agarplatten mit 35 µg \* ml<sup>-1</sup> Kanamycin überimpft und dann in Flüssigmedium mit 50 µg \* ml<sup>-1</sup> Kanamycin, wobei der Antibiotika-Selektionsdruck alle 48 h erneuert wurde. Nach Trübung der Flüssigkultur wurde auf Agarplatten mit 50 µg \* ml<sup>-1</sup> Kanamycin ausplattiert. Die Kolonien wurden mit den Primern 23 und 24 (Tab. 3) auf die erfolgreiche Integration des PCR-Fragments mittels PCR (Tab. 25 + Tab. 26) getestet und mit den Primern 17-19 und 23 und 24 sequenziert (siehe 2.5.) (Abb. 10).



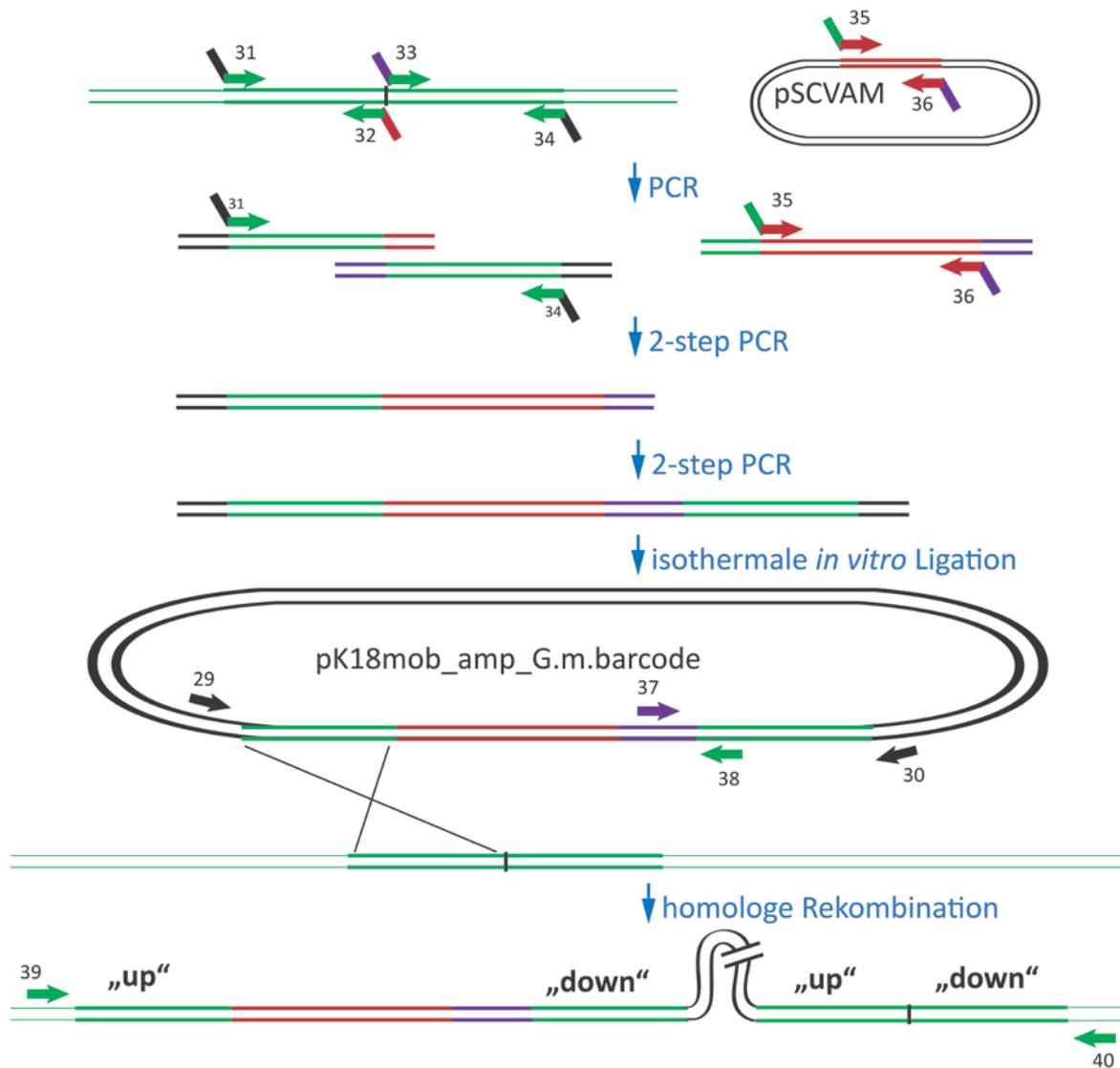
**Abb. 10: Klonierungsstrategie für *G. sulfurreducens* barcode.** Im ersten Schritt wurde je eine Homologiebox vor und nach der Insertionsstelle mit den Primern 11 – 14 aus dem Genom (grün) amplifiziert. Der Primer 12 hat dabei einen Überhang zur Kanamycin-Kassette (rot) und der Primer 13 kodiert die synthetische Sequenz (violett). Gleichzeitig wurde aus dem Plasmid pSCVAM die Kanamycin-Kassette (rot) mit den Primern 15 und 16 amplifiziert. Primer 15 hat einen Überhang zur Homologiebox vor der Insertionsstelle (grün) und Primer 16 zur synthetischen Sequenz (violett). Mittels zwei 2-step PCRs werden die drei Fragmente zusammengesetzt. Mithilfe des CloneJet PCR Cloning Kit wurde das PCR-Produkt in den pJET ligiert und mit den Primern 11, 14, 17 und 19 – 21 sequenziert. Mittels PCR mit den Primern 11 und 14 wurde das Fragment amplifiziert und zur Transformation verwendet. In *G. sulfurreducens* wurde per homologer Rekombination die synthetische Sequenz wie auch die Kanamycin-Kassette ins Genom integriert. Dies wurde mit den Primern 17 – 20, 23 und 24 per Sequenzierung überprüft.

### 2.6.3 Klonierung und Transformation von *G. metallireducens barcode*

Im ersten Schritt wurde die Kanamycin-Kassette durch eine Ampicillin-Kassette im Plasmid pK18mob ausgetauscht. Dazu wurde mit den Primern 25 und 26 (Tab. 3) die Ampicillin-Kassette aus dem Plasmid pASK-IAB43 mit homologen Überhängen zum Plasmid pK18mob amplifiziert. Mit den Primern 27 und 28 (Tab. 3) wurde in einer inversen PCR das Rückgrat vom pK18mob vervielfältigt. Über eine isothermale *in vitro* Ligation (siehe 2.3.3.) wurden die zwei Fragmente zusammengefügt und in chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (siehe 2.4.1. und 2.4.2.). Mit einer Mango-PCR (Tab. 28 + Tab. 29) und den Primern 29 und 30 (Tab. 3) wurde die erfolgreiche Integration der Ampicillin-Kassette in den pK18mob überprüft. Für die weitere Verwendung wurde der pK18mob\_amp verwendet und mit HindIII verdaut (siehe 2.3.1.) und anschließend dephosphoryliert (siehe 2.3.2.).

Für die Klonierung von *G. metallireducens* GS-15 wurden links und rechts der Insertionsstelle zwei 598 nt bzw. 599 nt Fragmente mit den Primern 31 und 32 bzw. 33 und 34 (Tab. 3) mit der iProof-Polymerase (Tab. 25 + Tab. 26) amplifiziert.

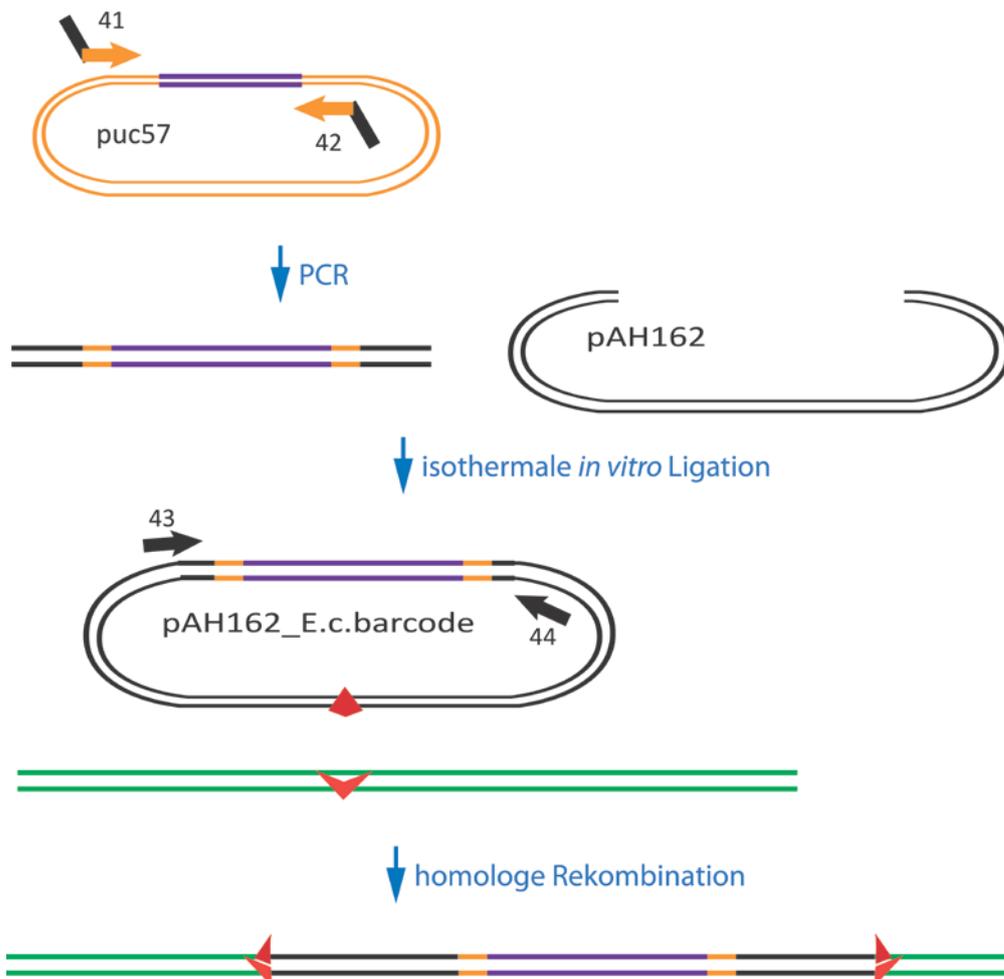
Die Kanamycin-Kassette wurde mit den Primern 35 und 36 (Tab. 3) aus dem Plasmid pSCVAM amplifiziert. Der Primer 35 hat einen homologen Überhang zur genomischen Sequenz links von der Insertionsstelle und Primer 36 kodiert gleichzeitig für die synthetische Sequenz. Mit der ersten PCR wurden die Einzelfragmente amplifiziert, mit zwei 2-step PCRs (Tab. 26 + Tab. 27) die drei Fragmente zu einem zusammengesetzt. Über eine isothermale *in vitro* Ligation (siehe 2.3.3.) wurde das Fragment in den geschnittenen pK18mob\_amp ligiert. Zur Sicherung des pK18mob\_amp\_G.m.barcode wurde es in elektrokompente *E. coli* S17-1 transformiert (siehe 2.4.3. und 2.4.4.), daraus anschließend isoliert und mit den Primern 29, 30 und 38 (Tab. 3) sequenziert (siehe 2.5.). Anschließend wurden 180 ng Plasmid in elektrokompente *G. metallireducens* Zellen (siehe 2.4.8. und 2.4.9.) transformiert. Durch Selektion auf 50  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  Kanamycin wurden Zellen isoliert, die das gesamte Plasmid ins Genom integriert hatten. Dies konnte per iProof-PCR (Tab. 25 + Tab. 26) mit den Primern 39 und 40 (Tab. 3) nachgewiesen werden (7,6 kb) (Abb. 11).



**Abb. 11: Klonierungsstrategie für *G. metallireducens* barcode.** Mit den Primern 31 -34 wurden vor und nach der Insertionsstelle je eine Homologiebox aus dem Genom (grün) amplifiziert. Dabei hatten die Primer 31 und 34 einen Überhang zum Plasmid pK18mob (schwarz), der Primer 32 zur Kanamycin-Kassette (rot) und der Primer 33 kodierte die synthetische Sequenz (violett). Gleichzeitig wurde die Kanamycin-Kassette (rot) mit den Primern 35 und 36 aus dem Plasmid pSCVAM amplifiziert. Dabei hatte der Primer 35 einen Überhang zum Genom (grün) und der Primer 36 kodierte die synthetische Sequenz. Mittels zwei 2-step PCRs wurden die drei Fragmente zu einem zusammen gefügt und per isothermaler *in vitro* Ligation in den pK18mob ligiert. Mit den Primern 29, 30, 37 und 38 wurde das Konstrukt sequenziert und anschließend das Plasmid in *G. metallireducens* transformiert. Per homologer Rekombination integrierte sich das komplette Plasmid ins Genom und dies konnte mit den Primern 39 und 40 gezeigt werden.

#### **2.6.4 Klonierung und Transformation von *E. coli* barcode**

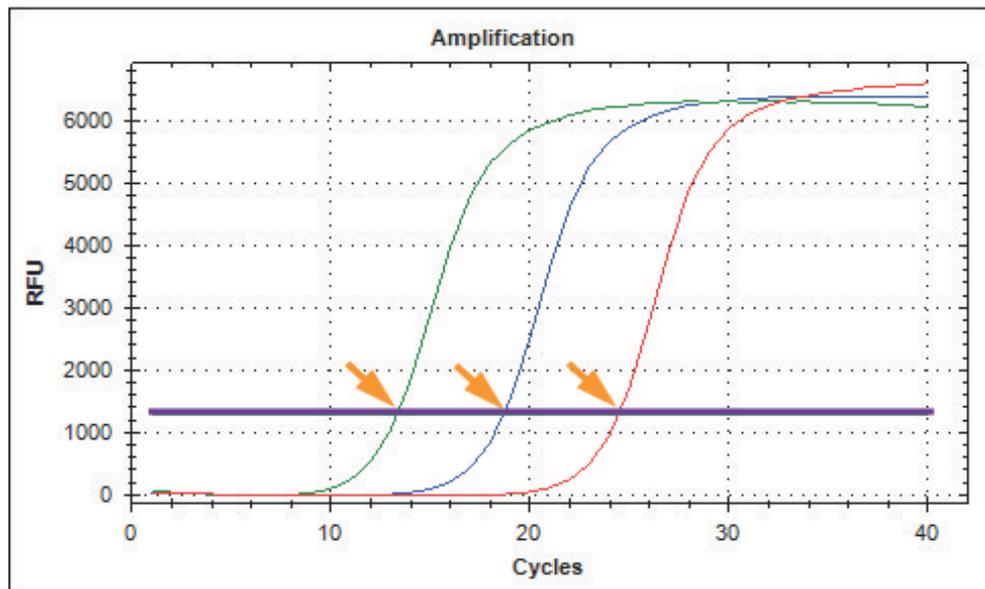
Für die Klonierung des *E. coli* barcodes wurde das System von Haldimann und Wanner (Haldimann & Wanner, 2001) verwendet, das eine einmalige Integration eines Plasmids mit Hilfe eines Helferplasmids in eine Phagenbindestelle ermöglicht. Die synthetische Sequenz für die Klonierung des *E. coli* barcodes wurde von der Firma GenScript synthetisiert. Mittels iProof-PCR (Tab. 25 + Tab. 26) mit den Primern 41 und 42 (Tab. 3) wurde sie aus dem Plasmid pUC57 amplifiziert. Das Plasmid pAH162 wurde mit den Restriktionsendonukleasen Sall und BamHI geschnitten (siehe 2.3.1.) und per isothermaler *in vitro* Ligation (siehe 2.3.3.) mit dem PCR-Fragment ligiert. Das fertige Plasmid pAH162\_E.c.barcode wurde in elektrokompente *E. coli* S17-1 transformiert und auf LB-Agarplatten mit  $12,5 \mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$  Tetracyclin ausplattiert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde mit den Primern 43 und 44 (Tab. 3) überprüft (siehe 2.5.). In den Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde über Elektroporation das Plasmid pAH123 transformiert, das das Helferplasmid für die Integration des Plasmids pAH162 in die Phagenbindestelle  $\Phi 80$  ist. Dieser *E. coli* Stamm wurde für die Herstellung von elektrokompenten *E. coli* Zellen verwendet (siehe 2.4.3.), allerdings konnte nur bei 30°C inkubiert werden, da das Plasmid pAH162 hitzesensitiv ist. Das Plasmid pAH162\_E.c.barcode wurde in diesen Stamm transformiert (siehe 2.4.4.). Vor dem Ausplattieren wurde der Stamm dann erst 1 h bei 42°C inkubiert, um das Plasmid pAH162 zu zerstören, und dann auf LB-Agarplatten mit  $8 \mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$  Tetracyclin ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Da die Integration in die Phagenbindestelle  $\Phi 80$  nicht richtungsorientiert ist, wurde mit verschiedenen Primerkombinationen (45 + 46, 45 + 44, 43 + 46 und 43 + 44; Tab. 3) die Integration getestet. Mit den Primern 45 und 46 wurde ein PCR-Fragment amplifiziert (Tab. 25 + Tab. 26), das dann mit den Primern 43 – 48 sequenziert wurde (siehe 2.5.) (Abb. 12).



**Abb. 12: Klonierungsstrategie für *E. coli* barcode.** Mit den Primern 41 und 42 wurden per PCR die synthetische Sequenz aus dem Plasmid puc57 (orange) amplifiziert. Die Primer hatten Überhänge zum Plasmid pAH162 (schwarz). Mittels isothermaler *in vitro* Ligation wurde das Plasmid pAH162\_E.c.barcode fertig gestellt. Mit den Primern 43 und 44 wurde die Sequenz überprüft. Das Plasmid wurde an der Phagenbindestelle  $\Phi 80$  (rot) ins Genom integriert.

## 2.7 Quantitative PCR

Bei einer PCR wird theoretisch in jedem Zyklus die Menge an dsDNA verdoppelt. Die Zunahme der DNA-Menge kann optisch mittels Fluoreszenzfarbstoffen verfolgt werden. Dies wird als quantitative PCR (qPCR) bezeichnet. Dabei wird in einem Graphen die Fluoreszenz über die Zyklusanzahl aufgetragen. Am Anfang ist die eigentliche Fluoreszenz nicht von der Hintergrundfluoreszenz des Farbstoffs zu unterscheiden. Im Verlauf der Reaktion nimmt die Intensität jedoch zu und es wird ein Schwellenwert festgelegt, ab dem die Fluoreszenz für detektierbar definiert wird. Der dazugehörige Zykluswert wird als  $C_q$ -Wert bezeichnet (engl. *quantification cycle* -  $C_q$ ) (Abb. 13).



**Abb. 13: Graphische Auftragung eines qPCR-Laufs.** Die Fluoreszenz (RFU) ist über die Anzahl der Zyklen (engl. *Cycles*) aufgetragen. In violett ist der Schwellenwert markiert und die orangen Pfeile zeigen auf die jeweiligen C<sub>q</sub>-Werte der drei qPCR-Proben (grün, blau und rot).

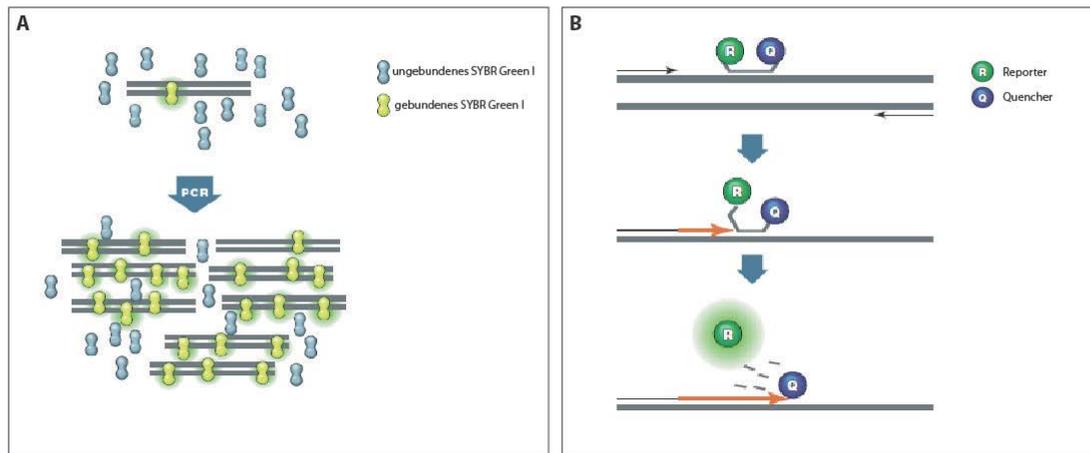
In dieser Arbeit wurde die qPCR verwendet, um die Zellzahl zu bestimmen. Dies war möglich, da eine Eichgerade mit bekannter Zellzahl bei jeder Messung mit aufgetragen wurde. Die Eichgeraden bestanden jeweils aus sechs Verdünnungsschritten im Triplikat. Es wurde für die beiden Wildtyp-Stämme *S. oneidensis* MR-1 und *G. sulfurreducens* PCA ein qPCR-Assay mit SYBR Green I etabliert. Für die transformierten Stämme *S. oneidensis* *barcode*, *G. sulfurreducens* *barcode*, *G. metallireducens* *barcode* und *E. coli* *barcode* wurde eine multiplex qPCR geplant.

### 2.7.1 qPCR mit SYBR Green I

Für Reinkulturen und Mischkulturen aus zwei Organismen wurde SYBR Green I verwendet. Dies ist ein Farbstoff, der ungebunden so gut wie keine Fluoreszenz abgibt. Bindet der Farbstoff jedoch an dsDNA, fluoresziert er bis zu 1000-fach stärker (Abb. 14 A).

Im ersten Schritt wurde eine DNA-Sequenz ausgesucht und Primer so gewählt, dass ein Amplicon von 60 - 200 nt amplifiziert wird, das weniger als 4 bp Wiederholungen hat. Außerdem wurde sichergestellt, dass das Amplicon und die Primer einen GC-Gehalt von 50 – 60% erreichen und keine Sekundärstrukturen gebildet werden. Die Anlagerungs-

Temperatur der Primer wurde zwischen 50 – 60°C gewählt. Die Primer hatten in ihrer Sequenz stets weniger als 3 G bzw. C hintereinander. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass sich ein G oder C am 3'-Ende befand. Gleichzeitig wurde sichergestellt, dass mit den jeweiligen Primerpaaren keine weiteren PCR-Produkte gebildet wurden. Dies alles wurde mit der Beacon Designer Software (Premier Biosoft, Palo Alto, USA) überprüft.



**Abb. 14: Möglichkeiten der zeitlichen Verfolgung der Verdopplung der DNA. A)** SYBR Green I fluoresziert nur, wenn der Farbstoff an dsDNA gebunden ist. **B)** Hydrolyse-Sonden haben am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencher gebunden. Es wird keine Fluoreszenz gemessen, solange sich beide in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Die verwendete DNA-Polymerase besitzt eine Exonuklease-Aktivität und spaltet die Hydrolyse-Sonde. Dadurch kommt es zur Ausbildung der Fluoreszenz („Real-Time PCR Application Guide“, Biorad).

Vor der Bestellung der Primer wurden sie erneut bei NCBI auf ihre Spezifität überprüft (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Für alle qPCR-Läufe wurden weiße Polypropylen-Platten (4titude, Wotton, Großbritannien) mit selbstklebenden Folien (Sarstedt, Nürnberg) verwendet. Mit allen Primerpaaren wurde eine Temperaturgradienten qPCR von 55 – 65°C im qPCR Cycler CFX96 (Biorad, München) durchgeführt (Tab. 35). Dazu wurde das DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit nach Herstellerangaben im 20 µl Maßstab verwendet (Tab. 36). Anschließend wurden immer 10 µl der Ansätze auf ein 2,5% Agarosegel aufgetragen.

**Tab. 35: qPCR-Programm mit Temperaturgradient.** Schritt 2 - 4 wurde 29 Mal wiederholt. Die Fluoreszenz wurde jeweils nach dem 4. Schritt und alle 0,5 K beim 6. Schritt gemessen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	95°C	7:00 min	Initiale Denaturierung
2	95°C	0:10 min	Denaturierung
3	55 - 65°C	0:15 min	Anlagern der Primer
4	65°C	0:30 min	Synthese
5	65°C	0:30 min	Finale Elongation
6	60 - 98°C	0:05 min/0,5 K	Schmelzkurve

**Tab. 36: Komponenten einer qPCR mit SYBR Green I.**

Komponente	Menge	Endkonzentration
2x MasterMix	10 µl	1x
Vorwärtsprimer (4 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer (4 µM)	2,5 µl	0,5 µM
ddH <sub>2</sub> O	4 µl	-
Template (< 100 ng * µl <sup>-1</sup> )	1 µl	-

Als beste Anlagerungstemperatur konnte für die Wildtyp-Stämme 59°C identifiziert werden. Nun wurde eine Verdünnungsreihe (unverdünnt; 1:2; 1:10; 1:20; 1:100 und 1:200) angesetzt und im Triplikat getestet. Anhand der Verdünnungsstufen und der dazu gehörenden C<sub>q</sub>-Werte, ließ sich die Effizienz ablesen. Diese sollte zwischen 90 -105% liegen und ein Bestimmtheitsmaß von mehr als 0,980 haben. War dies alles gewährleistet, war der qPCR Assay für die Wildtyp-Stämme etabliert. Nun konnten die unbekannt Proben mit der Eichgerade in eine gemeinsame 96-well Platte pipettiert und die Zellzahl der unbekannt Proben dadurch bestimmt werden.

### 2.7.2 qPCR mit Hydrolyse-Sonden (multiplex qPCR)

Für Mischkulturen mit mehr als zwei Organismen wurden Hydrolyse-Sonden eingesetzt. Die Hydrolyse-Sonden wurden so gewählt, dass sie eine höhere Anlagerungstemperatur als die Primer haben. Dies ermöglicht eine zeitliche Staffelung der Anlagerung: Erst die Hydrolyse-Sonden, dann die Primer. Somit ist sichergestellt, dass die Hydrolyse-Sonden

an die DNA gebunden sind, bevor die DNA-Polymerase mit der Elongation anfängt. Dies ist notwendig, da die verwendete DNA-Polymerase eine Exonuklease-Funktion besitzt. So werden bei der Elongation der Primer durch die DNA-Polymerase die bereits gebundenen Hydrolyse-Sonden gespalten. Die Hydrolyse-Sonden sind Oligonukleotide, an die am 5'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende ein entsprechender Quencher gebunden sind. Durch die Zerteilung der Hydrolyse-Sonde kommt es zu einer räumlichen Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher, so dass die Wirkung des Quenchers auf den Fluoreszenzfarbstoff abnimmt und dadurch Fluoreszenz gemessen wird (Abb. 14 B). Der Einsatz von Hydrolyse-Sonden ist zwar kompliziert und aufwendig zu etablieren, aber dies lohnt sich, wenn mehrere verschiedene Organismen in einer Probe nachgewiesen werden sollen. Denn durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können alle Organismen in einem Reaktionsansatz nachgewiesen werden (multiplex qPCR), was Zeit und Material spart.

Für die Planung der multiplex qPCR wurden die gleichen Richtlinien wie beim SYBR Green I verwendet. Zusätzlich wurden alle Primerkombinationen auf mögliche weitere PCR-Produkte überprüft. Außerdem wurde für die multiplex qPCR für jedes Primerpaar noch eine Hydrolyse-Sonde erstellt, die eine 5 – 10 K höhere Anlagerungs-Temperatur hat und weniger als 30 nt lang ist. Außerdem darf am 5'-Ende kein G sein, da es die Fluoreszenzintensität verringert. Der G/C-Gehalt war sehr variabel zwischen 30 – 80% möglich. Jedoch war wichtig, dass die Sequenz mehr C als G enthält. Zum Schluss wurde je ein passendes Reporter–Quencher-Paar an die Enden angefügt.

Die Etablierung der qPCR-Assays wurde mit SYBR Green I durchgeführt. Des Weiteren musste für die multiplex qPCR erst auch noch praktisch nachgewiesen werden, dass keinerlei ungewollte PCR-Produkte oder Primer-Dimere entstehen.

Dazu wurde jeder Organismus mit einer Mischung aus spezifischen Primern der anderen Organismen und jeweils nur einem der eigenen getestet (Tab. 37). Als Positivkontrolle wurden die beiden eigenen Primer verwendet. Da in der Temperaturgradienten qPCR 60°C als gute Anlagerungstemperatur ermittelt wurde, konnte das Programm für die multiplex qPCR vereinfacht und verkürzt werden, in dem für das Anlagern der Primer und die Elongation durch die DNA-Polymerase die gleiche Temperatur gewählt wurde (Tab. 38).

**Tab. 37: Komponenten einer multiplex qPCR zum Test der Spezifität am Beispiel *S. oneidensis*.**

Komponente	Menge	Endkonzentration
2x MasterMix	10 µl	1x
Vorwärtsprimer S.o.B (10µM)	1 µl	0,5 µM
Vorwärtsprimer G.s.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer G.s.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Vorwärtsprimer G.m.B(10 µM)	1 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer G.m.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Vorwärtsprimer E.c.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer E.c.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
ddH <sub>2</sub> O	2 µl	-
Template (< 100 ng * µl <sup>-1</sup> )	1 µl	-

**Tab. 38: Multiplex qPCR-Programm.** Schritt 2 - 3 wurde 34 Mal wiederholt. Am Ende des 3. Schrittes und alle 0,5 K beim 4. Schritt wird die Fluoreszenz gemessen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	95°C	3:00 min	Initiale Denaturierung
2	95°C	0:10 min	Denaturierung
3	60°C	0:30 min	Anlagern der Primer und Synthese
4	60 - 98°C	0:05 min/0,5 K	Schmelzkurve

Um die Bildung von Primer-Dimeren ausschließen zu können, wurde im nächsten Ansatz jeder Primer mit jedem getestet. Dazu wurde in einem DNA-freien Ansatz (Tab. 39) für jeden Primer ein Mastermix zusammen pipettiert. In jede Vertiefung der 96-well Platte wurde die verschiedene Mastermixe so pipettiert, dass am Ende in jeder Vertiefung zwei Primer vorlagen und alle Kombinationsmöglichkeiten der Primer einmal getestet wurden. Das qPCR-Programm ist in Tabelle 38 gezeigt.

Im nächsten Schritt wurde das Limit der Detektion (engl. *limit of detection* – LOD) für die drei Barcode Stämme ermittelt. Dazu wurde von jeder Kultur erst die Zellzahl bestimmt (siehe 6.2.), bevor DNA isoliert wurde. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, und die Verdünnungsschritte zwischen 40400 und 14,4 Zellen pro qPCR-

Ansatz wurden verwendet. Von jedem Verdünnungsschritt wurden sechs qPCR-Ansätze angesetzt. Der höchste Verdünnungsschritt, bei dem alle sechs Ansätze noch einen  $C_q$ -Wert lieferten, war die obere Grenze des LODs. Die untere Grenze hingegen war der höchste Verdünnungsschritt, bei dem keiner der sechs Ansätze mehr einen  $C_q$ -Wert mehr lieferten. Für *S. oneidensis barcode* war dies  $144 \geq \text{LOD} \geq 14,4$  Zellen pro qPCR-Ansatz, für *G. sulfurreducens barcode*  $154 \geq \text{LOD} \geq 30,8$  und für *G. metallireducens barcode*  $404 \geq \text{LOD} \geq 40,4$ .

**Tab. 39: Komponenten einer multiplex qPCR.** Für jeden Primer wurde ein eigener Mastermix hergestellt und es wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  in die Vertiefungen pipettiert.

Komponente	Menge	Endkonzentration
2x MasterMix	40 $\mu\text{l}$	1x
Primer (10 $\mu\text{M}$ )	8 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
ddH <sub>2</sub> O	32 $\mu\text{l}$	-

Nach erfolgreicher Etablierung mit SYBR Green I wurden die Hydrolyse-Sonden bestellt (Tab. 5) und das DyNAmo ColorFlash Probe qPCR Kit verwendet. Es konnte das gleiche multiplex qPCR-Programm durchgeführt werden, allerdings ohne die Schmelzkurve (Tab. 38). Um ein Stören der Primer und Hydrolyse-Sonden gegenseitig auszuschließen, wurde im ersten Schritt jede Hydrolyse-Sonde mit dem entsprechenden Primerpaar und der DNA der Reinkultur getestet. Dazu wurde bei dem Reaktionsansatz von Tabelle 40 anstatt der Primer und Hydrolyse-Sonden der anderen Organismen ddH<sub>2</sub>O verwendet. Im nächsten Schritt wurden zwei Organismen und im letzten Schritt drei Organismen gleichzeitig analysiert. Die  $C_q$ -Werte durften sich dabei für die Organismen nicht ändern. Im letzten Test wurde noch die Detektion von hoher DNA-Konzentration im Vergleich zu niedriger DNA-Konzentration getestet.

Nach erfolgreichem Test aller Komponenten konnte in multiplex qPCR-Läufen die Anzahl der DNA-Kopien und somit auch die Zellzahl unbekannter Proben bestimmt werden.

**Tab. 40: Komponenten einer multiplex qPCR.**

Komponente	Menge	Endkonzentration
2x MasterMix	10 µl	1x
Vorwärtsprimer S.o.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer S.o.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Vorwärtsprimer G.s.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer G.s.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Vorwärtsprimer G.m.B(10 µM)	1 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer G.m.B (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Hydrolyse-Sonde S.o.B (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
Hydrolyse-Sonde G.s.B (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
Hydrolyse-Sonde G.m.B (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
ddH <sub>2</sub> O	1,5 µl	-
Template (< 100 ng * µl <sup>-1</sup> )	1 µl	-

### 3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA ist negativ geladen und wird daher über das elektrische Feld zur Anode hin bewegt. Der Salzgehalt des Puffers und die Größe der Poren in der Gelmatrix beeinflussen dabei die Wanderungsgeschwindigkeit. Es wurden 1 - 2,5%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose (Invitrogen) in 1x-TAE-Puffer (Tab. 41) aufgekocht und nach einer Abkühlzeit mit 0,1 µl \* ml<sup>-1</sup> MidoriGreen (1:5 verdünnt) versetzt. Das noch flüssige Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Nach dem Erkalten wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1x-TAE-Puffer gegeben. Dann wurden die zu analysierenden DNA in die Taschen geladen und zusätzlich in eine extra Tasche 6 - 10 µl des Größenstandards aufgetragen. Es wurde eine konstante Spannung von 120 V angelegt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die DNA mit Hilfe einer UV-Durchlicht-Lampe (IL 200M; Bachhofer, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm

oder mit der ChemiDoc XRS+ (Biorad, München) detektiert. Die Bilder wurden mit der ImageLab Software bearbeitet.

**Tab. 41: Zusammensetzung des 50fachen Tris-Acetat-EDTA-Puffers (TAE-Puffer).**

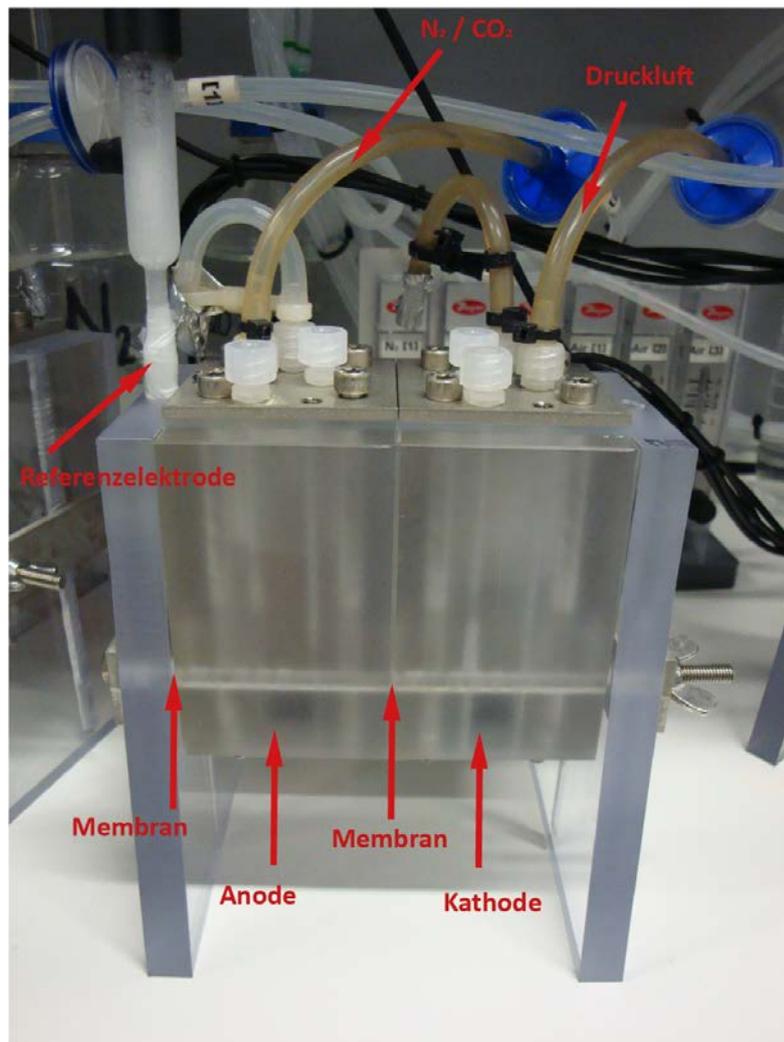
Substanz	Menge
Tris-HCl	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
Aqua dest.	ad 1 l

#### 4 Mikrobielle Brennstoffzellen

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Brennstoffzellaufbauten verwendet. Beide Brennstoffzell-Typen wurden mit den Potentiostaten von Pine Instruments (Grove City, USA) in Inkubatoren (INCUDRIVE H, Schuett-biotec GmbH, Göttingen) bei 30°C betrieben. Als Referenzelektroden wurden gesättigte Quecksilberchlorid-Elektroden (engl. *saturated calomel reference electrode* – SCE) (Seonsortechnik Meinsberg GmbH, Zieggra-Knobelsdorf) benutzt. Das an der Arbeitselektrode (Anode) gemessene Potential wurde durch Addition von 241 mV auf Normalwasserstoffelektrode (engl. *normal hydrogen electrode* – NHE) umgerechnet (Logan, 2008). Außerdem waren beide Brennstoffzellenaufbauten autoklavierbar, so dass unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden konnte.

##### 4.1 3-Kammer-Brennstoffzellen

Es wurden die Brennstoffzellen nach Kloke *et al.* (Kloke *et al.*, 2010) mit je 25 ml Medium verwendet (Abb. 15). In der Anodenkammer wurde das Anodenmedium I (Tab. 42) konstant mit 80% N<sub>2</sub> /20% CO<sub>2</sub> begast, um einen konstanten pH-Wert zu haben. Auf der Kathodenseite wurde das Kathodenmedium (Tab. 43) mit Druckluft versetzt. In die Referenzkammer wurde 5 ml Kathodenmedium (Tab. 43) gefüllt.



**Abb. 15: 3-Kammer-Brennstoffzelle.** Als Material wurde Polykarbonat und für die Dichtungen Silikonplatten verwendet. Die Anodenkammer ist von der Kathodenkammer und der Referenzelektrodenkammer jeweils durch eine semipermeable Membran getrennt. Die Anodenkammer wird mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> begast und die Kathodenkammer mit Druckluft.

Tab. 42: Anodenmedium I.

Substanz	Menge	Endkonzentration
10fach Salze (Tab. 12)	100 ml/l	-
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,21 g/l	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
Lactat	4,48 g/l	20 mM
Natrium-Acetat	0,82 g/l	10 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
Aqua dest.	ad 980 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
10% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,1% (w/v)
0,5 M Cystein	2 ml/l	1 mM
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
2,6 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2 ml/l	5,1 mM
pH 7,2		

Als Inokulum wurden die Reinkulturen von *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens*, *G. metallireducens* und *D. propionicus* im anaeroben Medium I gezüchtet und mit der Zentrifuge für 5 min bei 6000 rpm (Centrifuge 5810 R, Rotor F-34-6-38, Eppendorf) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit dem Waschmedium I (Tab. 44) gewaschen. Die Brennstoffzellen mit *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens* und *G. metallireducens* wurden mit einer End-OD bei 655 nm von 0,3 gestartet. Brennstoffzellen mit *D. propionicus* wurden mit  $1,18 \cdot 10^9$  Zellen inokuliert. Um eine Limitierung durch den Elektronendonator zu verhindern, wurden mit *S. oneidensis* beimpfte Brennstoffzellen an jedem zweiten Tag mit 0,4 mmol Lactat versetzt. Brennstoffzellen mit *D. propionicus* wurden mit 0,2 ml 2 M Lactat nachgefüttert.

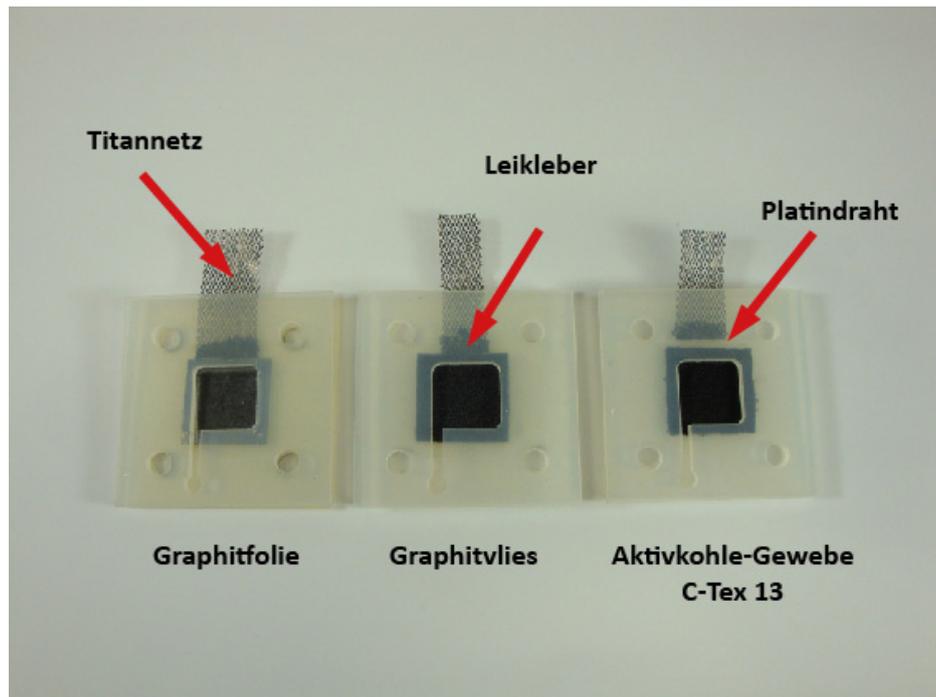
Alle Kammern waren durch semipermeable Membranen (Fumapem F-950, Quintech, Göppingen) voneinander getrennt.

**Tab. 43: Kathodenmedium.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,42 g/l	3 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,22 g/l	1 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,2 g/l	4 mM
KCl	0,38 g/l	5 mM
NaCl	2,64 g/l	45 mM
pH 7,2		
Aqua dest.	ad 1 l	
nach dem Autoklavieren zugeben		
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 ml/l	1 mM

**Tab. 44: Waschmedium I.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,42 g/l	3 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,22 g/l	1 mM
NaCl	2,64 g/l	45 mM
pH 7,2		
Aqua dest.	ad 1 l	
autoklavieren		



**Abb. 16: Verwendete Elektrodenmaterialien.** Die drei verwendeten Elektrodenmaterialien wurden zwischen zwei Silikonplatten in die Brennstoffzellen eingebaut. Der Potentiostat wurde über ein Titannetz, an das ein Platindraht mit Leitkleber befestigt war, angeschlossen.

Als Elektroden wurden drei verschiedene Materialien getestet (Abb. 16). Die Graphitfolie (0,254 mm dick) wurde bei Alfa Aesar (Karlsruhe), das Graphitvlies GFD2 EA (2 mm dick) bei der SGL Carbon GmbH (Meitingen) und das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 von Mast Carbon International Ltd. (Hampshire, Großbritannien) bezogen. Die Elektrodenmaterialien wurden auf eine projizierte Fläche von  $2,25 \text{ cm}^2$  zugeschnitten. Vor der Benutzung wurden die Elektrodenmaterialien erst mit Isopropanol benetzt und dann in Reinstwasser autoklaviert. Die Elektroden wurden mit Platindraht (0,1 mm; Chempur, Karlsruhe), der an einem Titannetz mit Leitkleber (Leit-C, Plano, Wetzlar) befestigt war, an die Potentiostaten angeschlossen.

Das Messprotokoll wurde ausgehend von einer Publikation von Golitsch *et al.* (Golitsch *et al.*, 2013) angepasst. In der ersten Phase wurde ein konstanter Strom von  $222,22 \text{ nA} \cdot \text{cm}^{-2}$  angelegt (galvanostatische Konditionierung). Nach dem das Potential konstant war, wurde die zweite Phase gestartet. Dabei wurde der Strom konstant um  $3,24 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  erhöht und die Stromdichten bei 41 mV vs. NHE miteinander verglichen.

#### 4.2 Bestimmung der Eigenkapazität der Elektrodenmaterialien

Um bei den Lastkurven nur die Leistung der Bakterien und nicht des Elektrodenmaterials vergleichen zu können, wurde in abiotischen Versuchen die Doppelschicht-Kapazität der Elektrodenmaterialien bestimmt. Eine elektrochemische Doppelschicht kann nach dem Helmholtz-Doppelschicht Modell beschrieben werden. Dabei wird von einer starren Verteilung der Ladung ausgegangen und es bildet sich vor der negativ geladenen Elektrode eine positiv geladene Schicht. Dies lässt sich aus physikalischer Sicht als Doppelschicht-Kapazität beschreiben.

Die Kapazität  $C$  von zwei voneinander isolierten Körpern ist das Verhältnis von der elektrischen Ladungsmenge  $Q$  die in den Körpern gespeichert ist und der elektrischen Spannung  $U$ , die zwischen den Körpern anliegt (Formel(5)).

(5)

$$C = \frac{Q}{U}$$

Mit der Annahme, dass in der Nähe zum Leerlaufpotential (engl. *open circuit potential*) kein Faraday'scher Strom produziert wird, kann die Formel umgeschrieben und integriert werden (Formel (6)).

(6)

$$\int I dt = C \int dU$$

Mit der Annahme, dass der Strom  $I$  als die Rate der Lastkurve  $v$  mal der Zeit  $t$  verstanden wird, kann nach der Änderung des Potentials aufgelöst werden (Formel (7)).

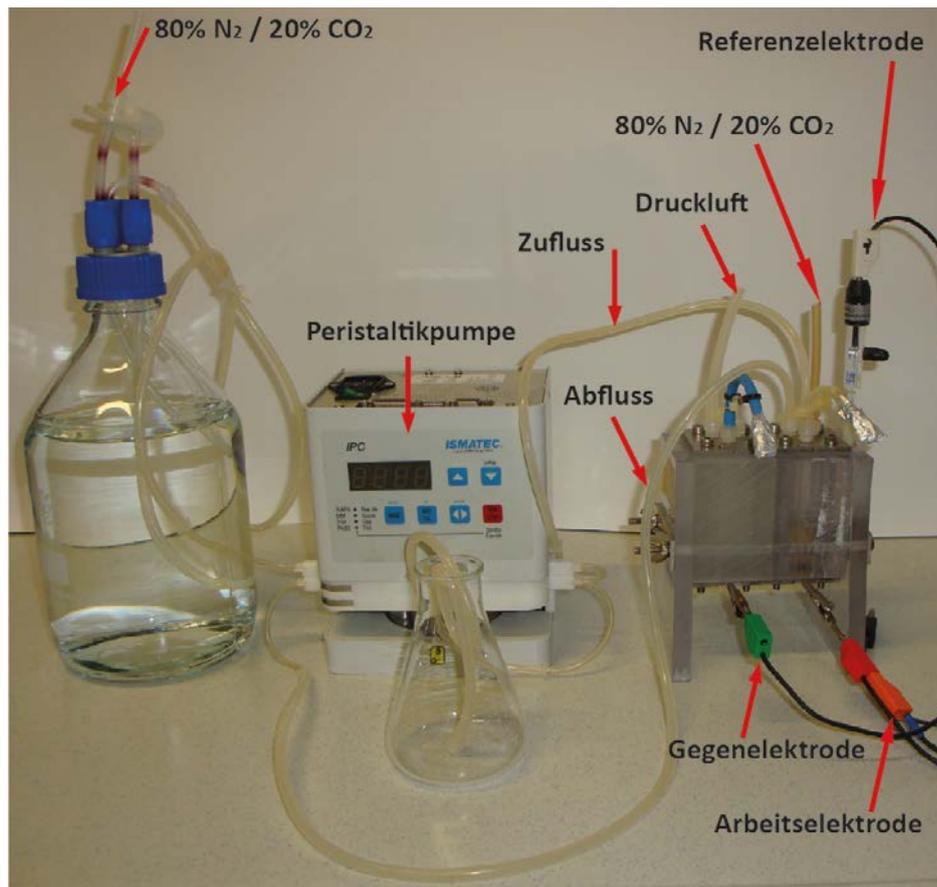
(7)

$$\Delta U = \frac{I^2}{2 v C}$$

Dabei ist  $\Delta U$  das Potential während des offenen Stromkreises in Volt,  $I$  der Strom in Ampere,  $v$  die Rate der Lastkurve in Ampere pro Sekunde und  $C$  ist die Kapazität in Farad. Die Doppelschicht-Kapazität des Elektrodenmaterials kann mit der Rate der Lastkurve ( $v$ ) von  $3,24 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  und dem Anpassen der Funktion an die gemessenen Werten für  $\Delta U$  und  $I$  bestimmt werden. Dabei wurde  $\Delta U$  als die Differenz zwischen dem Potential während dem offenem Stromkreis und dem gemessenen Potential während der Lastkurve berechnet.

Für die Messung der Doppelschicht-Kapazität wurden Lastkurven der kleinen Brennstoffzellen ohne Inokulum aufgenommen. Daraus ließen sich für die Graphitfolie eine Eigenkapazität der Gesamtanode von 12,6 mF, für das Graphitvlies von 6,9 mF und für das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 von  $3,56 \text{ F} \pm 0,29 \text{ F}$  bestimmen.

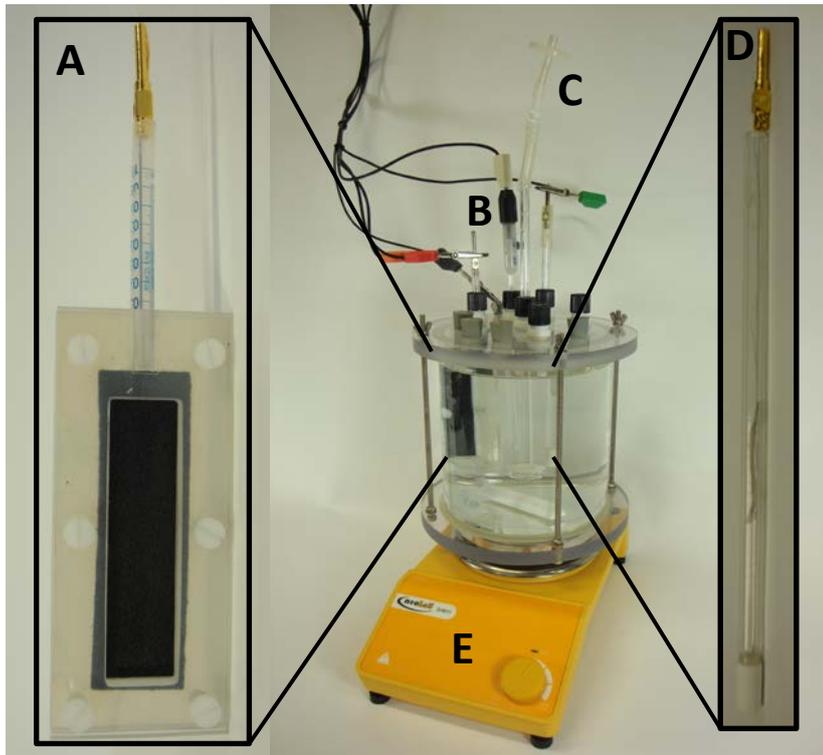
#### 4.3 3-Kammer-Brennstoffzellen mit Durchflusssystem



**Abb. 17: 3-Kammer-Brennstoffzelle mit Durchflusssystem.** Es wurden die 3-Kammer-Brennstoffzellen mit einer zusätzlichen Peristaltikpumpe verwendet. Die Mediumsflasche wurde mit sterilem 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> begast.

Für die Versuche mit Durchflusssystem wurden die gleichen 3-Kammer-Brennstoffzellen verwendet. Als Pumpe wurde die Peristaltikpumpe IPC von Ismatec mit Silikonschläuchen (2 mm Innendurchmesser) (IDEX Health & Science GmbH, Wertheim) angeschlossen. Die Flussrate wurde auf  $137 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  eingestellt. Die Mediumsflasche wurde mit sterilem 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> begast (Abb. 17).

#### 4.4 2-Kammer-Brennstoffzellen



**Abb. 18: 2-Kammer-Brennstoffzelle.** Der Brennstoffzellenaufbau bestand aus **A)** Anode, die über den roten Stecker an den Potentiostaten angeschlossen wurde, **B)** Referenzelektrode, **C)** Mikrofilterkerze mit Sterilfilter zur Begasung mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub>, **D)** Kathode, bestehend aus Platinnetz in Glasmikrofilterkerze, die über den grünen Stecker angeschlossen war und **E)** Rührer.

Es wurden Glastöpfe mit 2,3 l Fassungsvermögen verwendet und mit 2 l Medium befüllt (entworfen von F. Golitsch). Für die Anode wurde das Graphitfließ mit einer projizierten Fläche von 16 cm<sup>2</sup> über eine Kanüle (0,80 x 120 mm; B. Braun, Melsungen) und einen Bananenstecker an den Potentiostaten angeschlossen. Als Kathode wurde ein Platinnetz (1024 Maschen \* cm<sup>-2</sup>, 0,06 mm Durchmesser; Chempur, Karlsruhe) über Platindraht (0,1 mm; Chempur, Karlsruhe) mit einem Bananenstecker an den Potentiostaten angeschlossen. Die Trennung zwischen Anodenraum und Kathode wurde durch einen Mikrofilterkerze (Poren 1,0 – 1,6 µm; Robu, Hattert) ermöglicht. Die Referenzelektrode wurde direkt in den Anodenraum installiert (Abb. 18).

Es wurden sechs Brennstoffzellen parallel gestartet. Während der ersten Messphase wurden 2 l Anodenmedium II (Tab. 45) verwendet und der Anodenraum konstant mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> begast.

Die drei Bakterienstämme wurden in ihrem entsprechenden Anaerobenmedium II (Tab. 16) gezüchtet und in der Zentrifuge Avanti J-26XP (Rotor JLA 8.1000, Beckman Coulter, Krefeld) bei 5000 g für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Waschmedium II (Tab. 46) bei 7000 rpm für 9 min gewaschen (Zentrifuge 5810 R, Rotor F-34-6-38, Eppendorf). Jeder Stamm wurde mit einer End-OD bei 655 nm von 0,04 angeimpft.

**Tab. 45: Anodenmedium II.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
10fach Salze (Tab. 12)	100 ml/l	-
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,21 g/l	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g/l	21 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g/l	5 mM
Natrium-Lactat (50% (w/w))	2,8 g/l	12,5 mM
Natrium-Propionat	0,48 g/l	5 mM
NB Spurenelemente (Tab. 13)	10 ml/l	-
Selenit-Wolframat (Tab. 14)	1 ml/l	-
Aqua dest.	ad 960 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen und autoklavieren		
Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml/l	-
20% Hefeextrakt (w/v)	10 ml/l	0,2% (w/v)
0,5 M Cystein	5 ml/l	2,5 mM
200 mM Natrium-Ascorbat	1 ml/l	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,4 mM
2% Pepton aus Casein	10 ml/l	0,02%
pH 7,2		

Das Messprotokoll bestand aus einem angelegten Potential von 0 mV vs. SCE (241 mV vs. NHE) und der Strom wurde über die Zeit gemessen.

Nach Erreichen eines konstanten Potentials (6 Tage) wurden drei der Anoden in synthetisches Abwasser nach DIN EN ISO 11733 (Tab. 47) überführt und mit 1% Klärwasserrückfluss (Klärschlamm) versetzt. Gleichzeitig wurden drei neue Brennstoffzellen mit synthetischem Abwasser und 1% Klärschlamm gestartet. Es wurde am fünften Tag mit 40 ml 50fach konzentriertem synthetischem Abwasser nachgefüttert. Dies wurde nach drei und sechs Tagen wiederholt.

**Tab. 46: Waschmedium II.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,42 g/l	3 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,22 g/l	1 mM
KCl	0,33 g/l	4 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,2 g/l	4 mM
pH 7,2		
Aqua dest.	ad 1l	
autoklavieren		

**Tab. 47: Synthetisches Abwasser nach DIN EN ISO 11733.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
Pepton	192 mg/l	0,02%
Fleischextrakt	138 mg/l	0,01%
Glucose-Monohydrat	19 mg/l	0,1 mM
NH <sub>4</sub> Cl	23 mg/l	0,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16 mg/l	0,1 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	32 mg/l	0,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	294 mg/l	3,5 mM
NaCl	60 mg/l	1,0 mM
pH 7,2		
Reinstwasser	ad 1l	
anaerobisieren und autoklavieren		
148 mM FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,148 mM

### 5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Mit FISH (engl. *fluorescence in situ hybridization* - FISH) können Mikroorganismen direkt in einer biotischen Probe nachgewiesen werden. Dazu werden Oligonukleotidsonden verwendet, die spezifisch an die 5S, 16S oder 23S rRNA binden. An das Oligonukleotid ist am 5'-Ende ein Farbstoff (z. B. FITC, Cy3, Cy5) kovalent gebunden (DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990b; Pernthaler *et al.*, 2004).

Beim Durchführen des Protokolls ist zu beachten, dass die ganze Zeit über DNase frei gearbeitet wird. Des Weiteren sollten keine Papierhandtücher oder Markierungsstifte benutzt werden, da diese eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Da Formaldehyd und Formamid gesundheitsschädlich sind, müssen alle Arbeitsschritte mit Formaldehyd und Formamid unter dem Abzug durchgeführt werden. Es wurde stets unvergällter Ethylalkohol verwendet, alle Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt und wenn möglich autoklaviert. Tabelle 48 gibt eine Übersicht über die aufeinanderfolgenden Arbeitsschritte wieder.

**Tab. 48: Anleitung für FISH.**

Substanz	Dauer	Temperatur	Funktion
Fixierlösung	1 – 4 h	4°C	fixieren der Zellen
1x PBS	30 min	4°C	waschen
1x PBS und 100% Ethanol im Verhältnis 1:1		-20°C	aufbewahren
Für Flüssigkulturen Objektträger vorbereiten, für Biofilme Anoden zurecht schneiden			
0,1 M HCl	1 min	RT	permeabilisieren der Zellen
ddH <sub>2</sub> O	quickdip	RT	waschen
		30 – 37°C	trocknen
		4°C	aufbewahren
Hybridisierungspuffer mit Sonde	2 h	46°C	hybridisieren
Waschpuffer	quickdip	48°C	waschen
Waschpuffer	15 min	48°C	waschen
ddH <sub>2</sub> O	quickdip	RT	waschen
1x SSC	10 min	RT	waschen
		30 – 37°C	trocknen
DAPI oder SYTO 45	5 - 25 min	RT	unspezifisches Färben der DNA
		4°C	aufbewahren

### 5.1 FISH von Flüssigkulturen

Die FISH-Sonden wurden anhand von Reinkulturen auf ihre Spezifität überprüft. Außerdem wurden von den Überständen der Brennstoffzellen wie auch vom Abwasser Proben für eine FISH-Analyse entnommen.

#### 5.1.1 Fixierung von biologischen Proben

Zur Vorbereitung wurden alle Zellen mit 4% Formaldehyd in 1x PBS fixiert (Tab. 49). Dazu wurde von Flüssigkulturen 1 ml für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5418,

Eppendorf), der Überstand verworfen und mit 1 ml Fixierlösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 4°C für 1 h fixiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Resuspendieren wurde 1 ml 1x PBS genommen und erneut bei 4°C für 30 min inkubiert. Dies wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor die Probe am Ende in 0,5 ml 1x PBS und 0,5 ml 100%igem Ethanol aufgenommen wurde. Diese konnte nun bei -20°C gelagert werden.

**Tab. 49: Fixierlösung.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
10x PBS (Tab. 50)	10 ml	1x
37% Formaldehyd	10,8 ml	4%
ddH <sub>2</sub> O	79,2 ml	-

**Tab. 50: 10x PBS.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
NaCl	80 g/l	1,4 M
KCl	2 g/l	26,8 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	7,64 g/l	42,9 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/l	14,7 mM
pH7,5		
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l	

### 5.1.2 Immobilisieren

Die fixierten Zellen aus der Flüssigkultur wurden auf Objektträger mit Teflonbeschichteten Vertiefungen (VWR, Darmstadt) immobilisiert. Dazu wurde pro Vertiefung 10 µl der Probe aufgetragen und bei 37°C angetrocknet. Anschließend wurde 0,1%ige low melt Agarose in 1x PBS aufgekocht und 2 - 3 Tropfen pro Vertiefung darauf pipettiert. Es folgte ein erneutes Trocknen bei 37°C.

### 5.1.3 Permeabilisierung der Zellmembran

Die Proben wurden mit 0,1 M HCl für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellmembran permeabel für die Sonden zu machen. Anschließend wurde mit Wasser

nachgespült. Für die Objektträger wurden dafür 50 ml-Reaktionsgefäße jeweils mit der entsprechenden Lösung gefüllt und die Objektträger senkrecht hinein gestellt. So wurde bei allen weiteren Schritten verfahren.

Danach wurden die Proben in einer Pappschachtel bei 37°C getrocknet und konnten dann bei 4°C über Nacht aufbewahrt werden.

### 5.1.4 Hybridisierung

Zum Hybridisieren wurde der Hybridisierungspuffer mit der entsprechenden Formamid-Konzentration (20 - 40% Formamid [FA]) benötigt (Tab. 51). Es wurde jeweils mit der höheren Formamid-Konzentration zuerst hybridisiert.

Für die Herstellung der Hybridisierungspuffer wurde bis auf das Formamid alles in ein 50 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei 60°C im Wasserbad erhitzt, bis das SDS erneut gelöst war. Anschließend wurde es auf Eis abgekühlt. Nun wurde unter dem Abzug weitergearbeitet und das Formamid dazugegeben. Die ganze Lösung wurde danach durch einen Sterilfilter in sterile 2 ml-Reaktionsgefäße filtriert. Diese konnten bei -20°C gelagert werden.

**Tab. 51: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers.**

Substanz	20% [FA]	30% [FA]	40% [FA]
5 M NaCl	1,08 ml	1,08 ml	1,08 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,0	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml
ddH <sub>2</sub> O	3,6 ml	3,0 ml	2,4 ml
20% SDS	3 µl	3 µl	3 µl
Formamid	1,2 ml	1,8 ml	2,4 ml

Außerdem wurden feuchte Hybridisierungskammern mit der entsprechenden Formamid-Konzentration (20 - 40%) benötigt (Tab. 52). Dazu wurde für die Objektträger in jedes 50 ml-Reaktionsgefäße ein Kimtech Tissue (Kimberly-Clark Professional, Koblenz-Rheinhafen) gegeben und mit einer Pipettenspitze unter die 10 ml-Markierung gedrückt. Nun konnte das Wasser wie auch das Formamid entsprechend der Formamid-Konzentration mit einem Endvolumen von 2 ml darauf pipettiert werden.

**Tab. 52: Zusammensetzung der feuchten Hybridisierungskammer.**

Substanz	20% [FA]	30% [FA]	40% [FA]
ddH <sub>2</sub> O	1,6 ml	1,4 ml	1,2 ml
Formamid	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml

Da an die Sonden kovalent ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, musste ab hier im Dunkeln gearbeitet werden. Die Sonden und Helferoligonukleotide wurden jeweils auf eine Konzentration von  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Sonden mit gleicher Formamid-Konzentration konnten gleichzeitig hybridisiert werden. Dazu wurden für die Objektträger 148  $\mu\text{l}$  entsprechender Hybridisierungspuffer mit je 1  $\mu\text{l}$  pro Sonde und wenn nötig je 1  $\mu\text{l}$  Helferoligonukleotid verwendet.

Bei den Objektträgern wurden je 15  $\mu\text{l}$  pro well Hybridisierungslösung verwendet. Die so behandelten Proben wurden waagrecht in die feuchten Kammern gelegt und im Hybridisierungsofen (Compact Line OV4, Biometra, Göttingen) für 2 h bei 46°C hybridisiert.

### 5.1.5 Waschen

Der Waschpuffer (Tab. 53) wurde für die entsprechende Formamid-Konzentration hergestellt und bei 48°C im Wasserbad erwärmt. Die 20fache Stocklösung von SSC (Tab. 54) musste autoklaviert werden. Nach dem Hybridisieren wurden laut Protokoll (Tab. 48) die Proben in Waschpuffer, Wasser und 1x SSC gewaschen. Anschließend wurde erneut getrocknet.

**Tab. 53: Bestandteile des Waschpuffers.**

Substanz	20% [FA]	30% [FA]	40% [FA]
5 M NaCl	2,15 ml	1,02 ml	0,46 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,0	1 ml	1 ml	1 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
20% SDS	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$
Aqua bidest.	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 50 ml

**Tab. 54: Zusammensetzung der 20fachen SSC-Stocklösung.**

Substanz	Menge	Endkonzentration
NaCl	175,3 g/l	3 M
Tri-Na-Citrat Dihydrat	88,2 g/l	300 mM
pH 6 mit HCl		
Aqua bidest.	ad 1 l	-

Für eine Färbung mit Sonden verschiedener Formamid-Konzentrationen wurde anschließend eine zweite Hybridisierung mit daran anschließendem Waschen durchgeführt.

### 5.1.6 Unspezifisches Färben der DNA

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) lagert sich an AT-reichen Regionen der kleinen Furche der DNA an. Das Absorptionsmaximum liegt dann bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm. Von der DAPI-Lösung (Tab. 55) wurden je 15 µl auf die Proben gegeben und dann im Dunkeln für 5 min inkubiert. Anschließend wurde je zweimal mit Reinstwasser für 1 min gewaschen und in 100% Ethanol getaucht. Danach mussten die Proben erneut getrocknet werden.

**Tab. 55: 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) –Lösung.**

Substanz	Menge
Aqua bidest.	999 µl
DAPI [1 mg * ml <sup>-1</sup> ]	1 µl

### 5.1.7 Einbetten

Bevor die Objektträger mikroskopiert werden konnten, mussten die Proben eingebettet und mit einem Deckglas geschützt werden. Der Einbettpuffer musste im Dunkeln hergestellt werden und konnte dann im Dunkeln bei 4°C gelagert werden (Tab. 56). Auf jede Probe wurde ein Tropfen Einbettpuffer gegeben und ein langes Deckgläschen (24 x 60 cm<sup>2</sup>, Roth, Karlsruhe) draufgelegt, kurz gewartet und dann fest angedrückt.

Nun konnten die Objektträger bei -20°C im Dunkeln für einige Zeit gelagert und unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut werden.

**Tab. 56: Zusammensetzung des Einbettpuffers.**

Substanz	Menge
Citiflour	1,1 ml
Vectaschild	0,2 ml
1x PBS	0,1 ml

## 5.2 FISH von Anoden

Wenn nicht anders beschrieben, dann waren die Arbeitsschritte bei der FISH-Analyse von Anodenstücken gleich den Arbeitsschritten bei Flüssigkulturen.

### 5.2.1 Fixierung von biologischen Proben

Nach Beendigung der Brennstoffzellen-Läufe wurde die Anode samt Silikonplatten ausgebaut und in ein luftdichtverschließbares Plastikgefäß gegeben. Der Biofilm wurde dann mit 4% Formaldehyd in 1x PBS (Tab. 49) für 4 h bei 4°C fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung verworfen und für 30 min bei 4°C mit 1x PBS gewaschen, die Lösung wurde erneut verworfen und in 1x PBS und 100%igem Ethanol im Verhältnis von 1:1 bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 5.2.2 Immobilisieren

Die Anoden wurden aus den Silikonplatten geschnitten und in kleine Peel-A-Way Embedding Molds – Square/S22 Schälchen (Polysciences, Eppelheim) gelegt. Ein Einbetten in low melt Agarose war nicht notwendig.

### 5.2.3 Permeabilisierung der Zellmembran

Bei den Anodenstücken wurde die entsprechende Lösung vorsichtig drauf pipettiert und nach Ablauf der Zeit wieder abgenommen. So wurde bei allen weiteren Schritten verfahren.

### 5.2.4 Hybridisierung

Für die Anodenstücke in den Peel-A-Way Schälchen wurde ein luftdichtverschließbares Plastikgefäß verwendet, und ein Kimtech Tissue auf den Boden gelegt und entsprechend Wasser und Formamid drauf pipettiert (Tab. 52). Für die Anoden wurden 1,3 ml

Hybridisierungspuffer (Tab. 51) mit je 0,1 ml Sonde bzw. Helferoligonukleotid angesetzt und der Ansatz in die Schälchen gegeben.

### **5.2.5 Waschen**

Die Waschlösungen (Tab. 53) wurden in die Peel-A-Way Schälchen pipettiert und nach der Inkubationszeit wieder abgenommen.

### **5.2.6 Unspezifisches Färben der DNA**

Da die Dipping-Linse von Zeiss nicht durchlässig für UV-Licht ist, wurden die entsprechenden Proben anstatt mit DAPI mit SYTO 45 gefärbt. SYTO 45 hat ein Absorptionsmaximum bei 455 nm und das Emissionsmaximum bei 484 nm. Dazu wurde die Färbelösung senkrecht aufgetaut, und kurz abzentrifugiert. Dieser Schritt war notwendig, da SYTO 45 in DMSO gelöst ist. Zum Färben wurde eine 5  $\mu\text{M}$  Lösung, die mit Wasser verdünnt wurde, verwendet. Eine entsprechende Menge wurde auf die Probe gegeben und nach 25 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit abgenommen und es konnte weitergearbeitet werden.

Die DAPI-Färbung wurde wie bei den Flüssigkulturen durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1,5 ml 1  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  DAPI in die Peel-A-Way Embedding Molds gegeben. Vom Wasser und vom Ethanol wurden je 2 ml verwendet.

### **5.2.7 Einbetten**

Die gefärbten Anodenstücke wurden entweder direkt mikroskopiert oder im Dunkeln bei 4°C gelagert. Ein Einbetten war nicht notwendig.

## **6 Mikroskopie**

### **6.1 Agarose-Objektträger für lebende Kulturen**

Damit sich die lebenden Objekte unter dem Mikroskop nicht bewegten, wurden Objektträger mit Agarose beschichtet. Dazu wurde 1%ige Agarose mit 1x PBS (Tab. 50) aufgekocht und pro Objektträger 0,8 ml aufgetropft. Ein zweiter Objektträger wurde oben drauf gelegt. Die Objektträger konnten nun in feuchten Tüchern bei 4°C gelagert werden.

Vor dem Mikroskopieren wurde der obere Objektträger entfernt. Auf die Agaroseschicht wurden 2,5  $\mu\text{l}$  Probe gegeben und abschließend ein Deckglas darauf gelegt.

Die Kulturen wurden mit dem Mikroskop Leica DM5500 B mit einem 100er Objektiv betrachtet und mit der DFC300 FX digitale Farbkamera (Leica, Wetzlar) Bilder gemacht.

## 6.2 Bestimmung der Zellzahl

Für Zellzahl-Bestimmungen wurde das Leica DM750 Lichtmikroskop mit einem 40er Objektiv verwendet. Die Kulturen wurden so verdünnt, dass zwischen 10 – 70 Zellen pro Großquadrat zu zählen waren und es wurde die Neubauer *improved* Zählkammer (Tiefe 0,01 mm, Fläche 0,0025 mm<sup>2</sup>, Marienfeld, Lauda Königshofen) verwendet. Es wurden immer fünf Großquadrate gezählt und davon die Summe gebildet. Dies wurde 6 – 8-mal wiederholt. Mit den Angaben der Tiefe und Fläche der Großquadrate und der gezählten Zellzahl der Großquadrate ließ sich die Zellzahl pro ml berechnen.

## 6.3 Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass Fluorochrome, die mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, Licht mit einer längeren Wellenlänge emittieren. Dazu wird das Anregungslicht durch einen Filter entsprechender Wellenlängendurchlässigkeit geleitet. Zwischen dem Objekt und der Kamera bzw. dem Okular befindet sich dann ein dichromatischer Filter, der nur Licht mit einer höheren Wellenlänge als das Anregungslicht hindurch lässt. Der anschließende Emissionsfilter lässt dann wiederum kein Licht mit höherer Wellenlänge als der des Emissionslichts durch. Mit dieser Konstruktion wird sichergestellt, dass nur das Emissionslicht und nicht das Anregungslicht oder anderes Störlicht detektiert wird.

Als Fluorochrome wurde FITC, Cy3, DAPI und SYTO 45 verwendet. FITC wird beim Fluoreszenzmikroskop im cyanem Spektrum angeregt und das emittierte Licht liegt im Bereich des grünen Filters. Cy3 wird von grünem Licht angeregt und gelbes Licht wird emittiert. DAPI wird mit UV-Licht angeregt und emittiert blaues Licht. Im Gegensatz dazu wird SYTO 45 mit blauem Licht angeregt und die Emission liegt im Bereich des cyanen Filters (Tab. 57).

Für die Objektträger wurde jeweils ein 100x Ölimmersionsobjektiv mit Öl für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Anodenstücke wurden für die Mikroskopie mit einer Klebepistole in kleine Petrischalen fixiert und mit Wasser gefüllt. Dies ermöglichte die Verwendung einer Dipping-Linse.

**Tab. 57: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und die passenden dichromatischen Filter.**

Fluoreszenzfarbstoff (Anregung – Emission)	Filter bei Zeiss (Anregung – dichromatischer Filter – Emission)	Filter bei Leica (Anregung – dichromatischer Filter – Emission)
DAPI (358 – 461 nm)	-	A4 (BP 360 – 400 - BP 470 nm)
SYTO 45 (455 – 484 nm)	47 HE (436 – 455 – 480 nm)	-
FITC (495 – 520 nm)	38 HE (470 – 495 – 525 nm)	L5 (BP 480 – 505 – BP 527 nm)
Cy3 (550– 568 nm)	43 HE (550 – 570 – 605 nm)	Y3 (BP 545 – 565 – BP 610 nm)

## 6.4 Bildbearbeitung

Für die Bearbeitung der in z-Stacks aufgenommenen Bilder zu einem dreidimensionalen Bild wurde die Software ImageJ (Rasband, 1997 - 2004) verwendet.

## 7 Analytische Methoden

### 7.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Schwerte) bestimmt.

### 7.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 von 465 nm auf 595 nm, wenn dieser an Protein gebunden ist. Rinderserumalbumin (BSA) diente als Proteinstandard und eine Stocklösung mit  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  wurde angesetzt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Es wurde eine Eichreihe mit  $0, 20, 40, 60, 80$  und  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  angesetzt.

Von den Kulturen wurden zu bestimmten Zeiten jeweils 10 ml Kultur abgenommen, abzentrifugiert und in 1 ml resuspendiert. Nun konnten sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden. Nach dem Auftauen wurde das gleiche Volumen an 0,4 M NaOH zugegeben und die Proben 5 min bei 95°C gekocht.

Von den zu bestimmenden Proteinproben wurden verschiedene Verdünnungen erstellt und jeweils 20 µl der Verdünnungen wie auch der BSA-Eichreihe mit 180 µl Bradford-Lösung (Tab. 58) in einer 96-well-Mikrotiterplatte NUNC Typ-F (Apogent, Roskilde, Dänemark) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Absorption bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (iMark Microplate Reader, Biorad, München) gemessen werden. Mit Hilfe der Eichgeraden wurde aus den unter Berücksichtigung der Verdünnung bzw. Ankonzentrierung der Probe die Proteinkonzentration der Ausgangslösung bestimmt.

**Tab. 58: Zusammensetzung der Bradford-Lösung.**

Substanz	Menge
Coomassie brilliant blue G250	150 mg
Ethanol	50 ml
konzentrierte Phosphorsäure	100 ml
Aqua dest.	ad 1 l

### 7.3 Quantifizierung der Metallreduktion

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde u. a. anhand der Eisen(III)-Reduktion bestimmt. Dabei wurde die Zunahme der Eisen(II)-Konzentration im Medium der Kulturen, die mit Eisen(III)-Citrat wuchsen, durch einen Ferrozine Assay nach Ruebush *et al.* bestimmt (Ruebush, 2009). Dies ist möglich, da das Ferrozine mit den Eisen(II)-Ionen einen blauen Farbkomplex bildet. Diese Farbänderung lässt sich bei 562 nm photometrisch messen.

Die zu bestimmenden Proben wurden steril aus den anaeroben Flaschen entnommen und davon sofort 100 µl in 900 µl 1 M HCl gegeben. Dieser Schritt ist notwendig, um ein Reoxidieren des Eisen(II) zu Eisen(III) an Luft zu verhindern. Falls die unbekanntes Proben außerhalb der Eichgerade lagen, wurde mit 1 M HCl verdünnt. Für die Erstellung

einer Eichgeraden wurden Lösungen mit 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mM Ammoniumeisensulfat-Lösungen hergestellt.

In eine 96-well-Mikrotiterplatte NUNC Typ-F (Apogent, Roskilde, Dänemark) wurden je 20 µl Probe vorgelegt und 180 µl Ferrozine-Lösung (Tab. 59) dazugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 562 nm mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät (iMark Microplate Reader, Biorad, München) gemessen und die Absorption der Eichproben gegen die Ammoniumeisensulfat-Konzentration aufgetragen.

Die Berechnung der Eisen(II)-Konzentration der Kulturen mit Eisen(III)-Citrat konnte anhand der Eichgerade abgelesen werden und unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte berechnet werden.

**Tab. 59: Reagenzien für die Ferrozine-Lösung zur Bestimmung der Fe(II)-Konzentration.**

Substanz	Menge
Ammoniumacetat	150 g
3-(2-Pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-triazine-5',5''-disulfonic acid	0,3 g
Aqua dest.	ad 300 ml

### 7.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Wachstums von Bakterien ist die Messung des Verbrauchs der Kohlenstoffquellen und die Entstehung von Produkten. Dazu wurden von den Wachstumskulturen Proben zu bestimmten Zeiten entnommen und bei Höchstgeschwindigkeit für 2 min abzentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf). Anschließend wurden die Proben durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße (PTFE, VWR, Darmstadt) filtriert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Pro Messung wurden 100 µl Probe in 10 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegeben und davon 90 µl auf einer Aminex-Säule HPX-87H (Biorad, München) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography* - HPLC) aufgetragen. Als Laufmittel wurde 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verwendet und die Flussrate betrug 0,6 ml \* min<sup>-1</sup>. Jeder Lauf dauerte 30 min und nach vier bis fünf Läufen wurde ein Waschschrift durchgeführt. Der Durchfluss wurde dann mittels eines Dioden Array Detektors L-2455 (Hitachi, San Jose, USA) bei 210 nm auf Verbindungen mit C=O Bindungen hin untersucht. Anhand einer

Eichgerade der zu bestimmenden C=O- Verbindung im Medium ohne Elektronendonator war eine Quantifizierung möglich.

### **7.5 Bestimmung des totalen organischen Kohlenstoffs**

Ein wichtiger Parameter für die Beurteilung der organischen Belastung des Abwassers ist der Anteil des gesamten organischen Kohlenstoffs (engl. *total organic carbon* – TOC). Der TOC-Wert einer Probe lässt sich mittels Bestimmung des insgesamt vorhandenen Kohlenstoffs (engl. *total carbon* – TC) und des totalen anorganischen Kohlenstoffs (engl. *total inorganic carbon* – TIC) ermitteln (Formel (8)).

(8)

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC}$$

Mittels thermischer Oxidation bei 800°C mit Sauerstoff und Platin als Katalysator wird der TC einer Probe zu CO<sub>2</sub> umgesetzt. Anschließend wird das CO<sub>2</sub> mit einem NDIR-Detektor (Nichtdispersive Infrarot-Detektion) gemessen. Da nur der TOC von Interesse war, wurde mittels des Differenzverfahrens erst der TIC und dann der TC der Probe bestimmt und danach der TOC berechnet. Der TIC einer Probe lässt sich messen, indem mit 10% ortho-Phosphorsäure die Probe angesäuert und dadurch der TIC als CO<sub>2</sub> ausgetrieben wurde. Das CO<sub>2</sub> wurde mit dem NDIR-Detektor bestimmt.

Es wurde der multi N/C 2100S und der TOC-Gas-Generator TG 600 von Analytik Jena (Jena) verwendet. Während des Laufs der großen Brennstoffzellen wurde täglich eine Probe genommen und direkt eingefroren. Zum Messen wurden die Proben nach dem Auftauen mit Reinstwasser 1:10 verdünnt. Davon wurden jeweils 250 µl mit geladen. Dies wurde für jeden Analyseschritt mindestens drei Mal durchgeführt. Falls die Abweichung zu groß war, wurden von der Probe ein viertes Mal 250 µl geladen. Im ersten Schritt wurde der TIC bestimmt und anschließend der TC. Der TOC-Wert wurde automatisch daraus berechnet.

### **7.6 Bestimmung der Coulomb-Effizienz**

Um die Leistung verschiedener Brennstoffzellen miteinander zu vergleichen, wurde die Coulomb-Effizienz berechnet. Sie gibt an, wie effizient die vorhandene chemische Energie zu elektrischem Strom umgesetzt wurde. Mit der vorhandenen chemischen

Energie werden die Elektronen, die bei der Oxidation des Elektronendonors zu CO<sub>2</sub> frei werden, erfasst.

Bei einer unbekanntem Elektronendoninquelle wie Pepton oder Fleischextrakt, wird die Abnahme des TOC-Werts über die Zeit bestimmt. Über das Molekulargewicht von Kohlenstoff (12,011 g \* mol<sup>-1</sup>) lässt sich die molare Menge an verbrauchtem Kohlenstoff berechnen. Mit der Annahme, dass pro 1 mol verbrauchtem Kohlenstoff 4 mol Elektronen entstehen, wurde die theoretisch entstandene molare Menge an Elektronen berechnet.

Gleichzeitig wird der Strom über die Zeit aufgezeichnet. Aus diesem Graph lässt sich die produzierte elektrische Ladung nach Formel (9) berechnen.

(9)

$$Q = I * t$$

Dabei ist die elektrische Ladung Q in Coulomb das Produkt aus dem Strom I in Ampere und der Zeit t in Sekunden. Über Integration des Graphen mit dem Programm OriginPro 9.0G (Northampton, USA) konnte für jeden Zeitpunkt die gemessene elektrische Ladung angegeben werden. Da 1 mol Elektronen eine elektrische Ladung von 96500 C haben, kann aus der elektrischen Ladung berechnet werden, wie viele Elektronen auf die Anode übertragen wurde.

Die Coulomb-Effizienz ist schließlich der Quotient aus übertragenen Elektronen zu theoretisch entstandenen Elektronen.

### 7.7 Statistische Analyse

Von allen Ergebnissen wurde der Mittelwert und der Standardabweichung (engl. *standard deviation* – SD) angegeben. Um eine Aussage über einen signifikanten Unterschied zwischen unabhängigen Werten zu treffen, wurde eine statistische Analyse mit SPSS (IBM, Ehningen) durchgeführt. Dazu wurden alle Datensätze im ersten Schritt auf Normalverteilung überprüft. Mit allen normalverteilten Datensätzen konnte im nächsten Schritt ein ungepaarter t-Test gemacht werden. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 5% gesetzt. Beim Levene-Test war von Interesse, ob die Signifikanz > 0,05 war und dementsprechend die Varianzen gleich. Danach konnte der zweiseitige t-

Test ausgewertet werden. Es wurde von einem signifikanten Unterschied gesprochen, wenn der Signifikanzwert  $p < 0,05$  war.

Um biologische Systeme wie den Brennstoffzellen mit Abwasser, die nur im Triplikat gemacht wurden, miteinander vergleichen zu können, wurde der Median und MADN (engl. *normalized median of absolute deviation*) berechnet. Dabei ist der MADN der Median der Beträge der Abweichungen der Einzelwerte vom berechneten Median (siehe Formel (10)). Dies stellt sicher, dass Ausreißer weniger gewichtet werden (Babanova *et al.*, 2014).

(10)

$$MADN = \frac{\text{Median } |x_i - \bar{x}|}{0,6745}$$



### III Ergebnisse

Im Zuge dieser Doktorarbeit sollte die Interaktion zwischen Mikroorganismen und Elektroden in mikrobiellen Brennstoffzellen untersucht werden. Dazu waren zum einen elektrochemische Parameter wie Konditionierungsphase und Lastkurve von Interesse und zum anderen auch die mikrobiologische Aktivität wie Biofilmbildung auf der Anode. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden drei verschiedene Elektrodenmaterialien mit den beiden Modellorganismen für extrazelluläre Atmung – *S. oneidensis* MR-1 und *G. sulfurreducens* PCA - untersucht und dabei ein Charakterisierungsschema mit vier Schritten erstellt.

Dieses Charakterisierungsschema wurde im zweiten Teil dann für gemischte mikrobielle Brennstoffzellen, die mit *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* gleichzeitig gestartet wurden, verwendet. Dabei war von Interesse, ob bei Co-Kultivierung die Wahl des Elektrodenmaterials Einfluss auf die Biofilmbildung hatte. Anschließend wurde die elektrochemische Charakterisierung von zwei weiteren Stämmen – *G. metallireducens* GS-15 und *D. propionicus* Lindhorst (1pr3) – durchgeführt. Im Anschluss daran konnte ein direkter Vergleich der vier exoelektrogenen Mikroorganismen angestellt werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit ging es um die Fragestellung, wie sich dieser anodische Biofilm unter Anwendungsbedingungen verhält. Dazu wurde das Elektrodenmaterial aus dem zweiten Teil verwendet, das die beste Biofilmbildung unter Co-Kultivierung zeigte. Als Inokulum wurde eine Bakterienmischung aus *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens* und *G. metallireducens* verwendet. Als erstes wurde die Stabilität des Biofilms unter kontinuierlichem Mediumzufluss getestet. Danach wurde die Stabilität des Biofilms in mikrobiellen Brennstoffzellen mit Abwasser überprüft und es wurde der Fragestellung nachgegangen, ob eine Vorinkubation der Anode mit exoelektrogenen Mikroorganismen einen Vorteil gegenüber nicht-vorinkubierten Anoden in mikrobiellen Brennstoffzellen mit Abwasser hat.

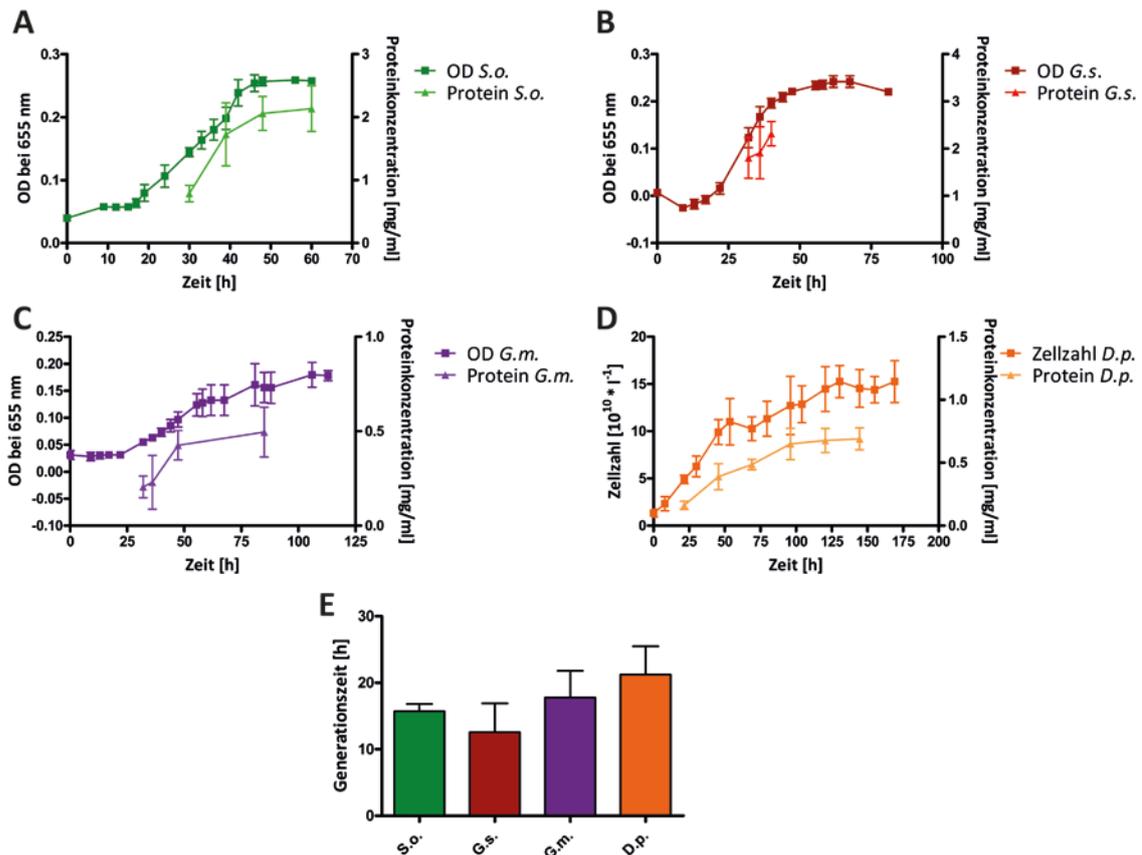
## Teil I: Etablierung eines Charakterisierungsschemas für Elektrodenmaterialien

### 1 Etablierung eines gemeinsamen Mediums

Im ersten Schritt wurde ein Medium entwickelt, in dem alle vier Organismen ähnlich wachsen konnten. Dies war notwendig, um keine Artefakte in mikrobiellen Brennstoffzellen aufgrund von entweder verschiedenen Medien oder von Inkompatibilität der Organismen mit dem Medium zu beobachten. Aufgrund der Notwendigkeit von CO<sub>2</sub> für den Stoffwechsel von *Geobacter* sp. (Mahadevan *et al.*, 2006) wurde ein CO<sub>2</sub>-gepuffertes Medium gewählt. Da bei der Anzucht der Bakterien für anschließende mikrobielle Brennstoffzellenversuche Eisen als Elektronenakzeptor nicht geeignet ist (Eisen pelletiert beim Abzentrifugieren zusammen mit der Biomasse), wurden als terminale Elektronenakzeptoren im Anaerobenmedium I Fumarat und Nitrat gewählt. Da auch die Stoffwechseleigenschaften unterschiedlich waren, wurde Lactat und Acetat gleichzeitig als Kohlenstoff-Quelle und Elektronendonator verwendet.

Um das Wachstum in anaeroben Kulturflaschen zu verfolgen, wurde zum einen für *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens* und *G. metallireducens* die optische Dichte bei 655 nm gemessen. Da innerhalb der ersten Stunden bei *D. propionicus* ein schwarzer Niederschlag zu sehen war, wurde für diesen Stamm anstatt der optischen Dichte die Zellzahl bestimmt. Aus diesen Werten wurde jeweils die Generationszeit des Stammes in dem Anaerobenmedium I berechnet. Die schnellste Generationszeit hatte *G. sulfurreducens* mit  $12,6 \pm 4,4$  h (SD), gefolgt von *S. oneidensis* mit  $15,7 \pm 1,1$  h (SD), *G. metallireducens* mit  $17,8 \pm 4,0$  h (SD) und *D. propionicus*  $21,3 \pm 4,2$  h (SD) (Abb. 19). Nur zwischen *G. sulfurreducens* und *D. propionicus* ist der Unterschied signifikant ( $p = 0,022$ ), bei den anderen Stämmen sind die Unterschiede der Generationszeiten nicht signifikant zueinander.

Zum anderen wurde das Wachstum anhand der Zunahme des Proteingehalts bestimmt. Dazu wurden zu bestimmten Zeiten aus den anaeroben Kulturflaschen Proben entnommen und nach der Bradford-Methode der Proteingehalt bestimmt. In Abbildung 19 ist zu sehen, dass der Anstieg der optischen Dichte bzw. der Zellzahl zeitlich parallel zum Anstieg vom Proteingehalt im Anaerobenmedium I verläuft. *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* Kulturen erreichten einen Proteingehalt von mindestens  $2,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



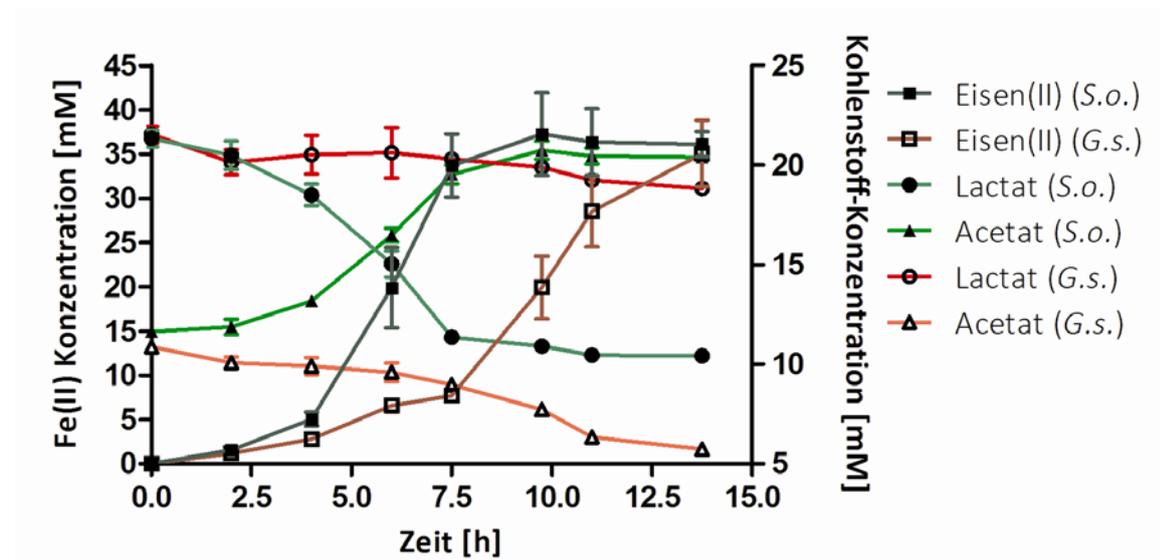
**Abb. 19: Wachstumskurven im Anaerobenmedium I.** Als Elektronendonator wurden 20 mM Lactat und 10 mM Acetat und als Elektronenakzeptor 40 mM Fumarat und 10 mM Nitrat verwendet. **A)** *S. oneidensis* (S.o.), **B)** *G. sulfurreducens* (G.s.) und **C)** *G. metallireducens* (G.m.). Auf der linken y-Achse ist die optische Dichte (OD) bei 655 nm in kräftiger Farbe über die die Zeit aufgetragen und auf der rechten y-Achse die Proteinkonzentration in heller Farbe über die Zeit. Alle Wachstumskurven wurden als Triplikate gemessen und der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. **D)** *D. propionicus* (D.p.). In kräftiger Farbe ist die Zellzahl (linke y-Achse) über die Zeit aufgetragen und in hellerer Farbe (rechte y-Achse) die Proteinkonzentration über die Zeit. Alle Versuche wurden in sechsfacher Ausfertigung durchgeführt und der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. **E)** Vergleich der Generationszeiten der Organismen *S. oneidensis* (S.o.), *G. sulfurreducens* (G.s.), *G. metallireducens* (G.m.) und *D. propionicus* (D.p.). Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung.

Der Proteingehalt von *G. metallireducens* und *D. propionicus* Kulturen erreichten hingegen nur Werte von 0,5 bis 0,7 mg \* ml<sup>-1</sup>. Es fällt auf, dass bei gleicher optischer Dichte der Proteingehalt in den *G. sulfurreducens* Kulturen doppelt so groß wie bei *S. oneidensis* Kulturen ist und viermal mehr als bei *G. metallireducens* Kulturen.

Dennoch war ein gemeinsames Medium, in dem alle vier Modellorganismen mit ähnlichen Wachstumsraten wachsen konnten, etabliert.

## 2 Vergleich der Eisenreduktion und Stoffwechseleigenschaften von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens*

Um direkt das Wachstum unter Bedingungen wie in mikrobiellen Brennstoffzellen zu verfolgen, wurden im Anaerobenmedium I die Elektronenakzeptoren Fumarat und Nitrat durch Eisen(III)-Citrat ersetzt. Eisen(III)-Citrat ist im Gegensatz zu den beiden anderen Elektronenakzeptoren nicht membrangängig und somit wird eine extrazelluläre Reduktion des Elektronenakzeptors wie bei der Anodenatmung simuliert. Dabei konnte die Eisenreduktionsrate zur Bestimmung des Wachstums gemessen werden. *S. oneidensis* hatte unter diesen Bedingungen eine schnellere Eisenreduktionsrate als *G. sulfurreducens* [ $1,3 \pm 0,2$  vs.  $1,9 \pm 0,3$  mM Eisen(II) \* h<sup>-1</sup> (SD)]. *S. oneidensis* verbrauchte nur Lactat als C-Quelle [ $10,9 \pm 0,3$  mM (SD)]. Das verbrauchte Lactat wurde in  $8,8 \pm 0,2$  mM (SD) Acetat und Biomasse umgesetzt. Dies verweist auf einen anabolischen Substratverbrauch von 2,1 mM, was 19% entspricht. Entsprechend wurden 36 mM Eisen(III)-Citrat zu Eisen(II) reduziert, was einen ungefähren Verbrauch von 4 mol Elektronen pro mol katabolisch umgesetztes Lactat bedeutet (Abb. 20).



**Abb. 20:** Wachstumskurve von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* im Anaerobenmedium I mit Eisen(III)-Citrat als Elektronenakzeptor. Die Experimente wurden in vierfacher Ausfertigung durchgeführt. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. Eisen(II)-Konzentrationen sind mit Quadrat symbolisiert, Kreis- und Dreiecksymbole stehen für Lactat- bzw. Acetat-Konzentrationen. *S. oneidensis* (*S.o.*) wird durch geschlossene und *G. sulfurreducens* (*G.s.*) mit offenen Symbole gezeigt.

---

Unter den gleichen Bedingungen oxidierte *G. sulfurreducens*  $5,1 \pm 0,3$  mM (SD) Acetat und  $2,7 \pm 0,6$  mM (SD) Lactat. Gleichzeitig sind dabei 35,0 mM Eisen(II) entstanden. Mit insgesamt 42 mol entstandenen Elektronen wurden 7 mol Elektronen für den Anabolismus verwendet. Dies entspricht einem Anteil von 17% (Abb. 20).

Mit diesem Versuch ließ sich ein ähnliches Wachstum von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* unter Brennstoffzellenbedingungen messen. Somit konnten Elektrodenmaterialien mit diesen beiden Organismen im nächsten Schritt in mikrobiellen Brennstoffzellen verglichen werden.

### **3 Charakterisierungsschema für Elektrodenmaterialien mit *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens***

In den 3-Kammer-Brennstoffzellaufbauten wurden drei verschiedene Elektrodenmaterialien verwendet. Alle drei Materialien hatten gemeinsam, dass sie auf Graphit basieren. Sie unterschieden sich aber in anderen Eigenschaften wie der Porosität und der spezifischen Oberfläche. Zum Vergleich der verschiedenen Elektrodenmaterialien mit den zwei Modellorganismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* wurde das Anodenmedium I verwendet.

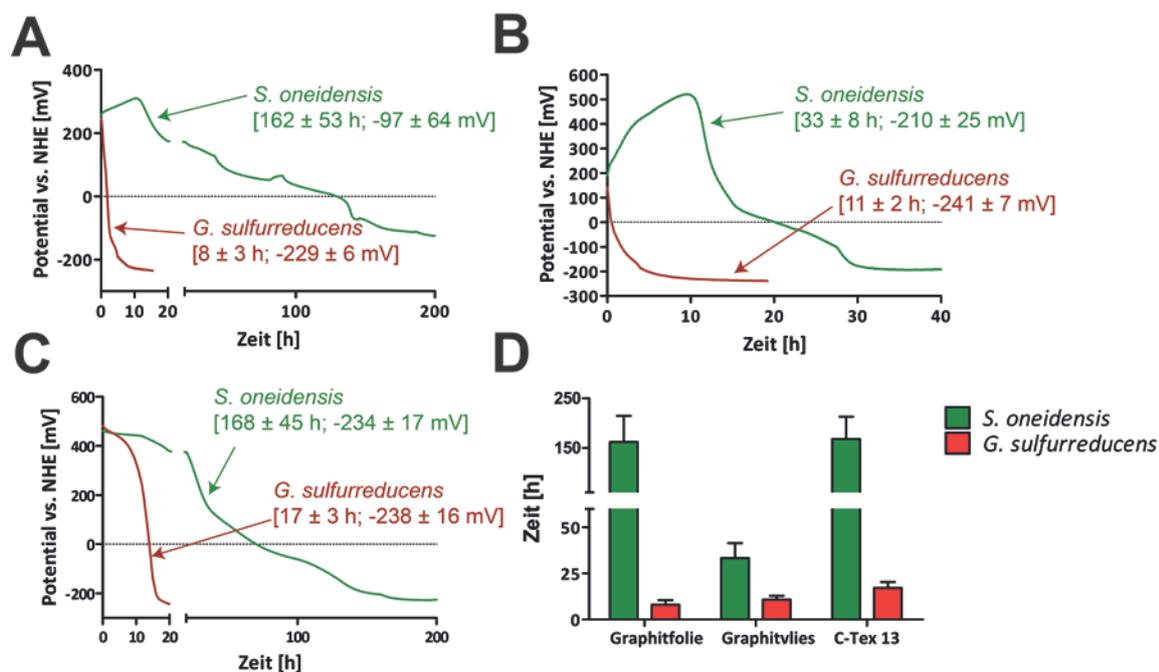
Die elektrochemische Charakterisierung bestand aus zwei Phasen, der galvanostatischen Konditionierung und einer anschließenden Lastkurve. Anschließend wurde die Besiedelung der Anodenoberfläche optisch untersucht und die Zellzahl quantitativ bestimmt.

#### **3.1 Galvanostatische Konditionierung**

In der ersten Phase wurde ein konstanter aber niedriger Strom von  $222,22 \text{ nA} \cdot \text{cm}^{-2}$  angelegt und die Abnahme des Potentials über die Zeit verfolgt. Die Zeit, die nötig war, bis ein konstantes Potential erreicht wurde, wurde als Konditionierungszeit bezeichnet.

Die zwei getesteten Stämme zeigten unterschiedliches Verhalten bei der Konditionierung. Mit Graphitfolie brauchte *S. oneidensis*  $162 \pm 53$  h (SD) um ein Potential von  $-97 \pm 64$  mV vs. NHE (SD) zu erreichen. *G. sulfurreducens* hingegen brauchte  $8 \pm 3$  h um ein konstantes Potential von  $-229 \pm 6$  mV vs. NHE (SD) einzustellen. Das finale Potential bei Brennstoffzellen mit Graphitvlies war für beide Organismen mit  $-210 \pm 25$  mV vs. NHE (SD) für *S. oneidensis* nach  $33 \pm 8$  h (SD) und für *G.*

*sulfurreducens* mit  $-241 \pm 7$  mV vs. NHE (SD) nach  $11 \pm 2$  h (SD) ähnlicher. Beim Vergleich von Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 als Elektrodenmaterial war das konstante Potential der Organismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* identisch [ $-234 \pm 17$  bzw.  $-238 \pm 16$  mV vs. NHE (SD)]. Jedoch unterschieden sie sich in der dafür benötigten Zeit. Während *S. oneidensis*  $168 \pm 45$  h (SD) brauchte, war bei *G. sulfurreducens* das konstante Potential bereits nach  $17 \pm 3$  h (SD) erreicht (Abb. 21 A-C). In Abbildung 21 D sind die benötigten Konditionierungszeiten der Organismen mit den drei Elektrodenmaterialien aufgetragen. Im Vergleich zeigte sich, dass mit jedem Material *S. oneidensis* eine längere Konditionierungszeit als *G. sulfurreducens* hatte. Und dass unabhängig vom Material *S. oneidensis* mit keiner Oberfläche so schnell ein konstantes Potential einstellen konnte wie *G. sulfurreducens*.



**Abb. 21: Galvanostatische Konditionierung bei  $222,22 \text{ nA} \cdot \text{cm}^{-2}$  für *S. oneidensis* (grün) und *G. sulfurreducens* (rot).** Es ist von den sechs unabhängigen Experimenten jeweils eins exemplarisch dargestellt. Die durchschnittliche Konditionierungszeit und das End-Potential sind mit Standardabweichung angegeben. **A)** Graphitfolie, **B)** Graphitvlies und **C)** Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13. **D)** Übersicht über die durchschnittlich benötigten Konditionierungszeiten bis zum Erreichen eines konstanten Potentials für jedes Material und Bakterium-Stamm.

### 3.2 Lastkurven

Nach Erreichen eines konstanten Potentials in der galvanostatischen Konditionierung wurde eine Lastkurve mit  $3,24 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  gestartet. Die vorausgeschaltete Konditionierungszeit ermöglichte es, dass eine bereits stabile Mikroorganismus-Elektroden-Interaktion auf die Möglichkeit der Unterstützung eines angelegten Stroms getestet werden konnte. Und dass der Ausgangswert ein mehr oder weniger homogenes Startpotential war. Die Ausnahme waren die mikrobiellen Brennstoffzellen mit *S. oneidensis* und Graphitfolie als Elektrodenmaterial, bei denen das Startpotential positiver war.

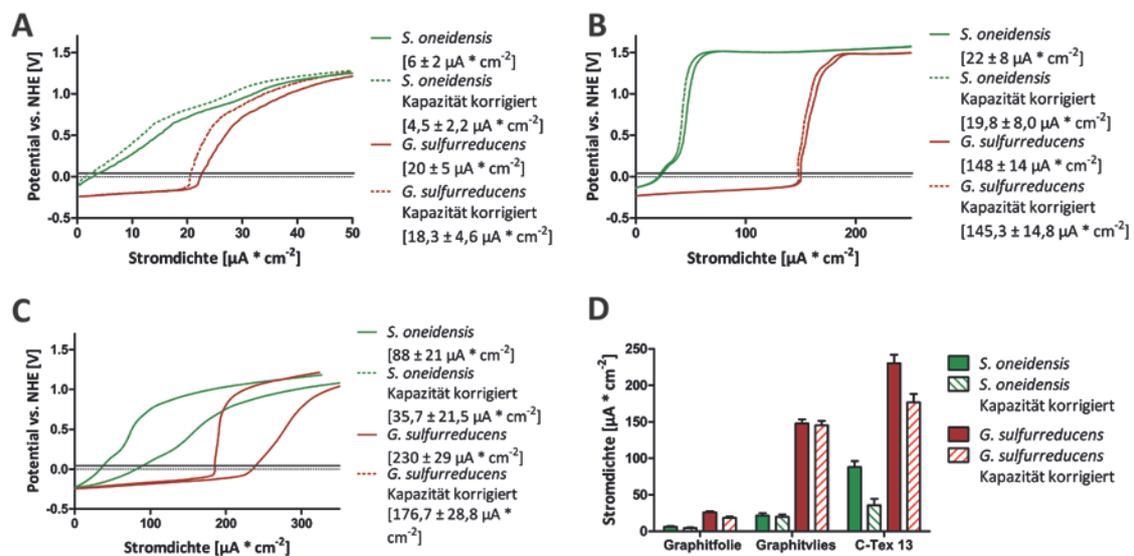
Um die verschiedenen Lastkurven der zwei Organismen miteinander vergleichen zu können, wurde die Stromdichte bei 41 mV vs. NHE als Vergleichswert festgelegt. Dieses Potential wurde gewählt, da die Lastkurven im Ganzen betrachtet keinen uniformen Verlauf zeigten, aber bei diesem Potential noch sehr ähnlich waren. Ab einem Potential von 1 V flacht die Steigung drastisch ab, da abiotische Wasserspaltung nun eine Rolle spielt, um den Bedarf an Elektronen durch den angelegten Strom weiterhin zu decken. Daher war ein Endpunktvergleich nicht möglich.

Um auch einen Vergleich der drei verschiedenen Elektrodenmaterialien miteinander anstellen zu können, musste die materialspezifische Doppelschicht-Kapazität der verwendeten Materialien bestimmt werden. Dies wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Sven Kerzenmacher vom IMTEK der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg bestimmt. Dazu wurden abiotische Brennstoffzellen mit den drei Elektrodenmaterialien gestartet und jeweils Lastkurven aufgenommen. Die daraus erhaltenen materialspezifischen Lastkurven wurden im Folgenden von den Lastkurven mit den Organismen und dem entsprechenden Material abgezogen. Die resultierenden Lastkurven repräsentieren die Eigenschaft der Organismen, die geforderten Elektronen zu liefern, und sind im Weiteren in gestrichelten Linien dargestellt.

Bei *S. oneidensis* nahm die Lastkurve bei der Graphitfolie und dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 stetig zu, bis ein Potential erreicht wurde, bei dem Wasserspaltung möglich war. Bei Graphitvlies hingegen war bei niedrigen Stromdichten erst ein langsamer Anstieg zu sehen bevor die Steigung steiler wurde. Bei niedrigeren Stromdichten zeigte *G. sulfurreducens* bei allen drei Materialien eine langsamere Elektrodenpolarisation im

Vergleich zu *S. oneidensis*. Erst ab einer höheren Stromdichte nahm die Steigung zu, bis das Potential zur Wasserspaltung ausreichte.

Die Stromdichten bei der Graphitfolie bei 41 mV vs. NHE war für *S. oneidensis*  $6 \pm 2 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD) und nach Abzug der materialspezifischen Doppelschicht-Kapazität  $4,5 \pm 2,2 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD). *G. sulfurreducens* zeigte wesentlich höhere Werte [ $20 \pm 5 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  bzw.  $18,3 \pm 4,6 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD)]. Auch mit Graphitvlies, bei dem mit einem gleichen Potential die Lastkurve gestartet wurde, zeigte *S. oneidensis* eine geringere Stromdichte [ $22 \pm 8 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  bzw.  $19,8 \pm 8,0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD)] als *G. sulfurreducens* [ $148 \pm 14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  bzw.  $145,3 \pm 14,8 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD)]. Bei der Graphitfolie wie auch dem Graphitvlies war die materialspezifische Doppelschicht-Kapazität gering. Das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 hingegen hatte eine hohe Doppelschicht-Kapazität. Dies zeigte sich in den Lastkurven, bei denen nach Abzug der Doppelschicht-Kapazität die Steigung steiler und der Kurvenverlauf dadurch charakteristischer wurde. Für *S. oneidensis* waren die Stromdichten bei 41 mV vs. NHE bei dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13  $88 \pm 21 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD) und nach Abzug der Doppelschicht-Kapazität  $35,7 \pm 21,5 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD). Auch hier erzielte *G. sulfurreducens* höhere Werte [ $230 \pm 29 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  bzw.  $176,7 \pm 28,8 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD)] (Abb. 22). In Abbildung 22 D ist zu sehen, dass bei beiden Organismen das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 die höchsten Stromdichten lieferte und dass die Werte von *G. sulfurreducens* immer höher waren als die von *S. oneidensis*.

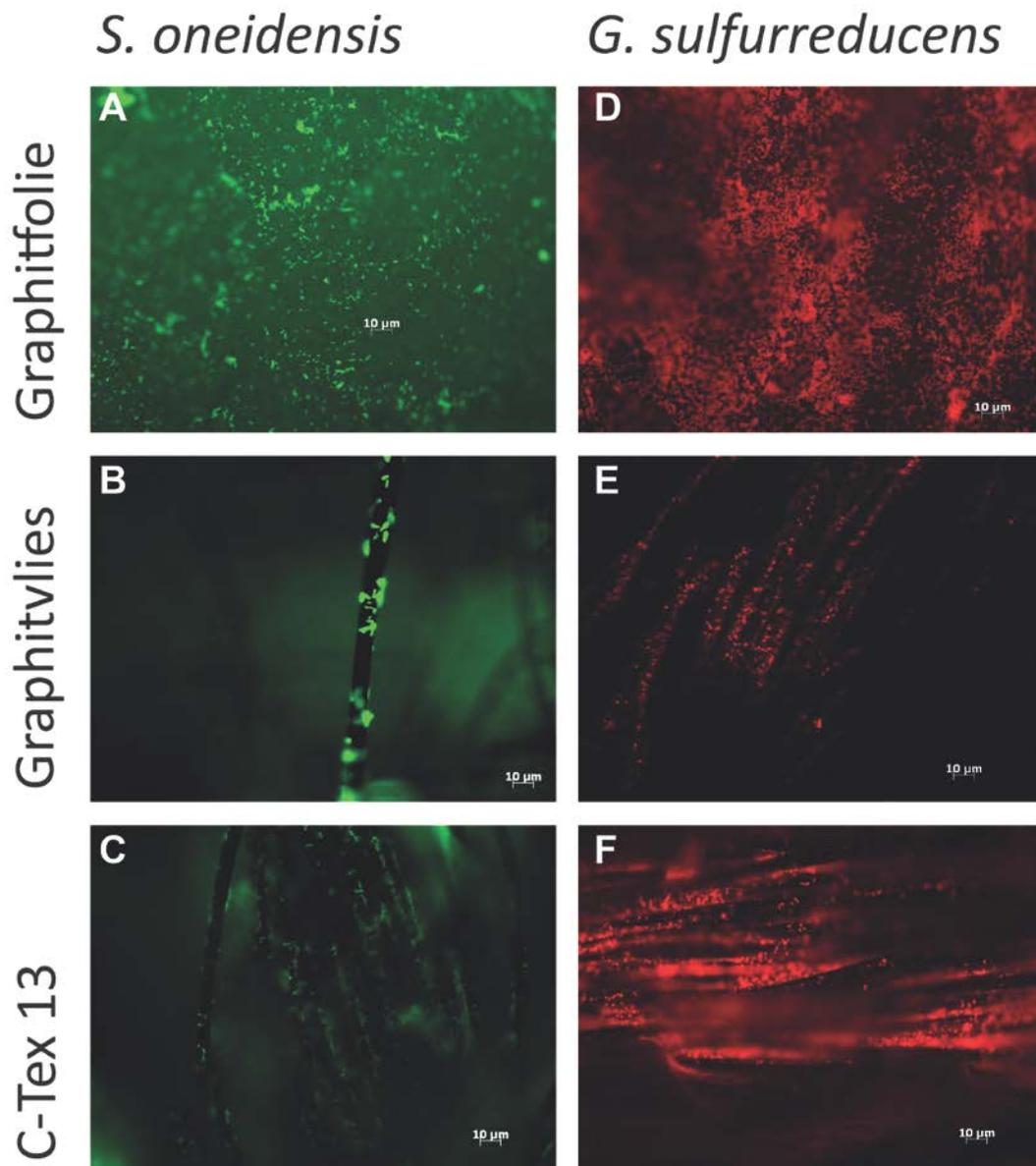


**Abb. 22: Lastkurven mit zunehmenden Strom von  $3,24 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  von *S. oneidensis* (grün) und *G. sulfurreducens* (rot).** Von den sechs unabhängig durchgeführten Experimenten ist jeweils eins exemplarisch gezeigt und die Zahlen verweisen auf die durchschnittliche Stromdichte bei 41 mV vs. NHE mit Standardabweichung. Gestrichelte Linien zeigen die Lastkurve nach Abzug der Kapazität. **A)** Graphitfolie, **B)** Graphitvlies und **C)** Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13. **D)** Vergleich der Stromdichten bei 41 mV vs. NHE der drei Materialien mit beiden Organismen. Gestreifte Balken kennzeichnen Kapazität-korrigierte Daten.

### 3.3 Besiedelung der Anodenoberfläche

Nach Beendigung der elektrochemischen Versuche der mikrobiellen Brennstoffzellen wurde die Besiedelung der Anode untersucht. Dabei ging es um die Fragestellung, ob die Populationsdichte auf der Anode oder die Fähigkeit der Bakterien Elektronen auf die Anode zu übertragen der limitierende Faktor in den mikrobiellen Brennstoffzellen war. Und ob dies bei unterschiedlichen Elektrodenmaterialien aus Kohlenstoff verschieden war.

Dazu wurden die Anoden als Ganzes fixiert und für FISH verwendet. Dabei ist in Abbildung 23 gut zu sehen, dass bei gleichem Elektrodenmaterial *S. oneidensis* im Vergleich zu *G. sulfurreducens* immer eine geringe Anzahl an sessilen Zellen zeigte. Und des Weiteren, dass bei *G. sulfurreducens* die Anzahl der sessilen Zellen von Graphitfolie, zu Graphitvlies und Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 zunahm (Abb. 23).



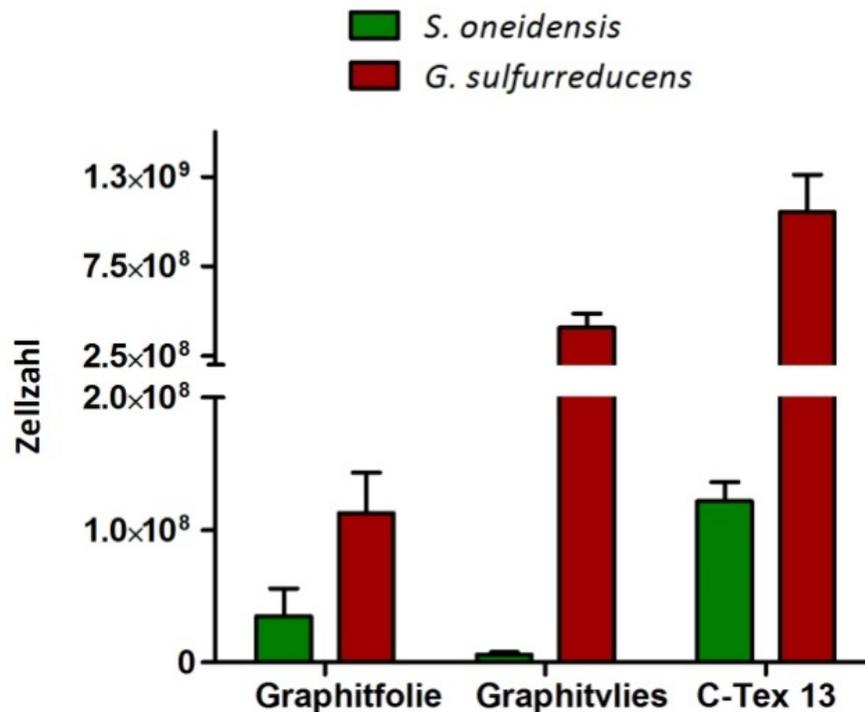
**Abb. 23:** Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungsbilder von *S. oneidensis* (grün) und *G. sulfurreducens* (rot) auf verschiedenen Elektrodenmaterialien. A – C) *S. oneidensis* Biofilm auf Graphitfolie, Graphitvlies und Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13. D - F) *G. sulfurreducens* Biofilm auf Graphitfolie, Graphitvlies und Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13.

### 3.4 Quantitative Analyse der sessilen Zellzahl

Um die optischen Beobachtungen aus den FISH-Bildern quantitativ zu bestätigen, wurde nach Ende der Brennstoffzellenläufe von den Anoden DNA isoliert und mittels qPCR die Anzahl der sessilen Organismen bestimmt. Dabei wurde jedes Elektrodenmaterial mit jeweils jedem einzelnen Mikroorganismus im Triplikate analysiert. Gleichzeitig wurde je eine Probe des Überstandes für die HPLC-Analyse entnommen, um die Substratkonzentrationen zu bestimmen. Bei allen Proben konnte noch genügend Kohlenstoff-Quelle detektiert werden.

Im Vergleich zwischen den beiden exoelektrogenen Mikroorganismen zeigte *G. sulfurreducens* bei jedem Elektrodenmaterial deutlich mehr sessile Zellen als *S. oneidensis*. Wurden die Materialien untereinander sich gegenüber gestellt, konnte immer auf dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13, welches die größte spezifische Oberfläche hat, bei beiden Organismen die meisten Zellen gefunden werden. Während *G. sulfurreducens*  $1,05 * 10^9 \pm 3,59 * 10^8$  (SD) sessile Zellen pro Anode aufwies, waren nur  $1,22 * 10^8 \pm 2,51 * 10^7$  (SD) *S. oneidensis* Zellen zu detektieren, was einen Anteil von 11,6% entspricht. Bei dem Graphitvlies waren es für *G. sulfurreducens* noch  $4,07 * 10^8 \pm 1,36 * 10^8$  (SD) und bei der Graphitfolie  $1,12 * 10^8 \pm 5,30 * 10^7$  (SD), was jeweils einen prozentualen Anteil von 38,8% bzw. 10,7% im Vergleich zu der auf dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 gefundenen Zellzahl entspricht. Bei *S. oneidensis* verhielt es sich anders. Während auf Graphitvlies-Anoden  $5,77 * 10^6 \pm 3,33 * 10^6$  (SD) Zellen detektiert wurden, was einen prozentualen Anteil von 4,7% im Vergleich zu der Anzahl auf Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 darstellt, zeigte die Graphitfolie  $3,49 * 10^7 \pm 3,61 * 10^7$  (SD) Zellen, was einen prozentualen Anteil von 28,6% entspricht. Bei den beiden anderen Materialien war die Zellzahl von *S. oneidensis* auf der Graphitfolie 31,2% und auf dem Graphitvlies 1,4% der entsprechenden Zellzahlen von *G. sulfurreducens* (Abb. 24).

Ein weiterer auffälliger Punkt bei den zwei Organismen war, dass die prozentuale Standardabweichung für *S. oneidensis* immer höher ausfiel als für *G. sulfurreducens*.



**Abb. 24: Anodenpopulation.** Die Anzahl der sessilen Zellen für die jeweiligen Anodenmaterialien sind für *S. oneidensis* Zellen in grün und für *G. sulfurreducens* Zellen in rot dargestellt. Die Zellzahl wurde mittels qPCR ermittelt und stellt den Mittelwert von unabhängigen Triplikaten dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

## Teil II: Anwendung des Charakterisierungsschemas

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte für *S. oneidensis* MR-1 und *G. sulfurreducens* PCA die erfolgreiche Etablierung einer Charakterisierungsroutine von Elektrodenmaterialien in mikrobiellen Brennstoffzellen gezeigt werden. Nachdem die Materialien mit den Reinkulturen getestet worden waren, war es nun von Interesse, wie sich die Elektrodenmaterialien bei einer gemischten Kultur verhielten. Dazu wurde die etablierte Charakterisierungsroutine verwendet und die erzielten Ergebnisse mit denen der Reinkulturen verglichen. Dies sollte Aufschluss in Bezug auf synergistische Wechselwirkungen bei der Biofilmbildung geben.

Im Anschluss wurde die gleiche Routine nicht zum Vergleich verschiedener Elektrodenmaterialien verwendet, sondern es stand die Beschreibung des Verhaltens von weiteren exoelektrogenen Mikroorganismen in Brennstoffzellen im Vordergrund. Dazu wurden *G. metallireducens* und *D. propionicus* elektrochemisch charakterisiert.

---

Abschließend konnten die vier unter gleichen Bedingungen charakterisierten Organismen miteinander verglichen werden.

## **1 Mikrobielle Brennstoffzellen mit einer Co-Kultur von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens***

Im Folgenden wurden das Graphitvlies wie auch das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 getestet. Die Graphitfolie war nicht von Interesse, da sich schon beim Vergleich der Reinkulturen die Limitierung des zweidimensionalen Materials zeigte. Um die Start-OD der Brennstoffzellen gleich zu halten, wurde von jedem Organismus nur die Hälfte der Bakterien als Inokulum verwendet. Alle anderen Bedingungen wurden unverändert übernommen.

### **1.1 Gemischte mikrobielle Brennstoffzellen mit Graphitvlies**

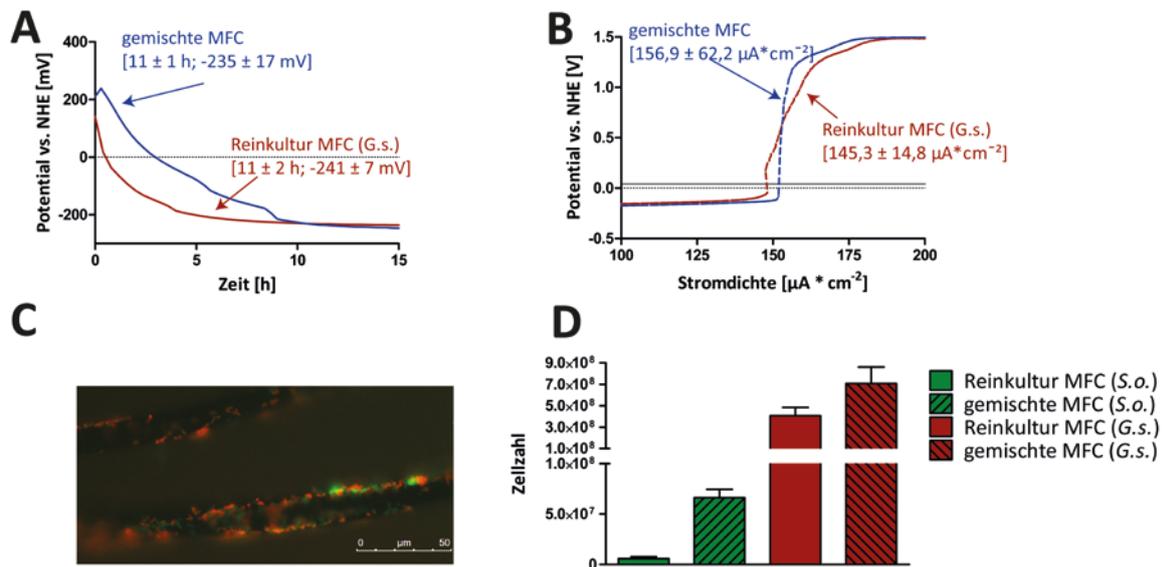
Als erstes Material wurde das Graphitvlies als Elektrodenmaterial in Brennstoffzellen mit einer Kombination aus beiden Mikroorganismen getestet. Die erhaltenen Werte wurden mit den Werten der Brennstoffzellen mit den Reinkulturen von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* mit Graphitvlies als Elektrodenmaterial verglichen. Die Konditionierungszeit verhielt sich mit  $11 \pm 2$  h (SD) wie auch das Endpotential mit  $-241 \pm 7$  mV vs. NHE (SD) ähnlich zu Brennstoffzellen, die nur mit *G. sulfurreducens* betrieben wurden (Abb. 25 A).

In der zweiten Phase, der Lastkurve, war die Kapazität-korrigierte Stromdichte bei 41 mV vs. NHE der gemischten Brennstoffzelle mit  $156,9 \pm 62,2$   $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD) leicht höher als bei den Reinkulturen. Allerdings war der beobachtete Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,279$ ) (Abb. 25 B).

Bei der FISH-Färbung ist eine gleichmäßige Verteilung der beiden Organismen auf dem Anodenmaterial zu sehen, mit einer Dominanz von *G. sulfurreducens* (Abb. 25 C).

Diese Dominanz von *G. sulfurreducens* auf der Anodenoberfläche ließ sich auch mittels qPCR nachweisen. Die Anzahl von *G. sulfurreducens* betrug  $6,99 \cdot 10^8 \pm 3,22 \cdot 10^8$  (SD), was einem Anteil von 91,3% an der Gesamtpopulation auf der Anode entsprach. Gleichzeitig bedeutet dies eine Steigerung der sessilen *G. sulfurreducens* Zellzahl um das 1,7fache im Vergleich zur Brennstoffzelle mit der Reinkultur. Bei *S. oneidensis* war die Zellzahl  $6,62 \cdot 10^7 \pm 1,67 \cdot 10^7$  (SD). Die Anzahl der sessilen *S. oneidensis* Zellen in den

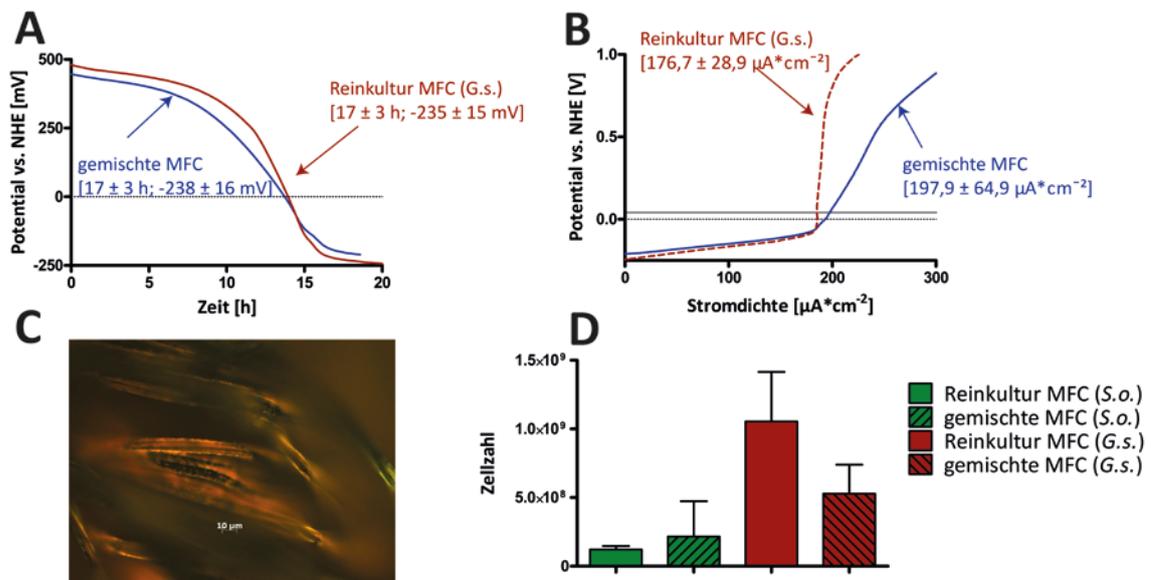
gemischten mikrobiellen Brennstoffzelle betrug elf Mal so viel wie in den Reinkultur-Brennstoffzelle mit Graphitvlies als Elektrodenmaterial (Abb. 25 D).



**Abb. 25: Gemischte Brennstoffzellen mit Graphitvlies.** Vergleich zwischen Reinkultur-Brennstoffzellen und gemischten Brennstoffzellen mit *S. oneidensis* (S.o.) und *G. sulfurreducens* (G.s.). **A**) Exemplarische Konditionierungsphase. Die Reinkultur-Brennstoffzelle mit *G. sulfurreducens* (G.s.) ist in rot gezeigt und die gemischte Brennstoffzelle in blau. **B**) Exemplarische Kapazität-korrigierte Lastkurve. Die rote Kurve zeigt eine exemplarische Lastkurve der Reinkultur-Brennstoffzelle mit *G. sulfurreducens* (G.s.) und die blaue Kurve zeigt die gemischte Brennstoffzelle. **C**) FISH von gemischtem Biofilm aus *S. oneidensis* (grün) und *G. sulfurreducens* (rot) auf Graphitvlies. **D**) Vergleich von sessilen Zellen zwischen Reinkultur-Brennstoffzellen und gemischten Brennstoffzellen. Die Anzahl der sessilen Zellen von *S. oneidensis* (S.o.) ist in grün gezeigt und von *G. sulfurreducens* (G.s.) in rot. Die Zellzahlen wurden mittels qPCR ermittelt. Gestreifte Balken zeigen die Zellzahl der gemischten Brennstoffzellen. Für die Reinkultur-Brennstoffzellen wurden die Versuche in Triplikaten und für die gemischten Brennstoffzellen in Quadruplikaten erstellt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung.

## 1.2 Gemischte mikrobielle Brennstoffzellen mit Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13

Als weiteres Material wurde das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 in gemischten mikrobiellen Brennstoffzellen als Elektrodenmaterial getestet. Die Konditionierungszeit der gemischten mikrobiellen Brennstoffzellen lag mit  $17 \pm 3$  h (SD) und das erreichte End-Potential mit  $-235 \pm 15$  mV vs. NHE (SD) innerhalb der Werte der entsprechenden mikrobiellen Brennstoffzellen mit *G. sulfurreducens* [ $17 \pm 3$  h (SD);  $-238 \pm 16$  mV vs. NHE (SD)] (Abb. 26 A). In der zweiten Phase war die Kapazität-korrigierte Stromdichte bei



**Abb. 26: Gemischte Brennstoffzellen mit Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13.** Vergleich zwischen Reinkultur-Brennstoffzellen und gemischten Brennstoffzellen mit *S. oneidensis* (S.o.) und *G. sulfurreducens* (G.s.). **A**) Exemplarische Konditionierungsphase. Die Reinkultur-Brennstoffzelle mit *G. sulfurreducens* (G.s.) ist in rot gezeichnet und die gemischte Brennstoffzelle in blau. **B**) Exemplarische Kapazität-korrigierte Lastkurve. Die rote Kurve zeigt eine Lastkurve der Reinkultur-Brennstoffzelle mit *G. sulfurreducens* (G.s.) und die blaue Kurve zeigt die gemischte Brennstoffzelle. **C**) FISH des gemischten Biofilms aus *S. oneidensis* (grün) und *G. sulfurreducens* (gelb) auf C-Tex 13. **D**) Vergleich von sessilen Zellen zwischen Reinkultur-Brennstoffzellen und gemischten Brennstoffzellen. Die Anzahl der sessilen Zellen von *S. oneidensis* (S.o.) ist in grün gezeichnet und von *G. sulfurreducens* (G.s.) in rot. Zellzahlen wurden mittels qPCR ermittelt. Gestreifte Balken zeigen die Zellzahl der gemischten Brennstoffzellen. Alle Versuche sind Triplikate. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung.

41 mV vs. NHE  $197,9 \pm 64,9 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD). Die mikrobiellen Brennstoffzellen mit *G. sulfurreducens* hatten dazu im Vergleich eine Stromdichte von  $176,7 \pm 28,9 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD) (Abb. 26 B). Dies stellte jedoch keinen signifikanten Unterschied dar ( $p = 0,069$ ).

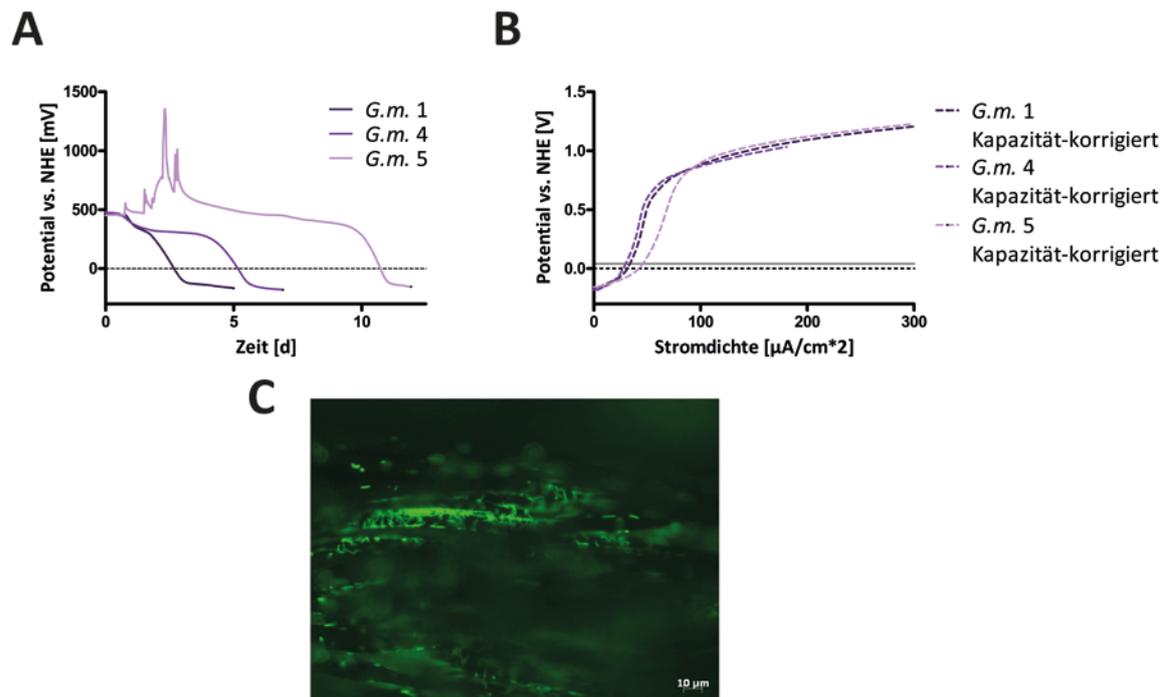
Das Phänomen der Steigerung der sessilen Zellzahl konnte bei der Verwendung des Aktivkohle-Gewebes C-Tex 13 als Elektronenmaterial nur bedingt beobachtet werden. Bei *S. oneidensis* gab es im Vergleich zur Reinkultur-Brennstoffzelle eine Steigerung um das 1,8fache [ $2,16 \cdot 10^8 \pm 2,56 \cdot 10^8$  (SD)]. Bei *G. sulfurreducens* hingegen konnten  $5,29 \cdot 10^8 \pm 2,11 \cdot 10^8$  (SD) Zellen auf der Anode detektiert werden, dies sind nur noch halb so viele sessile Zellen wie bei den Reinkultur-Brennstoffzellen [ $1,05 \cdot 10^9 \pm 3,59 \cdot 10^8$  (SD)]. Generell gab es eine erhöhte Varianz bei den gemischten mikrobiellen Brennstoffzellen mit dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 (Abb. 26 C).

## 2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit *G. metallireducens*

*G. metallireducens* GS-15 ist nah verwandt mit *G. sulfurreducens*. Sie unterscheiden sich jedoch stark in der Nutzung der Elektronendonoren. Beide Organismen haben gemeinsam, dass sie in der Lage sind, mit der Oxidation von Acetat Elektronen auf lösliche und unlösliche Elektronenakzeptoren zu übertragen. *G. metallireducens* hat zwar ansonsten ein größeres Elektronendonoren-Spektrum als *G. sulfurreducens*, ist aber nicht in der Lage Lactat zu verstoffwechseln (Aklujkar *et al.*, 2009). Um weitere Unterschiede zu untersuchen, wurde das Charakterisierungsschema für *G. metallireducens* angewandt. Als Elektrodenmaterial wurde das Aktivkohle-Gewebe C-TEX 13 verwendet.

Als erstes wurde die Konditionierungsphase gestartet mit anschließender Lastkurve. In Abbildung 27 A ist die galvanostatische Konditionierung für *G. metallireducens* mit dem Aktivkohle-Gewebe C-TEX 13 als Elektrodenmaterial zu sehen. Dabei fällt auf, dass die drei exemplarischen Kurven einen ähnlichen sigmoiden Verlauf zeigten. Jedoch war der Zeitpunkt, ab dem das Potential sank, unterschiedlich. Dies spiegelte sich auch in der hohen Varianz der durchschnittlichen Konditionierungszeit wieder [ $162 \pm 63$  h (SD)]. Am Ende der ersten Phase wurde bei allen Brennstoffzellenläufen ein Potential von  $-171 \pm 13$  mV vs. NHE (SD) erreicht. In der sich anschließenden zweiten Phase zeigten dann alle mikrobiellen Brennstoffzellen einen ähnlichen Verlauf der Lastkurve. Die Stromdichte bei 41 mV vs. NHE betrug nach Abzug der materialspezifischen Doppelschicht-Kapazität  $38,2 \pm 11,9$   $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD) (Abb. 27 B).

Die FISH-Färbung mit spezifischer Sonde für *G. metallireducens* zeigt, dass sich auf der Anodenoberfläche ein dünner Biofilm gebildet hat (Abb. 27 C).



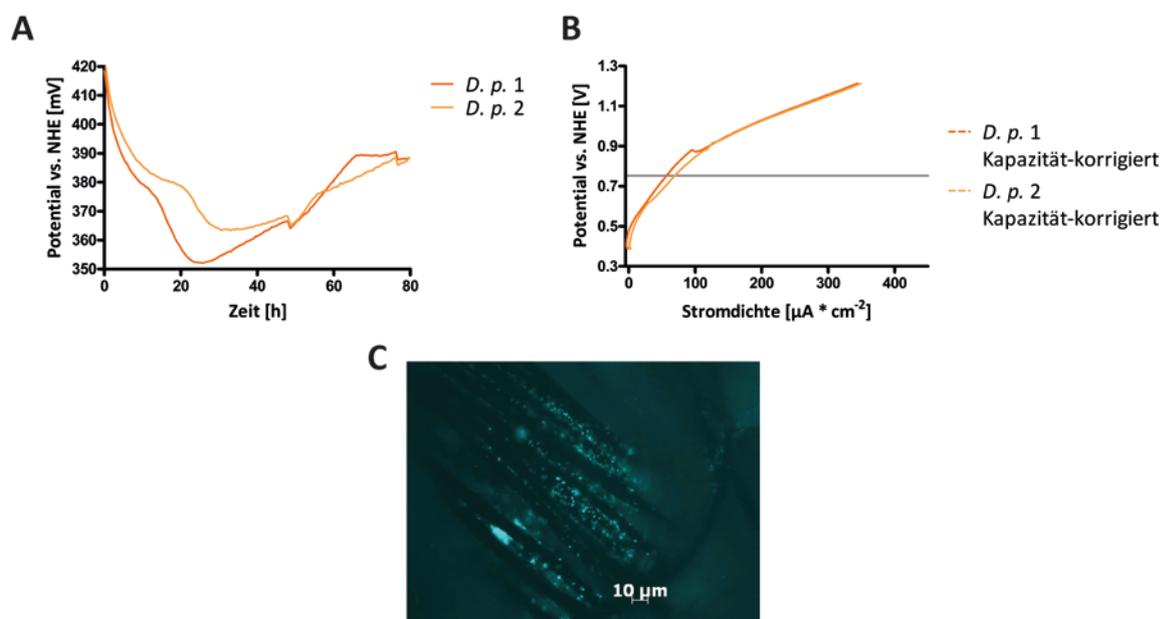
**Abb. 27: Mikrobielle Brennstoffzellen mit *G. metallireducens* (*G.m.*).** Als Elektrodenmaterial wurde das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 verwendet und exemplarisch sind drei Brennstoffzellenläufe gezeigt. **A)** Die Brennstoffzellen wurden bei  $222,22 \text{ nA} \cdot \text{cm}^{-2}$  galvanostatisch konditioniert bis das gemessene Potential konstant war. **B)** Anschließend wurde eine Lastkurven mit zunehmenden Strom von  $3,24 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  aufgenommen. Die gestrichelten Linien zeigen die Lastkurve nach Abzug der materialspezifischen Doppelschicht-Kapazität des Elektrodenmaterials. Die limitierende Stromdichte wurde bei 41 mV vs. NHE abgelesen. Es wurde je ein Sextett aufgenommen. **C)** FISH-Bild mit GEO1 angefärbte *G. metallireducens* Zellen auf der Anode.

### 3 Mikrobielle Brennstoffzellen mit *D. propionicus*

Als nächster Organismus wurde ein phylogenetisch weiter entfernter Stamm gewählt, der in der Literatur bisher auch kaum in mikrobiellen Brennstoffzellen verwendet wurde. *D. propionicus* Lindhorst (1pr3) gehört wie die beiden *Geobacter* Stämme zu den  $\delta$ -Proteobacteria und kann Lactat als Elektronendonator verwenden.

Mit *D. propionicus* als exoelektrogener Organismus wurden mikrobielle Brennstoffzellen mit dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 als Elektrodenmaterial gestartet. In der ersten Phase sank das Potential erst auf Werte von 352,1 mV vs. NHE nach 26 h bei der einer mikrobiellen Brennstoffzelle und bei dem anderen Aufbau auf 363,3 mV vs. NHE nach 33 h. Danach stieg das Potential jeweils wieder an, bis es nach 80 h einen Wert von  $388,49 \pm 0,08 \text{ mV vs. NHE (SD)}$  erreicht hatte (Abb. 28 A). In dieser Zeit wurde jeweils

zweimal 0,2 ml 2 M Lactat dazugegeben, um eine Limitierung des Elektronendonors zu verhindern. Am Ende der ersten Phase wurden Proben für die Lactat-Bestimmung mit der HPLC genommen. In beiden mikrobiellen Brennstoffzellen hatte die Konzentration an Lactat abgenommen, jedoch waren am Ende noch mindestens 4,6 mM Lactat vorhanden. Die Konzentrationen an Acetat und Propionat hingegen hatten zugenommen. Versuche in Kulturflaschen zeigten, dass *D. propionicus* mit Nitrat als Elektronenakzeptor Lactat verstoffwechseln konnte und dabei Acetat und Propionat entstand. Parallel dazu wurden Kulturen ohne Elektronenakzeptor bzw. mit Zugabe von steriler Luft gestartet. In beiden Ansätzen konnte eine Abnahme der Lactat-Konzentration und je eine Zunahme der Acetat- und Propionat-Konzentration gezeigt werden.



**Abb. 28: Mikrobielle Brennstoffzellen mit *D. propionicus*.** Als Elektrodenmaterial wurde das Aktivkohle-Gewebe C-TEX 13 verwendet. **A)** Die Brennstoffzellen wurden bei  $222,22 \text{ nA} \cdot \text{cm}^{-2}$  galvanostatisch konditioniert bis das gemessene Potential konstant war. **B)** Anschließend wurde eine Lastkurven mit zunehmenden Strom von  $3,24 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  aufgenommen. Die gestrichelten Linien zeigen die Lastkurve nach Abzug der materialspezifischen Doppelschicht-Kapazität des Elektrodenmaterials. Die limitierende Stromdichte wurde bei  $0,753 \text{ V vs. NHE}$  abgelesen. Es wurde je ein Duplikat aufgenommen. **C)** Fluoreszenz-Bild mit SYTO 45 angefärbte *D. propionicus* Zellen auf der Anode.

---

Gleichzeitig wurde auch die 16S rDNA mit den universellen Bacteria-Primern amplifiziert und die Sequenz ergab, dass es eine Reinkultur von *D. propionicus* war.

In der zweiten Phase der mikrobiellen Brennstoffzellenmessung konnte die Stromdichte nicht bei 41 mV vs. NHE abgelesen werden, da das Potential nicht so niedrig war. Daher wurde die Stromdichte nach Bücking *et al.* (Bücking *et al.*, 2010) bei 753 mV vs. NHE abgelesen. Nach Abzug der materialspezifischen Doppelschicht-Kapazität betrug die Stromdichte  $63,4 \pm 8,9 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD) (Abb. 28 B).

Nach Beendigung der mikrobiellen Brennstoffzellenläufe wurden die Anoden fixiert und mit SYTO 45 die DNA unspezifisch angefärbt. Es konnte dabei Bakterienzellen auf der Anode gefärbt werden, die aber nicht sehr dicht beieinander liegen (Abb. 28 C).

#### 4 Vergleich der vier exoelektrogenen Mikroorganismen

Zum Abschluss des zweiten Teils dieser Arbeit wurden die Werte der vier Organismen mit dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 als Elektrodenmaterial vergleichend gegenüber gestellt. Da das Potential in der Konditionierungsphase von *D. propionicus* nicht so tief sank wie bei den anderen drei Organismen, wurde die Stromdichte nicht bei 41 mV vs. NHE sondern bei 753 mV vs. NHE abgelesen. In Tabelle 60 sind die Werte für die Konditionierungszeit und die des erreichten Potentiale sowie die daraus folgenden Stromdichten für alle vier Stämme erfasst.

Im direkten Vergleich mit dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 als Elektrodenmaterial ist zu sehen, dass *G. sulfurreducens* mit der kürzesten Konditionierungszeit die höchste Stromdichte erreicht. *S. oneidensis* erreicht nach 10facher Zeit zwar das gleiche tiefste Potential, aber die Stromdichte ist nur 57% von der von *G. sulfurreducens* (Tab. 60). *G. metallireducens* braucht im Durchschnitt genauso lange wie *S. oneidensis*, durch die hohe Variabilität der Konditionierungszeit ist dies aber nicht zuverlässig. Das niedrigste Potential von *G. metallireducens* ist leicht höher als von den beiden anderen Organismen, die Stromdichte hingegen ist nur noch 37% von der von *G. sulfurreducens*. Somit gibt es einen weiteren entscheidenden Unterschied zwischen den beiden *Geobacter* Stämmen (Tab. 60).

*D. propionicus* hingegen erreicht eine leicht niedrigere Stromdichte wie *G. metallireducens* und das nach einer 5,4fach so schnellen Konditionierungszeit und einem wesentlich höherem Startpotential (Tab. 60).

**Tab. 60: Vergleich der Daten des Charakterisierungsschemas der vier exoelektrogenen Mikroorganismen.** Bei *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens* und *G. metallireducens* sind die Werte die Mittelwerte von sechs unabhängigen Brennstoffzellen und der Fehler zeigt die Standardabweichung. Bei *D. propionicus* sind es Duplikate. Die Stromdichte ist Kapazitätskorrigiert.

Stamm	Konditionierungszeit [h]	niedrigstes Potential vs. NHE [mV]	Stromdichte bei 753 mV vs. NHE [ $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
<i>S. oneidensis</i> MR-1	168 ± 45	-234 ± 17	112,2 ± 11,0
<i>G. sulfurreducens</i> PCA	17 ± 3	-238 ± 16	196,8 ± 23,8
<i>G. metallireducens</i> GS-15	162 ± 63	-171 ± 13	72,8 ± 12,1
<i>D. propionicus</i> Lindhorst (1pr3)	30 ± 5	+358 ± 8	63,4 ± 8,9

### Teil III: Anwendung der mikrobiellen Brennstoffzellen

In den ersten beiden Teilen dieser Arbeit wurden die Elektrodenmaterialien, auf die Fähigkeit eine stabile Mikroorganismen-Anoden-Interaktion zu unterstützen, getestet. Gleichzeitig wurden dabei die Mikroorganismen auf ihre Leistungsfähigkeit in den 3-Kammer-Brennstoffzell-Aufbauten verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass *G. metallireducens* Probleme bei der Konditionierung in den Brennstoffzellen hatte. Als diese Probleme aber überwunden waren, nahm das Potential bei allen mikrobiellen Brennstoffzellen vergleichbar ab und erreichte gleiche Werte. Daher wurde *G. metallireducens* auch im zweiten Teil dieser Arbeit mitverwendet. Bei *D. propionicus* war dies nicht der Fall, da der Stamm in der Konditionierungsphase keine tiefen Potentiale erreichte. Aus diesem Grunde wurden im zweiten Teil dieser Arbeit alle Versuche ohne *D. propionicus* durchgeführt und daher konnte das Anaerobenmedium II verwendet werden. Im Vergleich zu Anaerobenmedium I beinhaltet es u. a. weniger Kalziumchlorid und würde daher kein Wachstum von *D. propionicus* zulassen. Durch die Reduktion der Kalziumchlorid-Konzentration konnte der Niederschlag im Medium verhindert werden, was den Einsatz einer Peristaltikpumpe möglich machte.

---

Außerdem wurden in die drei verwendeten Organismen so genannte Barcodes ins Genom integriert. Diese Barcode-Stämme zeigten kein anderes Verhalten als die Wildtypstämme und wurden *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode* und *G. metallireducens barcode* genannt. Dies ermöglichte zum einen eine leichtere Bestimmung der Zellzahl mittels qPCR, da eine multiplex qPCR etabliert werden konnte. Obwohl bei *G. metallireducens barcode* das ganze Plasmid ins Genom integriert wurde und dadurch der Rückwärtsprimer für die qPCR zweimal im Genom binden konnte, wurde im qPCR-Assay eine tolerable Effizienz von 99,7% mit einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,989 gemessen.

Als Kontrolle, ob DNA aus einer homogenen Lösung isoliert wurde, wurde auch ein *E. coli* Stamm mit einer synthetischen Sequenz ausgestattet (*E. coli barcode*). Beim Etablieren der multiplex qPCR entstanden Primer-Dimere, die auf die Rückwärtsprimer von *G. sulfurreducens barcode* und *E. coli barcode* zurückgeführt werden konnten. Daher war es nicht möglich eine multiplex qPCR für alle vier Organismen zu etablieren. Da *E. coli barcode* nur als Isolierungskontrolle vorgesehen war, wurde die multiplex qPCR für die drei exoelektrogenen Organismen *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode* und *G. metallireducens barcode* verwendet und die Zellzahl von *E. coli barcode* wurde in einer Einzelreaktion nachgewiesen.

Die Barcode-Stämme ermöglichten es zum anderen auch, das Überleben der exoelektrogenen Mikroorganismen auf einer Anode in Abwasser zu verfolgen und dabei von in der Umweltprobe natürlich vorkommenden Wildtypstämmen zu unterscheiden.

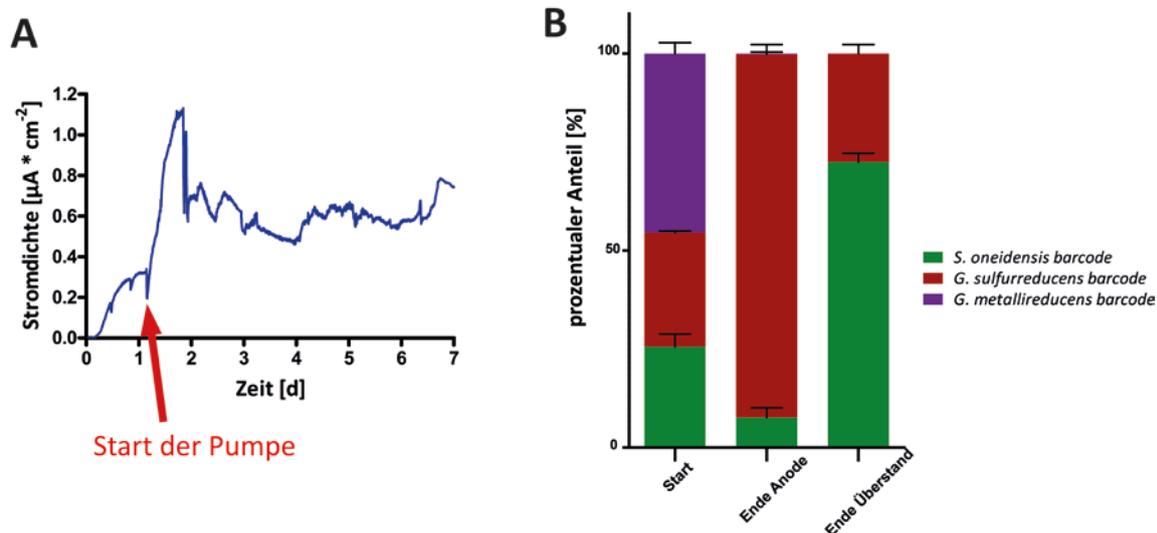
Als Elektrodenmaterial wurde das Graphitvlies gewählt, da es im zweiten Teil dieser Arbeit einen synergistischen Effekt in mikrobiellen Brennstoffzellen mit zwei Stämmen gleichzeitig zeigte.

## **1 Durchflusssystem**

Der Einsatz von mikrobiellen Brennstoffzellen im Batch-Modus ist limitierend, denn wenn der Elektronendonator verbraucht ist, sind die Brennstoffzellenläufe entweder abgelaufen und müssen neu gestartet werden oder es muss manuell neuer Elektronendonator dazugegeben werden. Die Anwendung mikrobieller Brennstoffzellen basiert auf einem kontinuierlichen Betrieb. Daher wurde als erstes getestet, in wie weit der Biofilm auf der Anode in einem Durchflusssystem stabil war. Außerdem war von

Interesse, ob sich einer der Organismen gegen die anderen durchsetzt oder ob alle drei im gleichen Verhältnis auf der Anode wie auch im Überstand vorzufinden waren. Dazu wurde das Anodenmedium II mit 12,5 mM Lactat und 5 mM Propionat verwendet.

Die Bakterien wurden anaerob im Anaerobenmedium II mit entsprechenden Elektronendonoren und -akzeptoren kultiviert und mit gleicher optischer Dichte in die Brennstoffzellen gegeben. Es wurde ein konstantes Potential von 241 mV vs. NHE angelegt und der Strom über die Zeit gemessen. Während der ersten 24 h nahm die Stromdichte stetig zu. Danach flachte die Steigung ab und als die Stromdichte wieder abnahm, wurde eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Das Anodenmedium II wurde mit einer Flussrate von  $137 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  durchgepumpt. Daraufhin stieg die Stromdichte auf Werte über  $1 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  an. Nach 48 h pendelte sich die Stromstärke ein und blieb die restlichen fünf Tage, mit Ausnahme von kleinen Schwankungen, konstant bei  $0,729 \pm 0,022 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (SD) (Abb. 29 A).



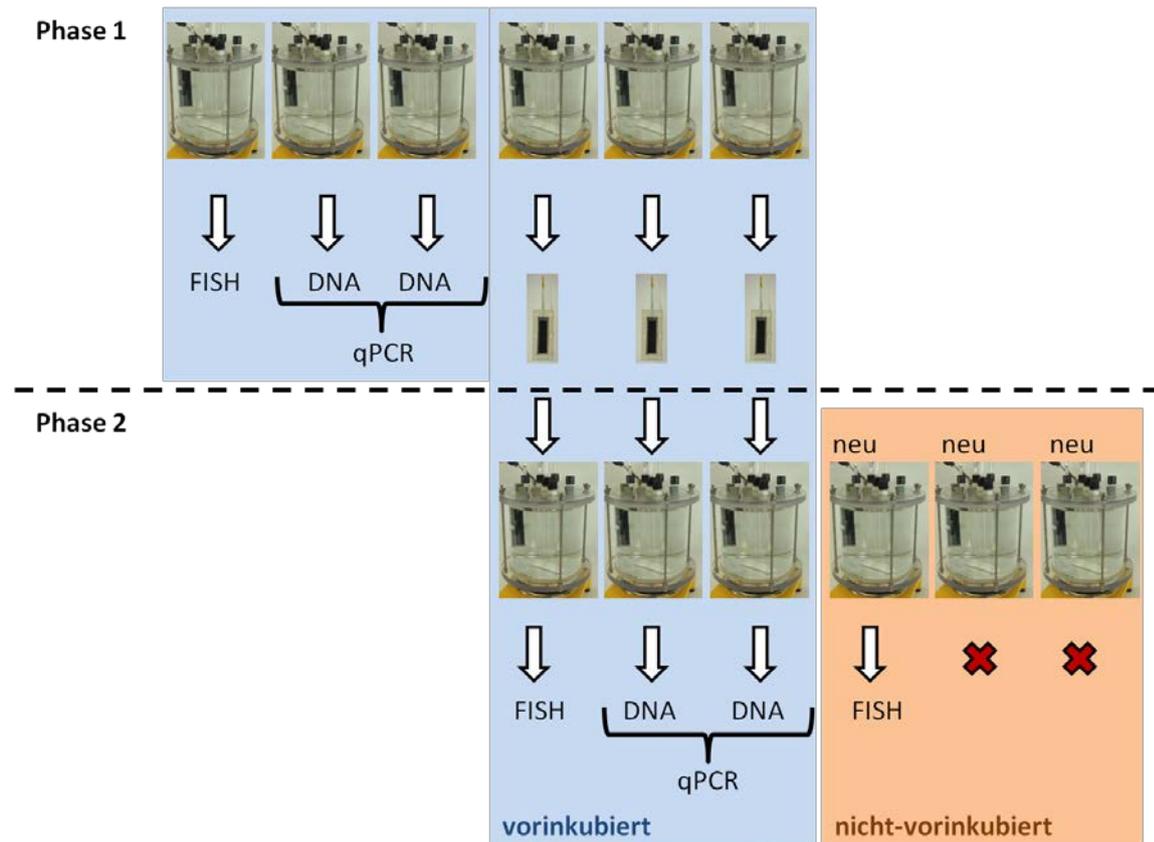
**Abb. 29:** Brennstoffzellen mit *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode* und *G. metallireducens barcode* mit einer Flussrate von  $137 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ . Als Elektrodenmaterial wurde Graphitvlies gewählt und ein Potential von 241 mV vs. NHE angelegt. Alle Versuche wurden im Triplikat durchgeführt und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. **A**) Die Stromdichte wurde über die Zeit gemessen. **B**) Die Zellzahl wurde mittels qPCR von allen drei Organismen zum Start der Brennstoffzelle und nach 7 Tagen bestimmt. In grün *S. oneidensis barcode*, in rot *G. sulfurreducens barcode* und in lila ist *G. metallireducens barcode* dargestellt. Im Überstand lag die Zellzahl von *G. metallireducens barcode* unter dem LOD-Wert.

---

Nach sieben Tagen Gesamtlaufzeit wurden die mikrobiellen Brennstoffzellen abgebaut und die Zellzahl bestimmt. Während die mikrobiellen Brennstoffzellen mit einem minimalen Überschuss an *G. metallireducens barcode* Zellen gestartet wurden [ $45,1 \pm 2,7\%$  (SD)], konnten am Ende keine Zellen mehr im Überstand nachgewiesen werden [ $1,8 * 10^5 \geq \text{LOD} \geq 1,8 * 10^4$  Zellen pro Brennstoffzelle] und auf der Anode befanden sich auch fast keine mehr [ $0,3 \pm 0,3\%$  (SD)]. *S. oneidensis barcode* und *G. sulfurreducens barcode* wurden in ähnlichen Zellzahlen zugegeben [ $26,1 \pm 3,2\%$  bzw.  $28,8 \pm 0,4\%$  (SD)]. Während am Ende *S. oneidensis barcode* die Mehrheit der planktonischen Zellen mit  $72,4 \pm 2,2\%$  (SD) stellte und nur mit  $7,6 \pm 2,6\%$  (SD) auf der Anode vertreten war, stellte *G. sulfurreducens barcode* die Mehrheit auf der Anode [ $92,1 \pm 2,5\%$  (SD)] und war auch im Überstand zu finden [ $27,6 \pm 2,2\%$  (SD)]. Die Gesamtzellzahl war mit  $3,8 * 10^{11}$  Zellen auf der Anode und damit  $1,69 * 10^{11}$  Zellen \*  $\text{cm}^{-2}$  hoch (Abb. 29 B). Dies entspricht im Vergleich zu der sessilen Zellzahl der vorher beschriebenen mikrobiellen Brennstoffzellen mit einer *S. oneidensis* / *G. sulfurreducens* Mischung normalisiert auf die Anodenfläche eine Steigerung um das 497fache.

## 2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit Abwasser

Im vorherigen Versuch konnte schon eine Steigerung der sessilen Zellzahl beobachtet werden. Um die Stabilität und Widerstandsfähigkeit des Biofilms auf der Anode unter geringeren Scherkräften zu testen, wurden die 2-Kammer-Brennstoffzellen verwendet und kein Durchflusssystem angeschlossen. Somit sollte ein Ablösen der Zellen von der Anode auf Grund von einströmendem Medium verhindert werden. Dabei wurde in der ersten Phase unter definierten Bedingungen ein Biofilm auf der Anode gezüchtet. In der zweiten Phase wurde die Anode direkt in einen neuen Topf mit Abwasser überführt. Gleichzeitig wurden neue mikrobielle Brennstoffzellen ohne vorinkubierte Anoden im Abwasser gestartet (Abb. 30)



**Abb. 30: Arbeitsschema der mikrobiellen Brennstoffzellen mit Abwasser.** Nach sechs Tagen Vorinkubation in CO<sub>2</sub>-gepuffertem Medium (Phase 1) wurde eine mikrobielle Brennstoffzelle für die FISH-Färbung verwendet, von zwei mikrobiellen Brennstoffzellen wurden DNA für die Zellzahlbestimmung (qPCR) isoliert und von drei mikrobiellen Brennstoffzellen wurden die Anoden in neue mikrobiellen Brennstoffzellen überführt. Ab da erfolgte die Inkubation in synthetischem Abwasser mit 1% Klärschlamm (Phase 2). Gleichzeitig wurden drei neue mikrobielle Brennstoffzellen ohne vorinkubierte Anoden gestartet. Nach 14 Tagen wurde erneut je eine mikrobielle Brennstoffzelle für die FISH-Färbung verwendet und von den mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierter Anode auch von zwei DNA zur Zellzahlbestimmung (qPCR) isoliert.

### 2.1 Etablierung eines Biofilms auf der Anode

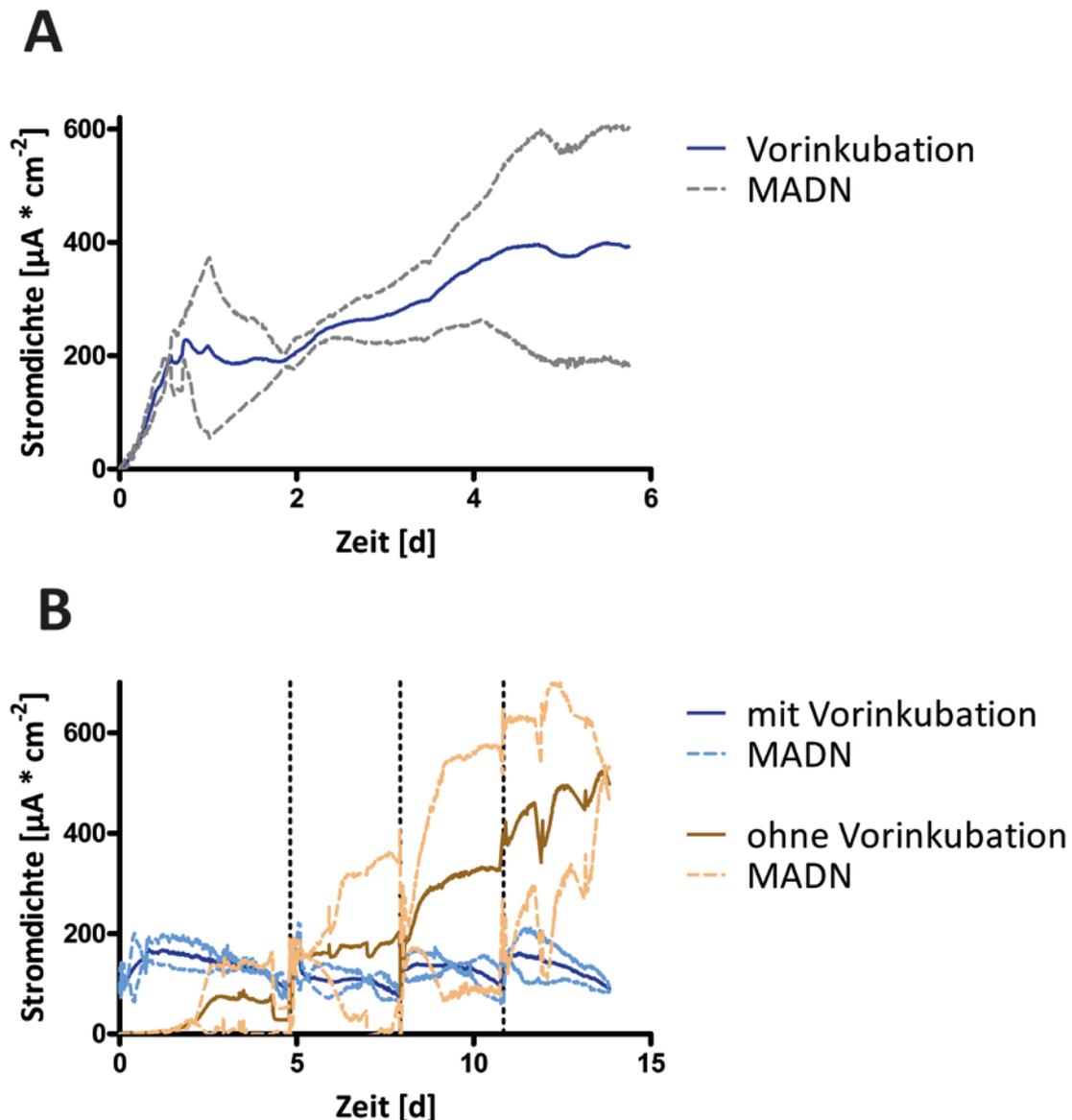
In der ersten Phase wurden *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode* und *G. metallireducens barcode* im Anodenmedium II bei einem Potential von 241 mV vs. NHE inkubiert. Dabei wurde die Stromstärke über die Zeit gemessen. Da es sich um ein biologisches System mit vielen Faktoren, die Einflüsse haben können, handelt, wurde anstatt des Mittelwerts und der Standardabweichung eine robustere Statistik gewählt, die Ausreißer weniger gewichtet. In Abbildung 31 A ist daher der Median der Stromdichte und in gestrichelten Linien der dazugehörige MADN (engl. *normalized median of absolute deviation*) aufgetragen (Babanova *et al.*, 2014). Nach sechs Tagen

---

wurden die mikrobiellen Brennstoffzellen gestoppt und alle Brennstoffzellen produzierten stabile Stromdichten. Der Median der Stromdichte lag bei  $392,39 \pm 209,73 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (MADN) und es wurde eine Coulomb Effizienz von  $19,0 \pm 5,1\%$  (SD) erreicht (Abb. 31 A). Die Leitfähigkeit des Mediums betrug  $8,2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## 2.2 Vergleich der Stromproduktion mit und ohne vorinkubierten Anoden

Drei der Anoden aus diesen Läufen wurden unter der Sterilbank in je einen neuen Topf mit anoxischem synthetischem Abwasser und 1% Klärschlamm überführt und bei gleichem Potential die Stromstärke gemessen (mit Vorinkubation). Die Leitfähigkeit des synthetischen Abwassers betrug nur noch  $0,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Gleichzeitig wurden auch drei weitere mikrobielle Brennstoffzellen gestartet, bei denen eine neue Anode in synthetischem Abwasser mit 1% Klärschlamm installiert wurde (ohne Vorinkubation). Bei allen sechs mikrobiellen Brennstoffzellen (mit und ohne vorinkubierten Anoden) wurde für weitere 14 Tage die Stromstärke über die Zeit gemessen. Während der ersten fünf Tage zeigten die mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden eine höhere Stromdichte als die mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden. Dies änderte sich, als nach 4,8 Tagen konzentriertes synthetisches Abwasser zugegeben wurde. Danach wurde erneut nach 7,9 und 10,8 Tagen die Kohlenstoff-Quelle nachgelegt. Dies hatte jeweils einen sprunghaften Anstieg der Stromstärke bei allen mikrobiellen Brennstoffzellen zur Folge. Während die drei mikrobielle Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden über die 14 Tage einen stabilen Verlauf der Stromdichte zeigten, ließ sich bei den mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden erst nach zwei Tagen Strom messen und es gab große Abweichungen untereinander. Am Ende betrug die Stromdichte bei mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden  $89,8 \pm 5,8 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (MADN). Bei den mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden war die die Stromdichte 5,5fach höher [ $497,9 \pm 34,6 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  (MADN)] (Abb. 31 B).



**Abb. 31: Stromdichte.** Die vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen die Zugabe von 20 ml 50fach konzentriertem synthetischem Abwasser. Und die hellblau und braun gestrichelten Linien zeigen den MADN (engl. *normalized median of absolute deviation*) der jeweiligen Graphen. **A)** Vorinkubation der drei exoelektrogenen Organismen mit Graphitvlies als Anodenmaterial im  $\text{CO}_2$ -gepufferten Anodenmedium II. Gezeigt ist der Median der Stromdichte von sechs mikrobiellen Brennstoffzellen in blau. **B)** Mikrobielle Brennstoffzellen in synthetischem Abwasser nach DIN EN ISO 11733 mit 1% Klärschlamm. In blau ist der Median der Stromdichten der mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden zu sehen. In braun sind die mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden dargestellt. Alle Graphen zeigen den Median von Triplikaten.

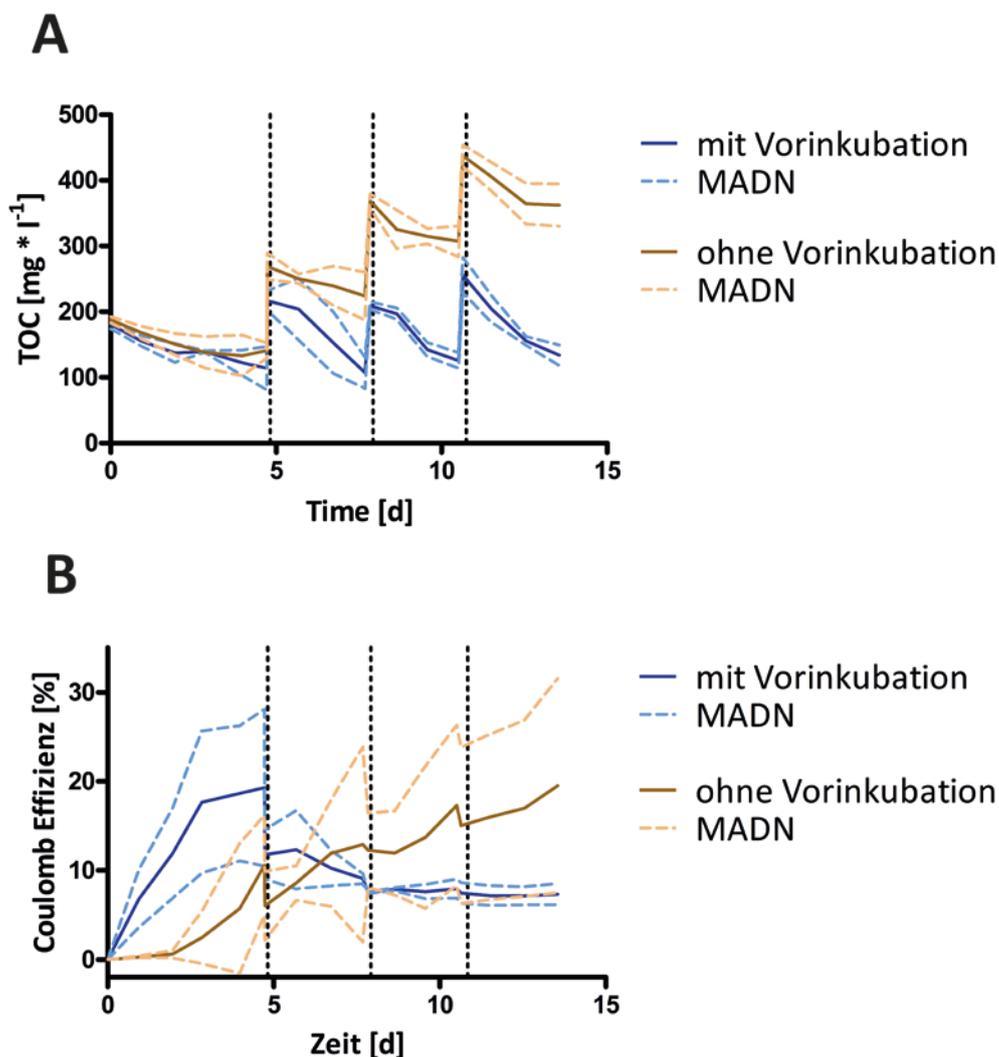
### 2.3 Abnahme des organischen Kohlenstoffgehalts und Coulomb Effizienz

In der ersten Phase produzierten die exoelektrogenen Mikroorganismen unter definierten Bedingungen in den mikrobiellen Brennstoffzellen Strom und mit Lactat und Propionat war für jeden Organismus ein verwendbarer Elektronendonator vorhanden. In der zweiten Phase waren zwar die Bedingungen für die mikrobiellen Brennstoffzellen immer noch definiert, da ein synthetisches Abwasser verwendet wurde. Jedoch wurden als Elektronendonoren Fleischextrakt, Pepton und Glucose angeboten, die nicht ins Elektronendonoren-Spektrum der verwendeten exoelektrogenen Mikroorganismen passen. Daher war es von Interesse, wie sich der TOC-Gehalt der mikrobiellen Brennstoffzellen in der zweiten Phase verhielt.

Dazu wurde täglich eine Probe für die TOC-Bestimmung genommen. In Abbildung 32 A ist der TOC-Gehalt der mikrobiellen Brennstoffzellen über die Zeit aufgetragen. Während der TOC-Gehalt bei den mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden (blau) vor jeder erneuten Zugabe von konzentriertem synthetischem Abwasser (vertikale gestrichelte Linien) auf einen ähnlichen Wert abnimmt, steigt der TOC-Gehalt in den mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden kontinuierlich an. Dadurch findet eine Akkumulation von organischem Kohlenstoff in den Brennstoffzellen statt. Nach 14 Tage waren in den mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden  $526,2 \pm 48,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (MADN) an TOC verbraucht. Dies entspricht einer Gesamtmenge an  $1,05 \pm 0,10 \text{ g}$  (MADN) verbrauchtem TOC. In der gleichen Zeit haben die Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden eine Gesamtmenge von  $0,60 \pm 0,05 \text{ g}$  (MADN) an TOC verbraucht. Dies entspricht 60% der verbrauchten TOC-Menge der mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden.

Anhand der Abnahme des TOC-Gehalts in den mikrobiellen Brennstoffzellen konnte der Verbrauch an Kohlenstoff und somit die theoretisch entstandenen Elektronen berechnet werden. In Kombination mit den tatsächlich übertragenen Elektronen, berechnet aus den Zeit-Strom-Diagrammen, ließ sich die Coulomb Effizienz der einzelnen mikrobiellen Brennstoffzellen berechnen. In Abbildung 32 B ist der Median der Coulomb Effizienz für die mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden in blau dargestellt und für die mit nicht-vorinkubierten Anoden in braun. In gestrichelten Linien sind die Abweichungen bei den Triplikaten zu sehen. Dabei fällt auf, dass bis zur ersten Zugabe von synthetischem Abwasser die mikrobiellen Brennstoffzellen mit den vorinkubierten

Anoden eine höhere Coulomb Effizienz haben als die mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden. Dies ändert sich vor der zweiten Zugabe und blieb dann bis zum Ende so. Gleichzeitig ist aber die Abweichung der mikrobiellen Brennstoffzellen ohne vorinkubierten Anoden wesentlich größer. Nach 14 Tagen beträgt die Coulomb Effizienz von den mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden  $7,3 \pm 1,2\%$  (MADN). Dies ist nur 37% der Coulomb Effizienz der mikrobiellen Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden [ $19,5 \pm 12,0\%$  Coulomb Effizienz (MADN)].



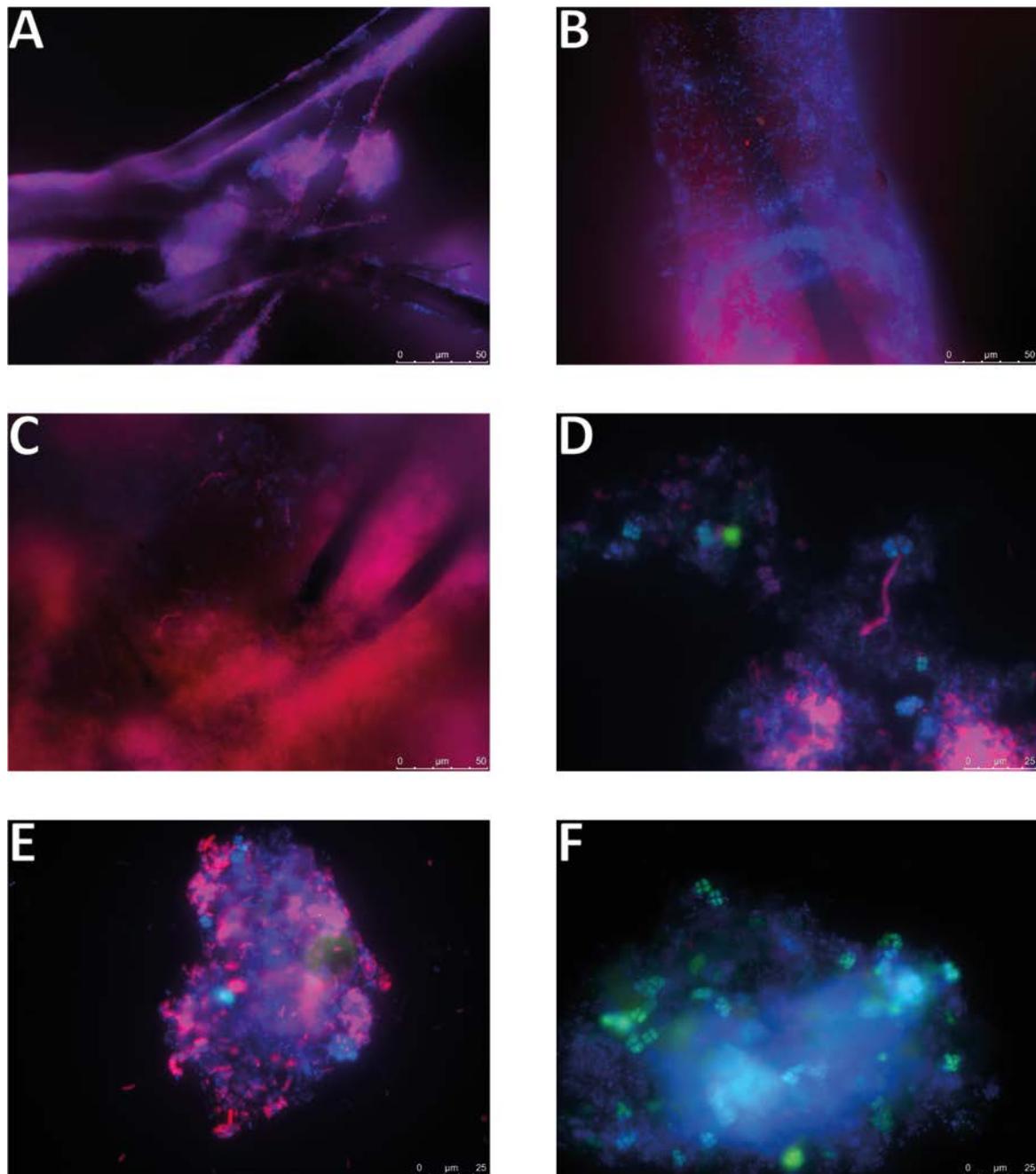
**Abb. 32: TOC-Gehalt und Coulomb Effizienz.** Die vertikal gestrichelten Linien kennzeichnen die Zugabe von 20 ml 50fach konzentriertem synthetischem Abwasser. Und die hellblau und braun gestrichelten Linien zeigen den MADN der jeweiligen Graphen. **A)** In blau ist der Median des Gehalts an TOC der mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden und in braun mit nicht-vorinkubierten Anoden abgebildet. **B)** Coulomb Effizienz der mikrobiellen Brennstoffzellen mit (blau) und ohne (braun) vorinkubierten Anoden. Gezeigt ist der Median von je drei Brennstoffzellen.

---

## 2.4 Mikrobielle Population

Da nicht nur die Eigenschaften des Biofilms von Interesse waren, sondern auch die Zusammensetzung, wurde von jedem Brennstoffzellen-Typus einer für FISH-Analysen verwendet. In Abbildung 33 sind in allen Bildern in blau unspezifisch die DNA angefärbt und in grün die Archaea. Mit rotem Farbstoff wurden unterschiedliche Sonden verwendet. Der Biofilm nach der Vorinkubationszeit von sechs Tagen ist in Abbildung 33 A zu sehen. In rot wurden alle Bacteria angefärbt. Es war meist ein dünner Biofilm zu sehen, der sich um die Fasern des Graphitvlieses ausgebildet hatte. Nach Inkubation von 14 Tagen in synthetischem Abwasser mit 1% Klärschlamm, war der Biofilm im Vergleich dicker geworden. In Abbildung 33 B ist dieser zu sehen, wobei in rot wieder Bacteria und in grün Archaea angefärbt wurde. Es konnte aber kein grünes Signal detektiert werden, auch nicht im Biofilm der Brennstoffzellen ohne vorinkubierter Anode (Abb. 33 C).

Nach Ende der zweiten Phase wurden auch von den Überständen Proben für FISH genommen. Zum einen sollte untersucht werden, wie dort die Verteilung zwischen Bacteria und Archaea war. In dem Überstand der mikrobiellen Brennstoffzelle mit vorinkubierter Anode (Abb. 33 D) und ohne vorinkubierter Anode (Abb. 33 E) wurden jeweils kaum einzelne Zellen gefunden, sondern meist nur Flocken. Diese Flocken bestanden jeweils aus Bacteria und Archaea. In Abb. 33 F wurde des Weiteren eine andere rote Sonde verwendet, die spezifisch für das *Geobacter* Cluster war. Es konnte bei den planktonischen Zellen in mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierter Anode keine *Geobacter* spp. Zellen gefunden werden.



**Abb. 33: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungsbilder von mikrobiellen Brennstoffzellen mit Graphitvlies als Elektrodenmaterial.** In Abbildung **A – C)** sind die sessilen Zellen und **D – F)** die planktonischen Zellen angefärbt. In grün sind immer Archaea (ARCH915) und bei **A - E)** sind die Bakterien (EUB388-I) in rot zu sehen. In **F)** sind die Geobacteraceae (GEO3) in rot abgebildet. **A)** Dreidimensionales FISH-Bild nach der Vorinkubation mit den drei exoelektrogenen Stämmen. **B)** Dreidimensionales FISH-Bild der vorinkubierten Anode nach 14 Tage in synthetischem Abwasser mit 1% Klärschlamm. **C)** Anode nach 14 Tage in synthetischem Abwasser mit 1% Klärschlamm. **D)** Planktonische Archaea und Bacteria mit vorinkubierter Anode und **E)** mit nicht-vorinkubierter Anode. **F)** Planktonische Archaea und Geobacteraceae mit vorinkubierter Anode.

## 2.5 Überleben der drei exoelektrogenen Mikroorganismen

Zwei mikrobielle Brennstoffzellen wurden für die Zellzahlbestimmung der planktonischen und sessilen Zellen verwendet. Zur Kontrolle der Homogenität bei der DNA-Isolierung wurde *E. coli barcode* zugegeben und der  $C_q$ -Wert bestimmt [Phase I:  $21,1 \pm 0,3$  bzw.  $23,0 \pm 0,2$ ; Phase II:  $21,5 \pm 0,4$  bzw.  $20,8 \pm 0,2$  (SD)].

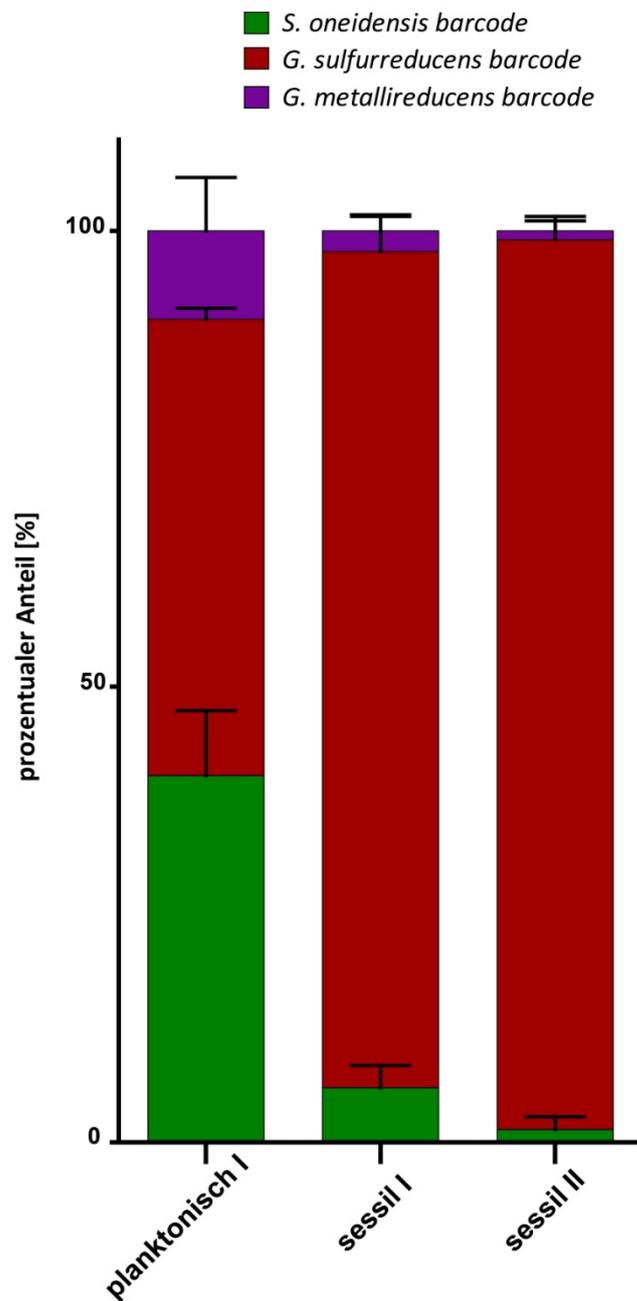
Die so berechneten Zellzahlen der mikrobiellen Brennstoffzellen nach der Vorinkubation und nach 14 Tagen in Abwasser wurden miteinander verglichen. Während in der ersten Phase die mikrobiellen Brennstoffzellen mit einer gleichen Anzahl von jedem Organismus gestartet wurden, waren nach dieser Phase die Verhältnisse verschoben. *G. sulfurreducens barcode* stellte im Überstand als auch auf der Anode die Mehrheit mit  $50,1 \pm 1,3\%$  (SD) bzw.  $90,6 \pm 4,0\%$  (SD). *S. oneidensis barcode* war hingegen nur noch mit  $40,2 \pm 7,1\%$  (SD) im Überstand und mit  $6,7 \pm 2,5\%$  (SD) auf der Anode vorzufinden. Im Vergleich mit *G. sulfurreducens barcode* entspricht dies einem Anteil von  $80,2\%$  bzw.  $7,4\%$  der Zellen. Nur eine geringe Anzahl von *G. metallireducens barcode* Zellen konnte nach der Vorinkubation auf der Anode detektiert werden [ $2,7 \pm 1,6\%$  (SD)]. Der Anteil von *G. metallireducens barcode* unter den planktonischen Zellen war nur unwesentlich mehr [ $9,8 \pm 5,9\%$  (SD)]. Dies entspricht  $3,0\%$  der sessilen *G. sulfurreducens barcode* Zellen auf der Anode und  $19,6\%$  von den planktonischen (Abb. 34).

Nach der Inkubation im synthetischen Abwasser (Phase II) mit 1% Klärschlamm konnten im Überstand keine planktonischen exoelektrogenen Organismen mehr nachgewiesen werden. Bei *S. oneidensis barcode* war das Limit der Detektion pro Brennstoffzelle  $5,3 \cdot 10^7 \geq \text{LOD} \geq 5,3 \cdot 10^6$  Zellen, bei *G. sulfurreducens barcode*  $5,7 \cdot 10^7 \geq \text{LOD} \geq 1,1 \cdot 10^7$  Zellen und bei *G. metallireducens barcode*  $1,4 \cdot 10^7 \geq \text{LOD} \geq 1,4 \cdot 10^6$  Zellen.

Auf der Anode dominierte *G. sulfurreducens barcode* weiterhin mit  $97,9 \pm 2,6\%$  (SD), gefolgt von *S. oneidensis barcode* [ $1,2 \pm 1,5\%$  (SD)] und *G. metallireducens barcode* [ $0,8 \pm 1,1\%$  (SD)] (Abb. 34). Als Negativkontrolle wurde DNA vom Klärschlamminkubulum isoliert und die isolierte DNA als Template in die multiplex qPCR eingesetzt. Es wurde keine Fluoreszenz detektiert.

Im Ganzen betrachtet bedeutet dies eine Zelldichte von  $5,50 \cdot 10^9$  Bakterienzellen  $\cdot \text{cm}^{-2}$  nach sechs Tagen Vorinkubation. Nach weiteren 14 Tagen Inkubation mit synthetischem Abwasser blieben pro  $\text{cm}^2$  nur noch

3,3 \* 10<sup>9</sup> Mikroorganismen übrig. Während von *G. sulfurreducens barcode* 61,5% überlebte, waren es bei *S. oneidensis barcode* 10,5% und bei *G. metallireducens barcode* 17,9%.



**Abb. 34: Zellzahl.** Prozentualer Anteil der drei exoelektrogenen Mikroorganismen am Ende der Vorinkubation (planktonisch I und sessil I) und nach 14 Tagen mit synthetischem Abwasser (sessil II). In rot ist *G. sulfurreducens barcode*, in grün *S. oneidensis barcode* und in lila *G. metallireducens barcode* zu sehen. Alle Werte sind Triplikate aus je zwei mikrobiellen Brennstoffzellen und der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung.

## IV Diskussion

Für einen wirtschaftlich rentablen Einsatz von mikrobiellen Brennstoffzellen zur Reinigung von Abwasser und daraus Stromgewinnung ist es notwendig, neue und kostengünstigere Elektrodenmaterialien zu entwickeln. Um die Leistungsfähigkeit dieser Materialien quantitativ vergleichen zu können, fehlte es bisher jedoch an einem Standardsystem. Durch die parallele Entwicklung der mikrobiellen Brennstoffzelle in mehreren Laboren gleichzeitig gibt es kein einheitliches System, mit dem neue Elektrodenmaterialien oder Bakterienstämme charakterisiert werden. Dabei hat der Aufbau jedoch einen Einfluss auf die Messergebnisse, denn in jedem Aufbau ist der Energieverlust unterschiedlich hoch. Durch die Wahl eines möglichst geringen Abstands der Elektroden zueinander kann der Spannungsabfall zwar minimiert und somit die Energieverluste reduziert werden. Weitere Energieverluste entstehen aber u. a. durch hohe interne Widerstände (Arends & Verstraete, 2012). Da in der Praxis bei keinem Aufbau diese Werte gleich null sind, wird die gemessene Stromdichte verschieden stark beeinflusst. Daher ist ein quantitativer Vergleich der Leistungen von Elektrodenmaterialien oder Bakterien alleine durch Literaturrecherche nicht möglich.

Um aber eine Steigerung der Leistung von mikrobiellen Brennstoffzellen zu erhalten, ist aus biologischer Sicht eine optimale Interaktion zwischen Mikroorganismus und Elektrodenmaterial entscheidend. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein Charakterisierungsschema entwickelt, das den quantitativen Vergleich von Elektrodenmaterialien unter elektrochemischen und biologischen Gesichtspunkten ermöglichte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das entwickelte Schema für die Charakterisierung von einer Co-Kultivierung und von zwei weiteren exoelektrogenen Mikroorganismen verwendet. Damit wurde für den dritten Teil das beste Elektrodenmaterial mit einer optimalen Zusammensetzung an Bakterien für einen stabilen und leistungsfähigen Biofilm auf der Anode gefunden. Dieser Biofilm wurde in mikrobiellen Brennstoffzellen zum einen unter Durchflussbedingungen und zum anderen mit synthetischem Abwasser mit 1% Klärschlamm getestet.

## Teil I: Etablierung eines Charakterisierungsschemas für Elektrodenmaterialien

### 1 Etablierung eines gemeinsamen Mediums

Eine Grundvoraussetzung, um eine quantitative Aussage über zwei Testsysteme treffen zu können, ist, dass die Experimente unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden (Logan, 2009). Um verschiedene Elektrodenmaterialien mit unterschiedlichen Mikroorganismen in einer Brennstoffzelle zu testen, setzt also u. a. voraus, dass die gleichen Brennstoffzellaufbauten bei gleichen Bedingungen wie Temperatur, Begasungsrate und die Anzahl der Mikroorganismen gestartet werden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Medium in den Brennstoffzellen, da es durch Leitfähigkeit für Protonen und Pufferkapazität die Brennstoffzellen beeinflusst. Durch eine höhere Leitfähigkeit des Mediums kommt es zu einem besseren Protonentransport von der Anode zur Kathode und dadurch zu höheren Strömen. Zu hohe Leitfähigkeiten können sich aber auch negativ auf den zumessenden Strom auswirken, da die Bakterien eventuell nicht mit der erhöhten Salzkonzentration zurechtkommen (Call & Logan, 2011a). Gleichzeitig ist eine gute Pufferkapazität nötig, um den Mikroorganismen gleichbleibende Bedingungen im Anodenraum zu gewährleisten. Eine Änderung des pH-Wertes kann zu Inhibition der Anodenatmung der Mikroorganismen führen (Yong *et al.*, 2013). Gleichzeitig ist auch die Pufferkapazität im Kathodenraum wichtig, da durch eine verringerte Pufferkapazität des Kathodenmediums die Stromdichte abnimmt. Dies ist darauf zurück zu führen, dass die Reduktion von Sauerstoff bei neutralem pH langsamer abläuft als unter sauren Bedingungen (Zhao *et al.*, 2006). Durch die Oxidation von Substrat entstehen Protonen an der Anode und durch Reduktion von Sauerstoff an der Kathode werden Hydroxid-Ionen gebildet. Dadurch kommt es zu einem pH-Unterschied zwischen den Kompartimenten und pro pH-Einheit gibt es einen Spannungsverlust der Gesamtzelle von bis zu 59 mV (Arends & Verstraete, 2012).

Daher war es das Ziel des ersten Schrittes, ein gemeinsames Medium zu etablieren, in dem die vier Mikroorganismen *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens*, *G. metallireducens* und *D. propionicus* ein ähnliches Wachstum haben. Damit sollten möglichst ähnliche Versuchsbedingungen etabliert werden. Es wurde ein CO<sub>2</sub>-gepuffertes Medium gewählt, da die beiden *Geobacter* Stämme für ihren Citratzyklus CO<sub>2</sub> benötigen (Mahadevan *et al.*, 2006). Die Konzentrationen der Elektronenakzeptoren und –donoren wurden

entsprechend der Stoffwechseleigenschaften gewählt (Tab. 61). Eisen(III)-Citrat kam als Elektronenakzeptor nicht in Frage, da es beim Abzentrifugieren der Zellkulturen gemeinsam mit den Zellen im Pellet zu finden ist und dadurch in die Brennstoffzellen mit überführt werden würde. In den mikrobiellen Brennstoffzellen sollten jedoch im Anodenraum keine anderen Elektronenakzeptoren als die Anode vorliegen, um ohne Artefakte die Anodenatmung zu messen. So also war der kleinste gemeinsame Nenner als Elektronenakzeptor Fumarat und Nitrat und als Elektronendonoren Lactat und Acetat zu verwenden. Das Medium wurde so konzipiert, dass jeder Stamm die gleiche Menge an Elektronen umsetzen konnte. *S. oneidensis* kann als einziger Stamm beide Elektronenakzeptoren (Fumarat und Nitrat) (Flynn *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2009) verwenden und somit wurde der Elektronendonator (Lactat) (Flynn *et al.*, 2012) für diesen Stamm limitierend gewählt. Für *G. sulfurreducens*, der beide Elektronendonoren (Lactat und Acetat) (Aklujkar *et al.*, 2009) verstoffwechseln kann, ist der verwendbare Elektronenakzeptor (Fumarat) (Yang *et al.*, 2010) limitierend. *G. metallireducens* kann von den gewählten Elektronendonoren nur Acetat oxidieren (Aklujkar *et al.*, 2009) und dabei die Elektronen auf Nitrat übertragen (Murillo *et al.*, 1999). *D. propionicus* hingegen kann durch die Oxidation von Lactat (Laanbroek *et al.*, 1982) Nitrat reduzieren (Widdel & Pfennig, 1982). Für die beiden letzteren Stämme waren Elektronendonator wie auch Elektronenakzeptor im stöchiometrischen Verhältnis zueinander im Medium vorhanden.

**Tab. 61: Stoffwechseleigenschaften der verwendeten Organismen.**

Organismus	Elektronendonor	Elektronenakzeptor
<i>S. oneidensis</i>	$C_3H_6O_3 + H_2O \rightarrow C_2H_4O_2 + CO_2 + 4 H^+ + 4 e^-$	$NO_3^- + 8 e^- \rightarrow NH_3$
		$C_4H_4O_4 + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow C_4H_6O_4$
<i>G. sulfurreducens</i>	$C_2H_4O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 CO_2 + 8 H^+ + 8 e^-$	$C_4H_4O_4 + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow C_4H_6O_4$
	$C_3H_6O_3 + H_2O \rightarrow C_2H_4O_2 + CO_2 + 4 H^+ + 4 e^-$	
<i>G. metallireducens</i>	$C_2H_4O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 CO_2 + 8 H^+ + 8 e^-$	$NO_3^- + 8 e^- \rightarrow NH_3$
<i>D. propionicus</i>	$C_3H_6O_3 + H_2O \rightarrow C_2H_4O_2 + CO_2 + 4 H^+ + 4 e^-$	$NO_3^- + 8 e^- \rightarrow NH_3$

Für die Zusammensetzung der Salze, Spurenelemente und Vitamine, die die einzelnen Mikroorganismen benötigen, wurden die beiden Medien von Coppi *et al.* (Coppi *et al.*, 2001) und Holmes *et al.* (Holmes *et al.*, 2004) als Grundlage für das Anaerobenmedium I verwendet.

Es konnte für alle Organismen gezeigt werden, dass sie in dem Anaerobenmedium I wachsen können. Dies wurde zum einen anhand der optischen Dichte bzw. Zellzahl gezeigt. Um sicher zu stellen, dass bei der Messung der optischen Dichte nicht nur eine abiotische Trübung des Mediums gemessen wurde, wurde zu bestimmten Zeitpunkten der Wachstumskurve Proben für die Proteinbestimmung entnommen. Für alle Organismen verliefen die Zunahmen der optischen Dichte zeitlich synchron mit der Zunahme der Proteinkonzentration. Somit war das Messen der optischen Dichte bei *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens* und *G. metallireducens* für das Zellwachstum eine verlässliche Methode.

Dies war nicht der Fall bei *D. propionicus*, bei dem die Zunahme der Zellen nicht durch die Messung der optischen Dichte bestimmt werden konnte, da es gleich zu Beginn der Wachstumskurve zu einer schwarzen Verfärbung des Mediums kam und dadurch die optische Dichte sprunghaft anstieg, ohne dass die Proteinkonzentration zunahm. *D. propionicus* ist eine Sulfatreduzierer, der Sulfat zu Sulfid reduzieren kann (Laanbroek *et al.*, 1982). Das Sulfid kann dann mit den Metallen der Spurenelemente und dem Eisen des Eisen(III)-Citrats reagieren und bildet einen schwarzen Niederschlag. Da Sulfat und die Metalle aber essentiell für das Wachstum der Organismen sind, konnten sie nicht einfach weggelassen werden. Daher wurde für *D. propionicus* die Zellzahl bestimmt.

Anhand der Zunahme der optischen Dichte bzw. Zellzahl wurde die Generationszeit berechnet. Dabei hatte *G. sulfurreducens* die schnellste Generationszeit, gefolgt von *S. oneidensis* und *G. metallireducens*. Jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Nur zwischen *G. sulfurreducens* - dem schnellsten - und *D. propionicus* - dem langsamsten - gab es einen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem Anaerobenmedium I ein Medium etabliert wurde, das ein Wachstum der vier Organismen unter vergleichbaren Bedingungen ermöglicht. Ohne Elektronenakzeptoren lässt es sich als Anodenmedium I in den Brennstoffzellen verwenden. Davon abgeleitet, mit gleicher Ionenstärke und gleichem pH, wurde das Kathodenmedium entwickelt.

---

## **2 Vergleich der Eisenreduktion und Stoffwechseleigenschaften von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens***

Für die weitere Etablierung des Charakterisierungsschemas für verschiedene Elektrodenmaterialien wurden die beiden Stämme *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* verwendet. Es gibt in der Literatur einige Studien, die diese beiden Organismen in Brennstoffzellen vergleichen (Lovley, 2012; Kipf *et al.*, 2014). Jedoch wurden die Experimente nie unter gleichen Bedingungen durchgeführt, da verschiedene Medien für die zwei Organismen verwendet wurden. Des Weiteren sind es die am Besten untersuchtesten Modellorganismen für extrazellulären Elektronentransport (Richter *et al.*, 2012; Lovley, 2012).

Um im nachfolgenden Kapitel die Übertragung von Elektronen auf verschiedene Elektrodenmaterialien vergleichen zu können, wurde vorab die extrazelluläre Atmung der beiden Organismen verglichen. Dazu wurde das Anaerobenmedium I mit Eisen(III)-Citrat als Elektronenakzeptor verwendet. Eisen(III)-Citrat stellt einen nicht membrangängigen Elektronenakzeptor da, so dass wie bei der Anodenatmung die Elektronen durch das Periplasma und die äußere Membran transportiert werden müssen. Es wurde zum einen die Zunahme der Eisen(II)-Konzentration gemessen und zum anderen die Änderung der Konzentrationen von Lactat und Acetat.

Wie angenommen, hat *S. oneidensis* nur Lactat als Kohlenstoff-Quelle verbraucht (Yoon *et al.*, 2013). Für *S. oneidensis* bedeutet dies, dass die Elektronen aus der Oxidation von Lactat zu Pyruvat und Formiat zu CO<sub>2</sub> herkommen (Scott & Nealson, 1994).

Bei *G. sulfurreducens* nahm sowohl die Lactat- wie auch die Acetat-Konzentration ab. Es ist bekannt, dass *G. sulfurreducens* die Reduktion von Eisen(III)-Citrat sowohl an die Oxidation von Acetat (Caccavo *et al.*, 1994) als auch an die von Lactat (Call & Logan, 2011b) koppeln kann. Ohne markierte Kohlenstoff-Quellen lässt sich weder sagen, welche der beiden Kohlenstoffverbindungen als primäre Quelle verwendet wurde, noch welche für den Aufbau von Biomasse benutzt wurde. Aus diesen Ergebnissen kann jedoch die Schlussfolgerung gezogen werden, dass *G. sulfurreducens* nach Adaptation an Acetat und Lactat als Elektronendonoren im Anaerobenmedium I, auch beide gleichzeitig verbraucht.

Abschließend lässt sich sagen, dass das gemeinsame Anaerobenmedium I eine Reduktion des nicht-membrangängigen Elektronenakzeptors durch *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* mit leicht schnelleren Raten von *S. oneidensis* ermöglicht.

### **3 Charakterisierungsschema für Elektrodenmaterialien mit *S. oneidensis* und**

#### ***G. sulfurreducens***

Ausgehend von der Etablierung des gemeinsamen Anaerobenmediums I wurden 3-Kammer-Brennstoffzellen betrieben. Es wurden die Brennstoffzellen nach Kloke *et al.* (Kloke *et al.*, 2010) verwendet, da diese komplett autoklavierbar waren und die Verwendung von unterschiedlichen Elektrodenmaterialien ermöglichen. Es wurden drei Elektrodenmaterialien untersucht, die als Gemeinsamkeit haben, dass sie aus Kohlenstoff bestehen. Jedoch unterscheiden sie sich in ihren Eigenschaften in Bezug auf die Porosität und spezifische Oberfläche. Diese Materialien wurden von Kipf *et al.* ausführlich beschrieben (Kipf *et al.*, 2013). Unter makroskopischen Gesichtspunkten sind das Graphitvlies ( $60 \text{ m}^2 * \text{g}^{-1}$ ) und das Aktivkohlegewebe C-TEX 13 ( $800 \text{ m}^2 * \text{g}^{-1}$ ) Materialien mit unterschiedlichen dreidimensionalen Eigenschaften, während die Graphitfolie als zweidimensionales Material gesehen werden kann.

Das Charakterisierungsprogramm für die Brennstoffzellen bestand aus zwei Phasen und wurde nach Golitsch *et al.* konfiguriert (Golitsch *et al.*, 2013). Erst wurde eine Konditionierungsphase gestartet und anschließend eine Lastkurve angelegt. Danach wurden die Anoden entweder für die FISH-Analyse oder für die Zellzahlbestimmung verwendet.

#### **3.1 Etablierung einer konstanten Mikroben-Anoden-Interaktion**

Bei der Konditionierungsphase wurde ein niedriger, konstanter Strom angelegt und das Potential über die Zeit gemessen. Zum einen war die Konditionierungszeit bis zum Erreichen eines konstanten Potentials von Interesse. Zum anderen wurde das niedrigste Potential, das gemessen wurde, verglichen. Interessanterweise variierte die Konditionierungszeit zwischen den untersuchten Materialien und den verwendeten Mikroorganismen. Diese Differenz in der Länge der Konditionierungszeit kann die Eigenheit der Mikroorganismen, einen initialen und stabilen Kontakt mit dem Elektrodenmaterial zu etablieren, widerspiegeln. Diese Interaktion ist vermutlich von

---

der Fähigkeit der Zellen, einen Elektronentransport auf die Anodenoberfläche zu katalysieren als auch von der Fähigkeit einen Biofilm auf dem Anodenmaterial zu bilden, abhängig. Biofilmbildung ist für *G. sulfurreducens* wichtig, da *Geobacter* Zellen direkten Kontakt zu unlöslichen Elektronenakzeptoren benötigen (Nevin & Lovley, 2000). Im Vergleich dazu produziert *S. oneidensis* Flavin, das als Mediator für den Elektronentransfer zwischen Zellen und Anodenoberfläche fungieren kann (Marsili *et al.*, 2008).

Die kürzeste Konditionierungszeit zeigte *G. sulfurreducens* mit Graphitfolie als Anodenmaterial, bei *S. oneidensis* war es das Graphitvlies. Allgemein ist aber zu beobachten, dass *G. sulfurreducens* bei jedem Elektrodenmaterial eine schnellere Konditionierungszeit als *S. oneidensis* mit dem gleichen Elektrodenmaterial hatte. Bei dem Wachstumsversuch mit Eisen(III)-Citrat als Elektronenakzeptor hatte *S. oneidensis* eine leicht schnellere Eisenreduktionsrate im Vergleich zu *G. sulfurreducens*. Dieser Vorteil scheint bei der Anodenatmung nun keine Auswirkung zu haben. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Eisen(III)-Citrat im Medium gelöst und ubiquitär vorkommt, während in der Brennstoffzelle die Anode einen stationären Elektronenakzeptor darstellt. Daher hat *G. sulfurreducens* einen Vorteil gegenüber *S. oneidensis* bei der Anodenatmung. Dieser Vorteil beruht drauf, dass *G. sulfurreducens* einen Biofilm auf der Anode bilden kann und somit einen direkten Kontakt zum Elektronenakzeptor aufbaut. *S. oneidensis* hingegen sekretiert Elektronenshuttle, die per Diffusion an den stationären Elektronenakzeptor gelangen müssen. Und dies bedarf mehr Zeit.

Neben der Konditionierungszeit war auch das niedrigste Potential, das erreicht werden konnte, von Interesse. Dies ist von den Redoxpotentialen der Enzyme und Shuttles, die die Elektronen auf die Anode übertragen, abhängig. Beide Organismen exprimieren äußere Membrancytochrome, die Redoxpotentiale in diesem Bereich haben. Bei *G. sulfurreducens* hat OmcS ein Redoxpotential von -212 mV vs. NHE (Qian *et al.*, 2011) und bei *S. oneidensis* hat der Biofilm ein Redoxpotential von bis zu -200 mV vs. NHE (Baron *et al.*, 2009). Das Elektronenshuttle Riboflavin, das von *S. oneidensis* produziert wird, hat ein Redoxpotential vom -208 mV (Walsh *et al.*, 1978).

Bis auf die Graphitfolie, bei der *S. oneidensis* kein Potential unter -200 mV erreichte, waren die erreichten niedrigsten Potentiale ähnlich. Daher scheint die Eigenschaft der Graphitfolie mit dem Mechanismus der Elektronenübertragung von *S. oneidensis* nicht

kompatibel zu sein. Zum einen kann dies an einer schlechteren Anhaftung des Biofilms liegen. Zum anderen kann die Interaktion zwischen Graphitfolie und Flavin nicht ausreichend sein. Okamoto und Kollegen konnten zeigen, dass das Elektronenshuttle FMN an MtrC bindet (Okamoto *et al.*, 2013) und Riboflavin und OmcA (Okamoto *et al.*, 2014b). Sie stellen jeweils den Link zwischen äußerem Membranprotein und Elektronenakzeptor dar. Das so gebundene FMN überträgt schneller Elektronen als nicht-gebundenes FMN, allerdings auch mit einem höheren Redoxpotential (Okamoto *et al.*, 2013). Für MtrF, ein Analogon von MtrC, konnte mit der Kristallstruktur gezeigt werden, dass es zwei Bindestellen für FMN pro Molekül gibt (Clarke *et al.*, 2011).

Es wurde angenommen, dass die Konditionierungszeit auch mit der spezifischen Oberfläche des Materials zusammen hängt. Und zwar umso größer die spezifische Oberfläche ist, desto länger dauert die Konditionierungszeit. Abgesehen von der Graphitfolie, mit der *S. oneidensis* Probleme hatte tiefe Potentiale zu erreichen, ist die Tendenz der Abhängigkeit zwischen spezifischer Oberfläche und Konditionierungszeit bei *S. oneidensis* zu sehen. In früheren Studien zu *S. oneidensis* in Brennstoffzellen konnte gezeigt werden, dass 70% der Elektronen, die auf die Anode übertragen werden, durch Shuttle übertragen werden und somit nur 30% durch direkten Kontakt der Bakterienzelle mit der Anode (Marsili *et al.*, 2008). Insgesamt formt *S. oneidensis* unter anaeroben Bedingungen nur sehr dünne, wenig strukturierte Biofilme. Durch die verminderte Biofilmbildung ist ein geringerer Teil der Anodenoberfläche mit Bakterien besetzt und es kommt nicht zu einer Biofilmbildung, die die Oberfläche des Elektrodenmaterials bedeckt und somit tiefere Regionen des Materials wie ein Isolator abschirmt. Bei dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 kann *S. oneidensis* die hohe spezifische Oberfläche also dadurch ausnutzen, dass es das Elektronenshuttle Flavin produziert und Flavin per Diffusion an die Fasern des Elektrodenmaterials gelangt. Vermutlich reduziert sich wegen dieses Effekts der Shuttle-basierten Elektrodennutzung bei *S. oneidensis* die Konditionierungszeit von C-Tex 13 zu Graphitvlies mit seiner geringeren Oberfläche um den Faktor fünf, während sie zehn Mal langsamer ist als wenn, wie bei *G. sulfurreducens*, nur direkter Elektronentransfer möglich ist.

Bei *G. sulfurreducens* ist die Abhängigkeit zwischen Konditionierungszeit und spezifischer Oberfläche auch zu beobachten, allerdings nicht so ausgeprägt, wie es die Unterschiede in der spezifischen Oberfläche vermuten lassen würden. *G. sulfurreducens* braucht einen

---

direkten Kontakt zur Anode zur Elektronenübertragung und bildet dadurch einen Biofilm auf der Oberfläche. Dieser Biofilm schirmt dann entweder die tieferen Fasern der Materialien vor weiteren Bakterienzellen ab, oder Bakterienzellen, die in tieferen Schichten einen Biofilm bilden, sind durch die Biofilmbildung in höheren Schichten von dem Medium und dadurch auch der Versorgung mit Elektronendonator blockiert (Renslow *et al.*, 2013b). Gleichzeitig kann es auch zu einem lokalen Anstieg des pH-Wertes in den tieferen Schichten kommen, da die produzierten Protonen durch den Biofilm diffundieren müssen (Babauta *et al.*, 2012).

### **3.2 Unterstützung des angelegten Stroms durch die Mikroben-Anoden-Interaktion**

Nachdem sich in allen Brennstoffzellen mit verschiedenen Elektrodenmaterialien ein konstantes Potential eingestellt hatte, wurde eine Lastkurve angelegt. Dabei war die Hauptfrage, wie die bereits stabile Mikroben-Anoden-Interaktion den angelegten Strom zu unterstützen vermochte. Dabei war aber nur die Rate der Elektronenübertragung auf die verschiedenen Elektrodenmaterialien von Interesse und nicht die Fähigkeit der Elektrodenmaterialien Elektronen zu speichern und in der Lastkurve dann abzugeben. Aus diesem Grunde wurde die materialspezifische Doppelschicht-Kapazität von jedem Material unter abiotischen Bedingungen bestimmt und anschließend von den biotischen Lastkurven abgezogen. Dabei zeigte sich, dass die Graphitfolie und das Graphitvlies keine nennenswerten materialspezifischen Doppelschicht-Kapazitäten besitzen. Beim Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 konnte hingegen eine hohe materialspezifische Doppelschicht-Kapazität gemessen werden. Dies würde den Einsatz dieses Elektrodenmaterials in Brennstoffzellen, die nicht nur für die Produktion, sondern auch für die Speicherung von Strom verwendet werden, ermöglichen.

In den Lastkurven zeigte *G. sulfurreducens* bei niedrigen Stromdichten eine langsamere Elektrodenpolarisation im Vergleich zu *S. oneidensis*. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied ist, dass *S. oneidensis* Zellen hauptsächlich durch Elektronen-shuttles die Elektronen auf die Anode übertragen. Aus diesem Grund ist der Weg vom Organismus zur Anode für die Elektronen länger, was zu einem höheren Potentialverlust führt. Im Vergleich dazu überträgt *G. sulfurreducens* nur Elektronen über den direkten Kontakt auf die Anode. Dies ist effizienter und resultiert daher in einer langsameren Polarisation.

Wie schon bei der Konditionierungszeit zeigte sich auch bei der Lastkurve ein Zusammenhang zwischen spezifischer Oberfläche und Stromdichte. Um die Stromdichte der Lastkurven miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte der materialspezifischen Doppelschicht-Kapazität korrigierten Lastkurven bei 41 mV vs. NHE abgelesen. Unabhängig vom verwendeten Organismus gab es eine Zunahme der Leistung von Graphitfolie über Graphitvlies hin zu dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13. Es scheint so, als ob die verfügbare Oberfläche des Elektrodenmaterials zu einem bestimmten Grad die Anzahl der Elektronentransferprozesse pro Zeit beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich aus der Konditionierungsphase und der Lastkurve sagen, dass ein Elektrodenmaterial mit hoher spezifischer Oberfläche eine längere Konditionierungszeit hat, aber dafür in der Lastkurve höhere Stromdichten erreicht. Für den Einsatz der Elektrodenmaterialien in anwendungsorientierten Brennstoffzellen stellt sich daher die Frage, was wichtiger ist: Zeit oder Stromproduktion. Sollen die Brennstoffzellen z. B. als Biosensoren verwendet werden (Golitsch *et al.*, 2013), ist die Zeit limitierend, dann bietet sich das Graphitvlies als Elektrodenmaterial an. Wird mehr Wert auf hohe Stromdichten gelegt, ist das Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 die bessere Wahl.

Die Charakterisierung der Elektrodenmaterialien lässt gleichzeitig auch einen elektrochemischen Vergleich der beiden Modellorganismen für extrazelluläre Atmung *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* zu. Dabei fällt auf, dass der Vorteil von *S. oneidensis* durch Shuttle-Produktion eine leicht schnellere Eisenreduktionsrate zu haben, in den Brennstoffzellen bei der Konditionierung keine Rolle mehr spielt. Dort zeigte *G. sulfurreducens* bei jedem Elektrodenmaterial eine schnellere Konditionierung, was an dessen Eigenschaft der guten Biofilmbildung liegen könnte. Bei den anschließenden Lastkurven war die Stromdichte von *G. sulfurreducens* im Vergleich zu *S. oneidensis* 4,1 - 7,3 Mal so hoch. Um eine Limitierung durch den kompletten Verbrauch der Elektronendonoren zu verhindern, wurde nach Beendigung der Brennstoffzellenläufe jeweils die Konzentration an Acetat und Lactat in den Brennstoffzellen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass sie nie eine Limitierung darstellten.

### 3.3 Besiedelung der Anodenoberfläche

Nachdem die elektrochemischen Daten aufgenommen waren, wurden die Brennstoffzellen abgebaut und die Anoden weiter untersucht. Die Fragestellung war, welche Populationsdichte auf der Anode vorlag, ob sich gemessene Unterschiede in der Populationsdichte mit der erreichten Stromproduktion korrelieren ließen. Dazu wurden zwei voneinander unabhängige Methoden verwendet, um Artefakte auszuschließen. Yates *et al.* schlägt vor, dass zu einer Analyse der Population immer mindestens zwei Methoden verwendet werden sollen, wobei nur eine PCR-abhängig sein darf und die andere nicht auf PCR basieren sollte. Dies soll gewährleisten, dass nicht Unterschiede gewertet werden, die lediglich auf Unterschieden bei der Effizienz der DNA Isolation oder PCR basieren (Yates *et al.*, 2012). Daher wurde zum einen als PCR-unabhängige Methode mittels FISH die Besiedelung optisch erfasst und zum anderen als PCR-abhängige Methode qPCR eingesetzt.

Bei der FISH-Färbung werden Organismus-spezifische Oligonukleotide verwendet, die an die 16S rRNA binden und an die kovalent ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist. Bei früheren Studien der Anodenpopulation wurden die Anoden erst in ein Material eingebettet, um dann mit der Cryostat Methode Dünnschnitte anzufertigen, die dann gefärbt wurden (Okabe *et al.*, 1999; Kindaichi *et al.*, 2004; Satoh *et al.*, 2006; Chung & Okabe, 2009). Zum einen ist das Einbetten und Schneiden ein großer zeitlicher Aufwand und zum anderen birgt es das Risiko, dass sich der Biofilm dadurch verändert, abgelöst oder deformiert wird. Um dies zu verhindern, wurde ein neuer Ansatz entwickelt, der direkt die Anode nach der Fixierung zur weiteren FISH-Färbung verwendet. Zum Mikroskopieren wurde die fertige Anode in einer Petrischale fixiert, diese mit Wasser gefüllt und mit einer Dipping-Linse mikroskopiert.

Es konnte gezeigt werden, dass diese direkte und zeitsparende Methode einen Biofilm auf unterschiedlichen Elektrodenmaterialien anfärbte und dass es eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien über das gesamte Elektrodenmaterial gab. Meist wurden Einzelzellen, die direkt an das Anodenmaterial gebunden waren, gefunden. Bei *G. sulfurreducens* konnten teilweise zwei bis drei Zellen aufeinander beobachtet werden, aber auf keinen Fall ein geschlossener, mehrere Zellen dicker Biofilm. Dies könnte an der z. T. nur zwei Tage dauernden Brennstoffzellenläufen liegen. Somit ist die Oberfläche

nicht der limitierende Faktor und es könnten sich noch weit mehr Organismen anlagern. Daher scheint die Populationsdichte auf der Anode die Leistung zu limitieren.

Der Eindruck nach der elektrochemischen Charakterisierung, dass die spezifische Oberfläche auch mit der Besiedelung der Bakterien zusammenhängt, konnte bestätigt werden. Da es jedoch schwierig ist, diesen optischen Eindruck quantitativ auszuwerten, wurde noch eine quantitative Analyse durchgeführt.

### **3.4 Quantitative Analyse der sessilen Zellzahl**

Ren *et al.* bestimmten die Zellzahl von einer gemischten Brennstoffzelle mit *Clostridium cellulolyticum* und *G. sulfurreducens*, in dem die gesamte DNA isoliert wurde und pro Organismus ein Amplicon mit spezifischen Primern per PCR amplifiziert wurde. Diese Fragmente wurden dann wiederum in ein Plasmid kloniert, in einen *E. coli* Stamm transformiert und daraus die Plasmide re-isoliert. Diese Plasmid-Fraktion wurde schlussendlich als Template in einer qPCR eingesetzt (Ren *et al.*, 2008). Da es bei jedem Schritt einen Verlust an Information geben kann, es zeitlich sehr aufwändig und daher nicht für das Vergleichen mehrere Elektrodenmaterialien mit mehreren Organismen geeignet ist, wurde ein neuer Ansatz etabliert. Dazu wurde DNA von den Anoden isoliert und diese DNA direkt als Template in einer qPCR eingesetzt. Von jedem Organismus wurde von einer Reinkultur die Zellzahl in einer Zählkammer bestimmt, eine Verdünnungsreihe mit sechs Schritten erstellt und von jedem Verdünnungsschritt ein Triplikat für die DNA Isolierung verwendet. Dadurch konnte die Zellzahl der unbekannt Probe ermittelt werden. Die qPCR auf DNA-Ebene wird vor allem in der mikrobiologischen Hygiene eingesetzt, um in Umweltproben wie Trinkwasser die Zellzahl von Pathogen zu bestimmen (Shannon *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte die qPCR aber auch für die Bestimmung der Zellzahl in Biofilmen etabliert werden.

Eine Motivationsfrage war, ob die Elektrodenmaterialien unterschiedlich die Fähigkeit der Bakterien Elektronen auf die Anode zu übertragen unterstützen. Anhand des Vergleichs wie viele sessile Zellen welche Stromdichte erreichten, sollte dies erörtert werden. Dazu wurde ein quantitativer Vergleich der sessilen Zellzahl durchgeführt.

Bei der sessilen Zellzahlbestimmung konnte festgestellt werden, dass bei *G. sulfurreducens* die sessile Zellzahl auf dem Aktivkohle-Gewebe C-TEX 13 am größten war, gefolgt vom Graphitvlies und der Graphitfolie. Dies bedeutet, dass es zwischen der

---

sessilen Zellzahl und der spezifischen Oberfläche des Elektrodenmaterials eine Abhängigkeit gibt. Auch zwischen Stromdichte bei 41 mV vs. NHE und spezifischer Oberfläche konnte dies festgestellt werden. Daher gibt es bei *G. sulfurreducens* auch eine Abhängigkeit der Stromdichte mit der sessilen Zellzahl, jedoch verläuft diese nicht linear. Im Vergleich zum Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 konnten auf dem Graphitvlies nur 39% und auf der Graphitfolie nur 11% der sessilen Zellen gemessen werden. Die gemessenen Stromdichten waren aber 82% bzw. 10% im Vergleich zum Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass entweder der Transfer von Elektronen von den Bakterienzellen auf das Elektrodenmaterial Graphitvlies besser funktioniert als im Vergleich zu den beiden anderen Materialien oder es einen Anteil an inaktiven Bakterienzellen auf dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 bzw. der Graphitfolie gibt.

Bei *S. oneidensis* gibt es eine Zunahme der sessilen Zellzahl vom Graphitvlies zum Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 entsprechend der Steigerung der spezifischen Oberfläche. Wie schon bei der Konditionierungszeit ist diese Abhängigkeit bei der Graphitfolie nicht zu sehen. Bei der Graphitfolie sind im Vergleich zur spezifischen Oberfläche und der Stromdichte sehr viel mehr sessile Zellen als erwartet wurde.

Der direkte Vergleich der sessilen Zellzahl zwischen *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis* bestätigt den optischen Eindruck der FISH-Analyse, dass immer mehr *Geobacter* als *Shewanella* Zellen an der Anode anheften. Gleichzeitig fällt auf, dass die prozentuale Standardabweichung bei *S. oneidensis* höher ist. Dies spiegelt die Wichtigkeit des Elektronentransports durch Flavin wieder, bei dem die Bakterien es nicht nötig haben, auf der Anode anzuhafte, um respiratorische Elektronen abgeben zu können. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Lokalisierung von *S. oneidensis* Zellen im Vergleich mit *G. sulfurreducens* flexibler ist. Ein weiterer Ansatz für die Optimierung von Brennstoffzellen wäre daher, *S. oneidensis* besser an die Anode zu binden. Lin *et al.* bettete *S. oneidensis* Zellen in ein PMBVF/PVA Hydrogel ein (Lin *et al.*, 2012). Außerdem kann auch die Biofilmbildung von *S. oneidensis* gefördert werden, in dem molekulare Faktoren wie Mxd-Proteine, die für die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen verantwortlich sind, genetisch manipuliert wurden (Müller *et al.*, 2013). Desweiteren könnten Faktoren, die die Bildung von Biofilmen fördern, hochreguliert (Theunissen *et al.*, 2010; De Windt *et al.*, 2006), Inhibitoren jedoch deletiert (Chao *et al.*,

2013) bzw. mutagenisiert werden (Kouzuma *et al.*, 2014). So genetisch veränderte *S. oneidensis* Stämme sollten in hydrodynamischen Brennstoffzellen Vorteile gegenüber dem Wildtyp haben.

#### **4 Fazit Teil I**

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ein Charakterisierungsschema für Elektrodenmaterialien in Brennstoffzellen etabliert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der spezifischen Oberfläche eine längere Konditionierungszeit bedeutet, dass dadurch aber auch höhere Stromdichten und höhere Anzahl an sessilen Zellen zu erwarten sind. Gleichzeitig konnte die Fähigkeit der beiden Modellorganismen, *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* Elektronen auf eine Anode zu übertragen, verglichen werden. Bei diesem Vergleich konnte gezeigt werden, dass *G. sulfurreducens*, der nur direkten Elektronentransfer zu katalysieren vermag, leistungstärker ist als *S. oneidensis*, der sowohl direkt als auch durch Shuttle unterstützt Elektronen transferieren kann und dass die Elektrodenmaterialien unterschiedlich die Fähigkeit der Bakterien Elektronen auf die Anode zu übertragen unterstützen. Für effiziente Brennstoffzellen ist wichtig, dass Elektrodenmaterialien entwickelt werden, die zum einen die Biofilmbildung der Organismen fördern und zum anderen auch den Elektronentransfer erleichtern.

#### **Teil II: Anwendung des Charakterisierungsschemas**

##### **1 Mikrobielle Brennstoffzellen mit einer Co-Kultur von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens***

Bei der Co-Kultivierung von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* in Brennstoffzellen mit Graphitvlies und Aktivkohle-Gewebe C-TEX 13 war es von Interesse zu untersuchen, ob dies eine Leistungssteigerung bringen kann, da die Fähigkeit von *S. oneidensis* Flavin zu produzieren und die Biofilmbildung von *G. sulfurreducens* kombiniert würden. Alternativ könnte auch kein synergistischer Effekt erzielbar sein, wenn der eine Stamm den anderen von der Anodenoberfläche verdrängen sollte. Dazu wurden die erreichten Werte immer mit den Reinkultur-Brennstoffzellen mit den gleichen Elektrodenmaterialien verglichen.

---

Bei der Konditionierungsphase verhielten sich die gemischten Brennstoffzellen mit beiden Elektrodenmaterialien wie die Brennstoffzellen mit nur *G. sulfurreducens*. Bei der Lastkurve gab es auch keinen signifikanten Unterschied in der Stromdichte bei 41 mV vs. NHE. Somit gesehen verhielten sich die gemischten Brennstoffzellen elektrochemisch gesehen wie die Brennstoffzellen mit den Reinkultur *G. sulfurreducens* und es konnte keine Leistungssteigerung durch die Co-Kultivierung gesehen werden.

Daher war die nächste Frage, ob *G. sulfurreducens* *S. oneidensis* komplett verdrängt hatte. In der FISH-Analyse konnten sehr viele *G. sulfurreducens* Zellen auf den Anodenfasern und einige wenige *S. oneidensis* Zellen gefunden werden. Dies konnte mit der quantitativen Analyse der sessilen Zellzahl bestätigt werden. Bei beiden Materialien dominierte *G. sulfurreducens*, *S. oneidensis* konnte aber dennoch nachgewiesen werden. Während es aber bei dem Graphitvlies zu einer Steigerung der sessilen Zellzahl beider Organismen kam, konnte beim Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 nur eine minimale Steigerung der sessilen Zellzahl bei *S. oneidensis* beobachtet werden. Bei *G. sulfurreducens* waren es im Vergleich mit den Reinkultur-Brennstoffzellen sogar nur halb so viele sessile Zellen. Dies bedeutet, dass die Co-Kultivierung auf dem Graphitvlies einen synergistischen Effekt auf die Biofilmbildung hat und dass das Graphitvlies die bessere Wahl ist, wenn ein stabiler Co-Kultur Biofilm auf der Anode erreicht werden soll.

## **2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit *G. metallireducens***

Als weiterer exoelektrogener Organismus wurde *G. metallireducens* GS-15 getestet, der phylogenetisch gesehen nah verwandt zu *G. sulfurreducens* PCA ist. Bereits in der Konditionierungsphase fiel auf, dass er sich anders als *G. sulfurreducens* verhielt. Anstatt ein paar Stunden konnte die Konditionierung bis zu 13 Tage dauern. Dabei brauchte jede mikrobielle Brennstoffzelle unterschiedlich lange, bis das Potential zu sinken begann. Das Gefälle war dann aber wiederum bei allen Brennstoffzellenläufe gleich. Dies lässt vermuten, dass beim Start der Brennstoffzellen bestimmte Faktoren inhibitorisch wirkten und erst wenn diese beseitigt waren, konnten die Bakterien Acetat oxidieren und Elektronen auf die Anode übertragen. Dieser inhibitorische Faktor könnte Sauerstoff sein, da die Bakterien um Kontaminationen zu vermeiden aerob abzentrifugiert, gewaschen und dann die Brennstoffzellen auch aerob angeimpft wurden. Des Weiteren bestehen die Dichtungen der Brennstoffzellen aus Silikon, welches durchlässig für

Sauerstoff ist. Um ein Einströmen von Sauerstoff zu verhindern, wird zwar konstant mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> begast, es konnte aber gezeigt werden, dass dies nur zu mikroaeroben und nicht zu strikt anaeroben Bedingungen führt (persönliche Kommunikation mit F. Golitsch und A. Förster). *G. metallireducens* ist ein strikter Anaerobier, dessen Wachstum durch Sauerstoff inhibiert wird (Lovley & Phillips, 1988). Im Gegensatz dazu ist *S. oneidensis* ein fakultativ anaerober Organismus (Venkateswaran *et al.*, 1999), der sogar eine höhere Leistung in Brennstoffzellen zeigt, wenn in der Anwachsphase Sauerstoff vorhanden ist (Kipf *et al.*, 2013). Lin *et al.* berichtete für *G. sulfurreducens*, dass dieser unter mikroaeroben Bedingungen mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor wachsen kann (Lin *et al.*, 2004). Daher waren beim Etablieren des Charakterisierungsschemas keine zeitlichen Verzögerungen durch nicht strikte anoxische Bedingungen bemerkt worden.

Waren die Bedingungen aber erreicht, dass *G. metallireducens* Elektronen übertragen konnte, dann wurde jeweils ein gleiches niedriges Potential erreicht. Auch bei der Lastkurve hatte die unterschiedlich lange Konditionierungszeit keinen Einfluss. Bei der FISH-Analyse zeigte sich, dass *G. metallireducens* Zellen auf der Anode mit direktem Kontakt zu finden waren. Dies stimmt mit vorangegangenen Publikationen überein, die zeigen, dass *G. metallireducens* keinen Elektronenshuttle produzieren kann und somit auf direkten Kontakt mit der Anode angewiesen ist (Nevin & Lovley, 2000).

### **3 Mikrobielle Brennstoffzellen mit *D. propionicus***

Als weiterer Testorganismus wurde *D. propionicus* gewählt, da er bisher nur einmal als Reinkultur in Brennstoffzellen getestet wurde (Holmes *et al.*, 2004), aber in Brennstoffzellen mit Abwasser gefunden wurde (Ki *et al.*, 2008). Über den möglichen Elektronentransferweg ist nichts bekannt, es wurden aber *b*- und *c*-Typ Cytochrome sowohl im Periplasma als auch in der äußeren Membran gefunden (Widdel & Pfennig, 1982). Über Redoxpotentiale dieser Proteine ist auch nichts bekannt.

Im Vergleich mit *G. metallireducens* wird *D. propionicus* zwar durch Sauerstoff nicht inhibiert, kann aber den Sauerstoff auch nicht als terminalen Elektronenakzeptor verwenden (Dannenber *et al.*, 1992). Daher sollte es keine Verzögerung der Konditionierungsphase durch nicht strikte anoxische Verhältnisse geben.

---

In der Konditionierungsphase konnte beobachtet werden, dass das Potential stetig abnahm bis Werte von 350 mV vs. NHE erreicht wurden. Danach stieg das Potential aber wieder bis zu 388 mV vs. NHE an. Dabei wurde konstant die Konzentration an Lactat überwacht und es musste zweimal nachgegeben werden. Nach der Konditionierungszeit wurde der Überstand per HPLC analysiert und es konnte dabei eine Abnahme der Lactat-Konzentration und je eine Zunahme der Acetat- und Propionat-Konzentration gemessen werden. Das gleiche wurde bei *D. propionicus* Kulturen in anaeroben Flaschen bemerkt. Dabei war es egal, ob Nitrat, kein Elektronenakzeptor und gar Sauerstoff zugegeben wurde. Bei der Anodenatmung von *D. propionicus* mit Lactat als Elektronendonator sollte wie bei der Reduktion von Sulfat nur Acetat entstehen (Laanbroek *et al.*, 1982). Bei der Fermentation von Lactat hingegen wird Acetat und Propionat produziert (Widdel & Pfennig, 1982). Dies bedeutet, dass *D. propionicus* in den Brennstoffzellen sowohl Anodenatmung wie auch Gärung betreibt. Das gleiche gilt auch für die Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor.

Anschließend wurde eine Lastkurve angelegt, die allerdings bei höheren Potentialen startete als bei den anderen Organismen. Daher war es auch nicht möglich die Stromdichte bei 41 mV vs. NHE abzulesen und es wurde die limitierende Stromdichte nach Bücking *et al.* benutzt (Bücking *et al.*, 2010). Die Anoden wurden nach Beendigung der Brennstoffzellenläufe für die FISH-Analyse verwendet, jedoch wurde die DNA nur unspezifisch mit SYTO 45 angefärbt. Es konnten Bakterienzellen auf den Fasern gefärbt werden. Um dennoch sicher zu gehen, dass *D. propionicus* in der Brennstoffzelle war, wurde eine PCR auf die 16S-Sequenz gemacht und sequenziert. Das Ergebnis zeigte eindeutig, dass nur *D. propionicus* in der Brennstoffzelle vorlag.

#### **4 Vergleich der vier exoelektrogenen Mikroorganismen**

Das Etablieren eines Mediums, in dem alle vier exoelektrogenen Mikroorganismen ähnlich wachsen können, mit der Kombination eines Charakterisierungsschemas für die quantitative Analyse von mikrobiellen Brennstoffzellen, ermöglicht den direkten Vergleich der Fähigkeit der Anodenatmung und der Effektivität der verwendeten Elektronentransferwege der vier Organismen.

Im direkten Vergleich zwischen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* konnte gezeigt werden, dass der Elektronentransfer mittels Shuttle länger dauert und geringere

Stromdichten unterstützt als der direkte Kontakt mit der Anode. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass es aber auch bei Übertragung von Elektronen per direkten Kontakt Unterschiede gibt. Dazu wurden die beiden phylogenetisch nah verwandten *Geobacter* Stämme verglichen. Beide können keine Elektronenshuttle produzieren (Nevin & Lovley, 2000) und sind daher auf direkten Elektronentransfer angewiesen. Sie unterscheiden sich aber nicht nur in ihrem Substrat-Spektrum (Aklujkar *et al.*, 2009), sondern auch in den äußeren c-Typ Cytochromen, die bei der Eisenreduktion involviert sind (Smith *et al.*, 2014). Dabei beweist sich der Mechanismus von *G. sulfurreducens* effektiver als der von *G. metallireducens* in Bezug auf die Stromdichte. Bei *D. propionicus* hingegen ist es vollständig unklar, wie der Elektronentransportweg funktioniert, ob direkt oder Elektronenshuttle vermittelt. Es fällt auf, dass *D. propionicus* der einzige Organismus ist, der auf dem Aktivkohle-Gewebe C-Tex 13 kein vergleichbares tiefes Potential in der Konditionierungsphase erreicht. Er kann daher bei der darauffolgenden Lastkurve nicht unter gleichen Bedingungen verglichen werden, da das Startpotential positiver war.

### 5 Fazit von Teil II

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass *G. sulfurreducens* ein optimaler Kandidat für mikrobielle Brennstoffzellen ist. Da aber das Substrat-Spektrum für *G. sulfurreducens* sehr eng ist (Aklujkar *et al.*, 2009), mag die Verwendung einer gemischten Kultur von Vorteil sein. *G. metallireducens* kann zwar sehr viele verschiedene Elektronendonoren oxidieren (Aklujkar *et al.*, 2009), ist aber strikt anaerob und reagiert sehr sensitiv auf geringste Spuren von Sauerstoff. Daher bietet es sich an, einen weiteren Organismus - *S. oneidensis* - zu verwenden, der nur fakultativ anaerob ist und daher für anoxische Bedingungen sorgen und somit das Wachstum von *G. metallireducens* unterstützen kann.

Der Einsatz von *D. propionicus* hingegen ist nicht sinnvoll, da er Atmung und Gärung gleichzeitig durchführt. Dazu kommt es zu einem Verlust der Elektronen, die bei der Gärung nicht auf die Anode übertragen werden. Gleichzeitig ist der Organismus nicht in der Lage ähnlich tiefe Potentiale an der Anode wie die anderen Organismen zu erreichen.

---

### Teil III: Anwendung der mikrobiellen Brennstoffzellen

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Integration mikrobieller Brennstoffzellen in ein Klärwerk durchgeführt. Durch hohe Konzentration an organischem Kohlenstoff eignet sich Abwasser als Substrat für mikrobielle Brennstoffzellen (Sievers *et al.*, 2010). Durch Oxidation des Kohlenstoffs unter anoxischen Bedingungen anstatt unter oxidischen, sollte es möglich sein, weniger Biomasse im Klärwerk zu produzieren und die Energiekosten zu senken (Oh *et al.*, 2010). Doch bis es möglich ist, eine effiziente mikrobielle Brennstoffzelle wirklich in einem Klärwerk zu installieren, sind erst einige offene Fragen zu beantworten.

Bisher gibt es mehrere Versuche, bei denen im Labormaßstab mikrobielle Brennstoffzellen mit Abwasser betrieben wurden. Dabei kommt es jeweils zu einer Biofilmbildung auf der Anode. Wird die bakterielle Zusammensetzung untersucht, werden zum einen Bakterien gefunden, die bisher unkultiviert sind oder sie sind als nicht exoelektrogen bekannt (Lee *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Ki *et al.*, 2008). Daher ist es unklar, ob sie aktiv bei der Übertragung von Elektronen auf die Anode mithelfen, oder ob sie nur den wertvollen Platz auf der Anode besetzen und nicht an der Stromproduktion beteiligt sind. Um den Platz auf der Anode effektiver zu nutzen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich durch eine Vorinkubation der Anode mit bekannten exoelektrogenen Organismen ein Biofilm auf der Anode bildet, der nur aus aktiv an der Stromproduktion beteiligten Bakterien besteht. Dadurch kommt es zu einer Leistungssteigerung, wenn diese so vorinkubierte Anode in eine Brennstoffzelle mit Abwasser überführt wird.

Als erstes wurde daher getestet, wie sich ein Biofilm in einem Durchflusssystem verhält. Im letzten Teil wurde dann der Biofilm auf der Anode unter realen Bedingungen im Abwasser getestet. Dazu wurde erfolgreich in jeden Organismus ein Barcode integriert, der die quantitative Bestimmung der Zellzahl per multiplex qPCR vereinfacht und die Unterscheidung von im Abwasser vorkommenden Wildtyp Stämmen ermöglicht.

#### 1 Durchflusssystem

Um zu testen, wie sich ein Biofilm bestehend aus *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode* und *G. metallireducens barcode* unter kontinuierlichen Bedingungen verhält, wurde ein Durchflusssystem konstruiert. Um den Bakterien eine

Möglichkeit zu geben einen stabilen Biofilm auf der Anode zu bilden, wurden die Brennstoffzellen im Batch-Modus gestartet. Die Peristaltikpumpe wurde erst gestartet, als die Stromdichte nach einem Tag wieder abnahm. Nachmals einen Tag später war die Stromdichte bereits konstant.

Als nach sieben Tagen die Brennstoffzellen abgebaut wurden, dominierte *G. sulfurreducens barcode* auf der Anode und *S. oneidensis barcode* bei den planktonischen Zellen. Dies entspricht den jeweiligen Eigenschaften des direkten bzw. Elektronenshuttle vermittelten Elektronentransfers der Organismen. *G. metallireducens barcode* konnte nur zu einem sehr geringen Anteil noch auf der Anode detektiert werden, im Überstand war die Zellzahl von *G. metallireducens barcode* unter der Detektionsgrenze. Als Elektronendonator wurden Lactat und Propionat verwendet. Durch die Oxidation von Lactat durch *S. oneidensis barcode* sollte es im Weiteren auch noch Acetat geben, da nur der verkürzte Citratzyklus unter anaeroben Bedingungen benutzt wird (Scott & Nealon, 1994). Jedoch scheint dies zum einen nicht für das Überleben von *G. metallireducens barcode* auszureichen (eventuell wegen einer höheren Substrataffinität von *G. sulfurreducens barcode*) und zum anderen scheint Propionat kein ausreichender Elektronendonator für *G. metallireducens barcode* zu sein. Ein weiterer Grund könnten Anheftungsprobleme von *G. metallireducens barcode* unter Durchflussbedingungen sein.

## **2 Mikrobielle Brennstoffzellen mit Abwasser**

Beim letzten Versuch wurden neue Brennstoffzellen mit einem größeren Anodenraum verwendet und es wurde auf den Anschluss einer Peristaltikpumpe verzichtet. Gleichzeitig erlaubte dieses System das Überführen von vorinkubierten Anoden in Brennstoffzellen mit Abwasser.

### **2.1 Vorinkubation der Anode**

Die Anzucht des Biofilms auf der Anode erfolgte über sechs Tage in einem CO<sub>2</sub>-gepufferten Medium. Mit Lactat und Propionat als Elektronendonator waren dies definierte Bedingungen, bei denen die drei Organismen, wie bereits gezeigt, wachsen können. Anschließend waren jeweils Biofilme mit einer konstanten Stromdichte auf den Anoden. Die FISH-Färbungen zeigten, dass ein geschlossener Biofilm vorlag und dass

---

nicht mehr nur einzelne Zellen auf den Fasern zu sehen waren. Dies liegt vermutlich vor allem an der längeren Laufzeit und den neuen Messbedingungen.

Bei der Zusammensetzung dominierte hingegen *G. sulfurreducens barcode* den sessilen wie auch den planktonischen Teil, wobei es bei den sessilen Zellen eindeutiger war. Wie schon beim Durchflusssystem war *S. oneidensis barcode* im planktonischen Teil auch wieder stärker vertreten als bei den sessilen Zellen. Im Vergleich zum Durchflusssystem konnte *G. metallireducens barcode* in beiden Fraktionen noch nachgewiesen werden. In der planktonischen dieses Mal vermutlich, da es ein Batch-System war. In der sessilen Fraktion stellte dies eine Steigerung des prozentualen Anteils um das zehnfache dar. Dies könnte auch mit der besseren Anheftung von *G. metallireducens barcode* an die Anode zu tun haben, da es keine Strömung gab.

Die Coulomb Effizienz der Brennstoffzellen ist sehr gering, dafür dass sie von *G. sulfurreducens* dominiert werden. Literaturwerte für *G. sulfurreducens* gibt es von bis zu 95 - 100% (Bond & Lovley, 2003; Nevin *et al.*, 2008). Der Unterschied könnte daraus resultieren, dass in den aufgeführten Studien die Coulomb Effizienz erst nach mehreren Tagen bestimmt wurde (wenn es eine stabile Stromproduktion gab) und nicht wie in diesem Experiment in der Anwachsphase. Daraus lässt sich jedoch schließen, dass in den Brennstoffzellen in den ersten Tagen die Elektronen eher in die Produktion von Biomasse als in Stromproduktion fließen oder zu Beginn eine Sauerstoffkontamination vorlag.

## 2.2 Vergleich der Stromproduktion

Die vorinkubierten Anoden wurden in neue Brennstoffzellen gebaut, in denen sich ein synthetisches Abwasser mit 1% Klärschlamm befand. Das synthetische Abwasser besteht aus Fleischextrakt, Pepton und Glucose. Dies sind keine Elektronendonoren, die drei exoelektrogenen Organismen auf der Anode benutzen können. Dennoch fand sofort und ohne zeitliche Verzögerung eine Stromproduktion statt. Dies weist eventuell darauf hin, dass die Nahrungskette in den Brennstoffzellen sofort funktionierte. Dabei müssten die Gärer aus dem Klärschlamm die angebotenen Kohlenstoffquellen zu organischen Säuren wie Acetat, Lactat, Propionat und Formiat oxidieren (Kong *et al.*, 2008), die dann wiederum als Elektronendonoren von den exoelektrogenen Organismen genutzt werden konnten. Da es bereits eine komplette Besiedelung der Anode gab, konnten sich auch

nicht direkt Organismen aus dem Klärschlamm an die Anode anlagern und Elektronen übertragen. Der Shuttle-vermittelte Elektronentransport an die Anode war daher auch zumindest erschwert. Es wäre jedoch möglich, dass die Eigenschaft von *G. sulfurreducens* leitfähige Biofilme auf Anoden zu bilden (Malvankar *et al.*, 2012), genutzt wurde. Dazu müssten die Mikroorganismen des Klärschlammes entweder direkten Interspezies Elektronentransfer mit *G. sulfurreducens* (Summers *et al.*, 2010) betreiben können, oder es müssten passende Elektronenshuttle im Abwasser vorhanden sein. Dies müsste durch sofortige Stromproduktion in Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden und Abwasser zu bestätigen sein.

Daher wurden zum Vergleich gleichzeitig mit dem Überführen der vorinkubierten Anoden auch neue Brennstoffzellen ohne vorinkubierte Anoden gestartet. In den ersten zwei Tagen wurde kein Strom produziert, daher scheint die Annahme, dass die Nahrungskette direkt funktionierte, wahrscheinlicher.

Als der Strom in allen Brennstoffzellen sank, wurde erneut synthetisches Abwasser dazugegeben. Dies führte bei allen Brennstoffzellen zu einem Anstieg der Stromdichte. Auch dies lässt auf eine funktionierende Nahrungskette schließen. Dies wurde noch zweimal wiederholt. Dabei war zu beobachten, dass die Stromdichte bei den Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden stetig weiter anstieg und am Ende wesentlich höhere Werte als die mit vorinkubierten Anoden erreichten. Somit konnte keine Leistungssteigerung der Brennstoffzellen durch Vorinkubation der Anoden mit bekannten exoelektrogenen Organismen erreicht werden. Das kann daran liegen, dass die exoelektrogene Mikroorganismen sich nicht so gut an das synthetische Abwasser wie die Klärschlamm Bakterien adaptieren konnten. Gleichzeitig konnte auch beobachtet werden, dass die Stromdichten im definierten Anodenmedium II wesentlich höher als im synthetischen Abwasser waren. Ein Grund kann die geringere Leitfähigkeit von Abwasser sein (Lovley, 2012). Die Leitfähigkeit des synthetischen Abwassers betrug nur 7,4% der Leitfähigkeit des CO<sub>2</sub>-gepufferten Mediums.

### **2.3 Vergleich des TOC-Gehalts und Coulomb Effizienz**

Ein weiterer Kennwert der Abwasserreinigung ist die Abnahme des organischen Kohlenstoffs. Dazu wurde jeden Tag eine Probe entnommen und mit dem TOC-Analyser gemessen. Dabei hatten nur die Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden eine

---

konstante Abnahme des TOC-Gehalts. Bei den Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden gab es sogar eine Akkumulation von Kohlenstoff im Abwasser. Eine genauere Analyse könnte zeigen, ob bestimmte organische Kohlenstoffverbindungen sich ansammeln. Ob es quasi einen Engpass bei dem Abbau eines oder mehrerer Kohlenstoffverbindungen gibt.

Für Brennstoffzellen im Abwasser ist jedoch nicht nur die Reduktion vom TOC-Gehalt wichtig, sondern auch die pro Molekül verbrauchtem Kohlenstoff gewonnene Elektronen bzw. elektrischer Ladung. Dies wird durch die Coulomb Effizienz ausgedrückt. Während wie oben erwähnt Brennstoffzellen mit *G. sulfurreducens* als Organismus und Acetat als Substrat eine Coulomb Effizienz von 100% in der stationären Phase haben, da das Acetat bis zum CO<sub>2</sub> komplett oxidiert wird, haben Brennstoffzellen mit *S. oneidensis* und Lactat geringere Ausbeuten (Newton *et al.*, 2009). Dies liegt vor allem daran, dass *S. oneidensis* unter anaeroben Bedingungen das Lactat nur bis zum Acetat verstoffwechseln kann (Scott & Neelson, 1994).

Während die mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden zuerst eine höhere Coulomb Effizienz hatten als die Brennstoffzellen mit nicht-vorinkubierten Anoden, änderte sich dies nach etwa der Hälfte der Zeit. Dann zeigten die nicht-vorinkubierten höhere Werte, die im Vergleich mit Literaturwerten im Mittelfeld liegen. Cha und Kollegen untersuchten Brennstoffzellen mit Graphitvlies und Abwasser und nach 100 Tagen hatten sie eine Coulomb Effizienz von 39,6% (Cha *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu wurde die Coulomb Effizienz von Brennstoffzellen mit einer Bürste und Abwasser für in der Zeitspanne von 62. – 93. Tag gemessen. Dieser Wert lag mit  $8,6 \pm 2,9\%$  (Hays *et al.*, 2011) näher am Wert der mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden nach 14 Tagen.

Gleichzeitig stabilisierte sich die Coulomb Effizienz bei den Brennstoffzellen mit vorinkubierter Anode in dem gemessenen Zeitraum bereits. Dies bedeutet, dass es eine stabile Nahrungskette gab. Bei den Brennstoffzellen ohne vorinkubierten Anoden hingegen, nimmt die Coulomb Effizienz bis zur Ende der Messung stetig zu, aber mit einer großen Streuung.

Durch die Vorinkubation der Anode mit exoelektrogenen Mikroorganismen konnte daher im Vergleich zu Brennstoffzellen ohne vorinkubierten Anoden eine Stabilisierung des Verbrauchs von  $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ TOC}$  in drei Tagen erzielt werden. Gleichzeitig konnte

auch eine zwar niedrigere, dafür aber stabilere Coulomb Effizienz erreicht werden. Dies ist alles ein Vorteil, wenn es um die Reinigung des Abwassers geht. Jedoch stellt sich die Frage, wohin die Elektronen aus dem Verbrauch von mehr TOC bei den Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden übertragen wurden, wenn die Coulomb Effizienz geringer ist. Eine Möglichkeit ist, dass die Elektronen in flüchtigen Produkten wie Methan und Wasserstoff gespeichert wurden und daher nicht als Strom dem System zur Verfügung standen.

### **2.4 Mikrobielle Population**

Durch FISH-Färbungen konnte gezeigt werden, dass es einen geschlossenen Biofilm um die Fasern bereits nach der Vorinkubation gab, der durch die weitere Inkubation in Abwasser noch dicker wurde. Auf der nicht-vorinkubierten Anode war nicht so ein gleichmäßiger Biofilm entstanden. Auf den Anoden konnten jeweils nur Eubacteria nachgewiesen werden. Dies widerspricht älteren Studien, bei denen sowohl Bakterien wie auch Archaea auf der Anode gefunden wurden (Chung & Okabe, 2009; Parameswaran *et al.*, 2009). Dies könnte an dem hier verwendeten Material, der geringeren Konzentration methanogener Organismen im Inokulum oder deren physiologischer Inaktivität liegen, da über FISH die Anzahl an Ribosomen quantifiziert wird.

Der Überstand bestand hauptsächlich aus Flocken, in denen sich Archaea und Bakterien unabhängig von der Vorbehandlung der Anode nachweisen ließen. Im Überstand der Brennstoffzellen mit vorinkubierter Anode wurde auch eine FISH-Färbung mit der Sonde für das *Geobacter* Cluster gemacht. Dabei konnte aber keine Fluoreszenz detektiert werden und es muss davon ausgegangen werden, dass sich von der vorinkubierten Anode keine Zellen abgelöst haben und dann in der planktonischen Phase weiterüberlebt haben.

### **2.5 Überleben der drei exoelektrogenen Mikroorganismen**

Durch die Integration des Barcodes in die Genome der drei exoelektrogenen Mikroorganismen konnte das Überleben der Zellen in einer mikrobiellen Brennstoffzelle mit Abwasser verfolgt werden. Zum einen wurde die prozentuale Verteilung der drei Stämmen nach sechs Tagen gemeinsamer Inkubation in Brennstoffzellen mit

---

Graphitvlies als Elektrodenmaterial bestimmt. Dabei fiel auf, dass *G. sulfurreducens barcode* sowohl die sessilen als auch die planktonischen Fraktionen dominiert, dass die beiden anderen Stämme aber auch jeweils noch nachzuweisen waren.

Anschließend wurden die so vorinkubierten Anoden in Brennstoffzellen mit Abwasser überführt und nach 14 Tagen die Zellzahl der drei Stämme erneut bestimmt. Die Dominanz von *G. sulfurreducens barcode* auf der Anode wurde noch größer und es waren noch etwa 2/3 der Ausgangspopulation vorhanden. Der Anteil an *S. oneidensis barcode* und *G. metallireducens barcode* nahm ab und die Überlebensrate waren nur noch jede zehnte bzw. jede fünfte Zelle. In der planktonischen Fraktion konnten keiner der drei Stämme nachgewiesen werden, d.h. dass die Zellzahl unterhalb der Nachweisgrenze war.

### 3 Fazit Teil III

Mit der Integration einer synthetischen und einmaligen DNA-Sequenz in die Genome von drei exoelektrogenen Organismen wurde ein System entwickelt, mit dem es sich leicht quantitativ nachverfolgen lässt, wie diese Organismen sich in einer gemeinsamen Brennstoffzelle verhalten und wie sie auf Einflüsse wie Strömung des Mediums reagieren.

Zum anderen aber erlaubt die Verwendung des Barcodes im Genom, dass es eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den aktiv eingebrachten Stämmen und in einer Abwasserprobe natürlich vorkommenden Wildtyp Stämmen gibt. Damit konnte gezeigt werden, dass alle drei Stämme unter Umweltbedingungen in einer mikrobiellen Brennstoffzelle überleben können, wobei eine Dominanz von *G. sulfurreducens* gezeigt wurde.

Gleichzeitig konnte zwar gezeigt werden, dass diese mikrobiellen Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden eine geringere Stromdichte und auch eine niedrigere Coulomb Effizienz als Brennstoffzellen ohne vorinkubierten Anoden hatten. Jedoch war der Verbrauch vom organischen Kohlenstoff in den Brennstoffzellen mit vorinkubierten Anoden konstanter und effektiver. Dadurch gibt es eine Verbesserung der Reinigung des Abwassers.

Für die Zukunft bietet es sich an, dass in den Biofilm Stämme integriert werden, die metabolisch so verändert wurden, dass sie durch die Nutzung der Elektrode als

Elektronensenke Produkte herstellen, die weniger reduziert sind als die Substrate. Dies konnte schon von Flynn *et al.* für *S. oneidensis* gezeigt werden, der nach genetischer Manipulation in der Lage war, Glycerin zu Ethanol zu fermentieren und dabei die überflüssigen Elektronen auf eine Anode übertrug (Flynn *et al.*, 2010). Da *S. oneidensis* in der Brennstoffzelle mit Abwasser überleben kann, muss auch die Affinität für ein anderes Substrat nicht geändert werden, jedoch ist entscheidend, welches Endprodukt entstehen soll. Es würde sich anbieten, Cellulasen zu sekretieren, die beim Abbau der Cellulose im Abwasser helfen könnten und somit eine Steigerung des Wirkungsgrads bewirken.

## 5 Literaturverzeichnis

DIN EN ISO 11733:2004-11, Water quality - determination of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - activated sludge simulation test (ISO 11733:2004).

**Aklujkar, M., Krushkal, J., DiBartolo, G., Lapidus, A., Land, M. L. & Lovley, D. R. (2009).** The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol* **9**, 109.

**Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A. (1990a).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1919-1925.

**Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A. (1990b).** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**, 762-770.

**Arends, J. B. & Verstraete, W. (2012).** 100 years of microbial electricity production: three concepts for the future. *Microb Biotechnol* **5**, 333-346.

**Babanova, S., Bretschger, O., Roy, J., Cheung, A., Artyushkova, K. & Atanassov, P. (2014).** Innovative statistical interpretation of *Shewanella oneidensis* microbial fuel cells data. *Phys Chem Chem Phys* **16**, 8956-8969.

**Babauta, J. T., Nguyen, H. D., Harrington, T. D., Renslow, R. & Beyenal, H. (2012).** pH, redox potential and local biofilm potential microenvironments within *Geobacter sulfurreducens* biofilms and their roles in electron transfer. *Biotechnol Bioeng* **109**, 2651-2662.

**Bär, R. M. (2014).** Ganzzellmessungen von mikrobiellen Brennstoffzellen mit *Shewanella oneidensis*. In *Institut für Angewandte Biowissenschaften*. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie.

**Baron, D., LaBelle, E., Coursolle, D., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. (2009).** Electrochemical measurement of electron transfer kinetics by *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Biol Chem* **284**, 28865-28873.

**Boesen, T. & Nielsen, L. P. (2013).** Molecular dissection of bacterial nanowires. *MBio* **4**, e00270-00213.

**Bonanni, P. S., Massazza, D. & Busalmen, J. P. (2013).** Stepping stones in the electron transport from cells to electrodes in *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Phys Chem Chem Phys* **15**, 10300-10306.

**Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M. & Lovley, D. R. (2002).** Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* **295**, 483-485.

- Bond, D. R. & Lovley, D. R. (2003).** Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1548-1555.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Nichols, D. S., Skerratt, J. H., Rea, S. M., Nichols, P. D. & McMeekin, T. A. (1997).** *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 omega 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1040-1047.
- Bradford, M. M. (1976).** Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bücking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S. & Gescher, J. (2010).** Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol Lett* **306**, 144-151.
- Butler, J. E., Young, N. D. & Lovley, D. R. (2010).** Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics* **11**, 40.
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F. & McInerney, M. J. (1994).** *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3752-3759.
- Call, D. F. & Logan, B. E. (2011a).** A method for high throughput bioelectrochemical research based on small scale microbial electrolysis cells. *Biosens Bioelectron* **26**, 4526-4531.
- Call, D. F. & Logan, B. E. (2011b).** Lactate oxidation coupled to iron or electrode reduction by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Appl Environ Microbiol* **77**, 8791-8794.
- Cavazza, C., Giudici-Orticoni, M. T., Nitschke, W., Appia, C., Bonnefoy, V. & Bruschi, M. (1996).** Characterisation of a soluble cytochrome  $c_4$  isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Eur J Biochem* **242**, 308-314.
- Cha, J., Choi, S., Yu, H., Kim, H. & Kim, C. (2010).** Directly applicable microbial fuel cells in aeration tank for wastewater treatment. *Bioelectrochemistry* **78**, 72-79.
- Chao, L., Rakshe, S., Leff, M. & Spormann, A. M. (2013).** PdeB, a cyclic Di-GMP-specific phosphodiesterase that regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 motility and biofilm formation. *J Bacteriol* **195**, 3827-3833.
- Childers, S. E. & Lovley, D. R. (2001).** Differences in Fe(III) reduction in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum islandicum*, versus mesophilic Fe(III)-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **195**, 253-258.
- Chung, K. & Okabe, S. (2009).** Continuous power generation and microbial community structure of the anode biofilms in a three-stage microbial fuel cell system. *Appl Microbiol Biotechnol* **83**, 965-977.
- Clarke, T. A., Edwards, M. J., Gates, A. J. & other authors (2011).** Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9384-9389.

- Cohen, B. (1930).** The bacterial culture as an electrical half-cell. In *Thirty-second annual meeting of the society of american bacteriologists*, pp. 18-19. Boston, Mass., USA.
- Coppi, M. V., Leang, C., Sandler, S. J. & Lovley, D. R. (2001).** Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3180-3187.
- Cort, J. R., Swenson, M. W. & Magnuson, T. S. (2011).** 1H, 13C, and 15N backbone, side-chain, and heme chemical shift assignments for oxidized and reduced forms of the monoheme c-type cytochrome ApcA isolated from the acidophilic metal-reducing bacterium *Acidiphilium cryptum*. *Biomol NMR Assign* **5**, 89-92.
- Dannenberg, S., Kroder, M., Dilling, W. & Cypionka, H. (1992).** Oxidation of H<sub>2</sub>, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* **158**, 93-99.
- Davis, J. B. & Yarbrough, H. F. (1962).** Preliminary experiments on a microbial fuel cell. *Science* **137**, 615-616.
- De Windt, W., Gao, H., Kromer, W., Van Damme, P., Dick, J., Mast, J., Boon, N., Zhou, J. & Verstraete, W. (2006).** AggA is required for aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Microbiology* **152**, 721-729.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S. & Pace, N. R. (1989).** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360-1363.
- Di Lorenzo, M., Scott, K., Curtis, T. P., Katuri, K. P. & Head, I. M. (2009).** Continuous feed microbial fuel cell using an air cathode and a disc anode stack for wastewater treatment. *Energy Fuels* **23**, 5707-5716.
- Dolch, K. (2010).** Biologie acidophiler dissimilatorischer Metallreduzierer. In *Fakultät für Biologie*, pp. 76. Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Doong, R. A. & Schink, B. (2002).** Cysteine-mediated reductive dissolution of poorly crystalline iron(III) oxides by *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Sci Technol* **36**, 2939-2945.
- Elbehti, A. & Lemesle-Meunier, D. (1996).** Identification of membrane-bound c-type cytochromes in an acidophilic ferrous ion oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* **136**, 51-56.
- Erable, B., Feron, D. & Bergel, A. (2012).** Microbial catalysis of the oxygen reduction reaction for microbial fuel cells: a review. *ChemSusChem* **5**, 975-987.
- Feist, A. M., Nagarajan, H., Rotaru, A. E., Tremblay, P. L., Zhang, T., Nevin, K. P., Lovley, D. R. & Zengler, K. (2014).** Constraint-based modeling of carbon fixation and the energetics of electron transfer in *Geobacter metallireducens*. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003575.
- Flynn, C. M., Hunt, K. A., Gralnick, J. A. & Sreenc, F. (2012).** Construction and elementary mode analysis of a metabolic model for *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosystems* **107**, 120-128.
- Flynn, J. M., Ross, D. E., Hunt, K. A., Bond, D. R. & Gralnick, J. A. (2010).** Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *MBio* **1**.

- Franks, A. E. & Nevin, K. P. (2010).** Microbial fuel cells, a current review. *Energy* **3**, 899-919.
- Gao, H., Yang, Z. K., Barua, S., Reed, S. B., Romine, M. F., Nealson, K. H., Fredrickson, J. K., Tiedje, J. M. & Zhou, J. (2009).** Reduction of nitrate in *Shewanella oneidensis* depends on atypical NAP and NRF systems with NapB as a preferred electron transport protein from CymA to NapA. *ISME J* **3**, 966-976.
- Gao, H., Barua, S., Liang, Y. & other authors (2010).** Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microb Biotechnol* **3**, 455-466.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A. & Smith, H. O. (2009).** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343-345.
- Giudici-Orticoni, M.-T., Leroy, G., Nitschke, W. & Bruschi, M. (2000).** Characterization of a new dihemic  $c_4$ -type cytochrome isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry* **39**, 7205-7211.
- Golitsch, F., Bücking, C. & Gescher, J. (2013).** Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosens Bioelectron* **47**, 285-291.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S. & other authors (2006).** Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11358-11363.
- Haldimann, A. & Wanner, B. L. (2001).** Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol* **183**, 6384-6393.
- Harrison, A. P. (1981).** *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int J Syst Bacteriol* **31**, 327-332.
- Hau, H. H. & Gralnick, J. A. (2007).** Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol* **61**, 237-258.
- Hays, S., Zhang, F. & Logan, B. E. (2011).** Performance of two different types of anodes in membrane electrode assembly microbial fuel cells for power generation from domestic wastewater. *J Power Sources* **196**, 8293-8300.
- Holmes, D. E., Bond, D. R. & Lovley, D. R. (2004).** Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1234-1237.
- Huggett, M. J., Crocetti, G. R., Kjelleberg, S. & Steinberg, P. D. (2008).** Recruitment of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* and the distribution and abundance of inducing bacteria in the field. *Aquat Microb Ecol* **53**, 161-171.
- Ieropoulos, I. A., Ledezma, P., Stinchcombe, A., Papaharalabos, G., Melhuish, C. & Greenman, J. (2013).** Waste to real energy: the first MFC powered mobile phone. *Phys Chem Chem Phys* **15**, 15312-15316.

- Inoue, K., Qian, X., Morgado, L., Kim, B. C., Mester, T., Izallalen, M., Salgueiro, C. A. & Lovley, D. R. (2010).** Purification and characterization of OmcZ, an outer-surface, octaheme *c*-type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3999-4007.
- Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Wu, A., Yamanaka, Y., Nealson, K. H. & Bretschger, O. (2013).** Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water Res* **47**, 7120-7130.
- Jung, S. & Regan, J. M. (2011).** Influence of external resistance on electrogenesis, methanogenesis, and anode prokaryotic communities in microbial fuel cells. *Appl Environ Microbiol* **77**, 564-571.
- Kashefi, K., Tor, J. M., Holmes, D. E., Gaw Van Praagh, C. V., Reysenbach, A. L. & Lovley, D. R. (2002).** *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 719-728.
- Khare, N., Eggleston, C. M., Lovelace, D. M. & Boese, S. W. (2006).** Structural and redox properties of mitochondrial cytochrome *c* co-sorbed with phosphate on hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) surfaces. *J Colloid Interface Sci* **303**, 404-414.
- Ki, D., Park, J., Lee, J. & Yoo, K. (2008).** Microbial diversity and population dynamics of activated sludge microbial communities participating in electricity generation in microbial fuel cells. *Water Sci Technol* **58**, 2195-2201.
- Kim, B.-H., Kim, H. J., Hyun, M. S. & Park, D.-H. (1999).** Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J Microbiol Biotechnol* **9**, 127-131.
- Kim, G. T., Webster, G., Wimpenny, J. W., Kim, B. H., Kim, H. J. & Weightman, A. J. (2006).** Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell. *J Appl Microbiol* **101**, 698-710.
- Kim, J. R., Min, B. & Logan, B. E. (2005).** Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 23-30.
- Kindaichi, T., Okabe, S., Satoh, H. & Watanabe, Y. (2004).** Effects of hydroxylamine on microbial community structure and function of autotrophic nitrifying biofilms determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Water Sci Technol* **49**, 61-68.
- Kipf, E., Koch, J., Geiger, B., Erben, J., Richter, K., Gescher, J., Zengerle, R. & Kerzenmacher, S. (2013).** Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresour Technol* **146**, 386-392.
- Kipf, E., Zengerle, R., Gescher, J. & Kerzenmacher, S. (2014).** How does the choice of anode material influence electrical performance? A comparison of two microbial fuel cell model organisms. *ChemElectroChem*.
- Klimes, A., Franks, A. E., Glaven, R. H., Tran, H., Barrett, C. L., Qiu, Y., Zengler, K. & Lovley, D. R. (2010).** Production of pilus-like filaments in *Geobacter sulfurreducens* in the absence of the type IV pilin protein PilA. *FEMS Microbiol Lett* **310**, 62-68.

**Kloke, A., Rubenwolf, S., Bücking, C., Gescher, J., Kerzenmacher, S., Zengerle, R. & von Stetten, F. (2010).** A versatile miniature bioreactor and its application to bioelectrochemistry studies. *Biosens Bioelectron* **25**, 2559-2565.

**Kong, Y., Xia, Y. & Nielsen, P. H. (2008).** Activity and identity of fermenting microorganisms in full-scale biological nutrient removing wastewater treatment plants. *Environ Microbiol* **10**, 2008-2019.

**Kouzuma, A., Oba, H., Tajima, N., Hashimoto, K. & Watanabe, K. (2014).** Electrochemical selection and characterization of a high current-generating *Shewanella oneidensis* mutant with altered cell-surface morphology and biofilm-related gene expression. *BMC Microbiol* **14**, 190.

**Kumar, G. G., Sarathi, V. G. & Nahm, K. S. (2013).** Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosens Bioelectron* **43**, 461-475.

**Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G. & Stackebrandt, E. (1999).** Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3633-3640.

**Laanbroek, H. J., Abee, T. & Voogd, I. L. (1982).** Alcohol conversion by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch Microbiol* **133**, 178-184.

**Lapinsonnière, L., Picot, M. & Barriere, F. (2012).** Enzymatic versus microbial bio-catalyzed electrodes in bio-electrochemical systems. *ChemSusChem* **5**, 995-1005.

**Leang, C., Qian, X., Mester, T. & Lovley, D. R. (2010).** Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4080-4084.

**Ledezma, P., Stinchcombe, A., Greenman, J. & Ieropoulos, I. (2013).** The first self-sustainable microbial fuel cell stack. *Phys Chem Chem Phys* **15**, 2278-2281.

**Lee, J., Phung, N. T., Chang, I. S., Kim, B. H. & Sung, H. C. (2003).** Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiol Lett* **223**, 185-191.

**Lin, W. C., Coppi, M. V. & Lovley, D. R. (2004).** *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2525-2528.

**Lin, X., Nishio, K., Konno, T. & Ishihara, K. (2012).** The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices. *Biomaterials* **33**, 8221-8227.

**Liu, H., Ramnarayanan, R. & Logan, B. E. (2004).** Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol* **38**, 2281-2285.

**Liu, H., Matsuda, S., Hashimoto, K. & Nakanishi, S. (2012).** Flavins secreted by bacterial cells of *Shewanella* catalyze cathodic oxygen reduction. *ChemSusChem* **5**, 1054-1058.

- Liu, Y., Wang, Z., Liu, J. & other authors (2014).** A trans-outer membrane porin-cytochrome protein complex for extracellular electron transfer by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Environ Microbiol Rep.*
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W. & Rabaey, K. (2006).** Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol* **40**, 5181-5192.
- Logan, B. E. (2008).** *Microbial fuel cells*: John Wiley & Sons.
- Logan, B. E. (2009).** Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol* **7**, 375-381.
- Logan, B. E. (2012).** Essential data and techniques for conducting microbial fuel cell and other types of bioelectrochemical system experiments. *ChemSusChem* **5**, 988-994.
- Lovley, D. R. & Phillips, E. J. (1988).** Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1472-1480.
- Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J., Gorby, Y. A. & Goodwin, S. (1993).** *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol* **159**, 336-344.
- Lovley, D. R. (2006).** Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**, 497-508.
- Lovley, D. R. (2012).** Electromicrobiology. *Annu Rev Microbiol* **66**, 391-409.
- Lutz, R. & Bujard, H. (1997).** Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **25**, 1203-1210.
- Magnuson, T. S., Swenson, M. W., Paszczyński, A. J., Deobald, L. A., Kerk, D. & Cummings, D. E. (2010).** Proteogenomic and functional analysis of chromate reduction in *Acidiphilium cryptum* JF-5, an Fe(III)-respiring acidophile. *Biometals* **23**, 1129-1138.
- Mahadevan, R., Bond, D. R., Butler, J. E., Esteve-Nunez, A., Coppi, M. V., Palsson, B. O., Schilling, C. H. & Lovley, D. R. (2006).** Characterization of metabolism in the Fe(III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1558-1568.
- Malarte, G., Leroy, G., Lojou, E., Abergel, C., Bruschi, M. & Giudici-Orticoni, M. T. (2005).** Insight into molecular stability and physiological properties of the diheme cytochrome CYC<sub>41</sub> from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry* **44**, 6471-6481.
- Malvankar, N. S., Lau, J., Nevin, K. P., Franks, A. E., Tuominen, M. T. & Lovley, D. R. (2012).** Electrical conductivity in a mixed-species biofilm. *Appl Environ Microbiol* **78**, 5967-5971.

- Malvankar, N. S. & Lovley, D. R. (2014).** Microbial nanowires for bioenergy applications. *Curr Opin Biotechnol* **27**, 88-95.
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. (2008).** *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3968-3973.
- Matsuzawa, Y., Kanbe, T., Suzuki, J. & Hiraishi, A. (2000).** Ultrastructure of the acidophilic aerobic photosynthetic bacterium *Acidiphilium rubrum*. *Curr Microbiol* **40**, 398-401.
- Merkey, B. V. & Chopp, D. L. (2014).** Modeling the impact of interspecies competition on performance of a microbial fuel cell. *Bull Math Biol* **76**, 1429-1453.
- Méthé, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A. & other authors (2003).** Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* **302**, 1967-1969.
- Müller, J., Shukla, S., Jost, K. A. & Spormann, A. M. (2013).** The *mxl* operon in *Shewanella oneidensis* MR-1 is induced in response to starvation and regulated by ArcS/ArcA and BarA/UvrY. *BMC Microbiol* **13**, 119.
- Murillo, F. M., Gugliuzza, T., Senko, J., Basu, P. & Stolz, J. (1999).** A heme-C-containing enzyme complex that exhibits nitrate and nitrite reductase activity from the dissimilatory iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens*. *Arch Microbiol* **172**, 313-320.
- Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2000).** Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2248-2251.
- Nevin, K. P., Richter, H., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Orloff, A. L., Jia, H., Zhang, M. & Lovley, D. R. (2008).** Power output and coulombic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environ Microbiol* **10**, 2505-2514.
- Nevin, K. P., Kim, B. C., Glaven, R. H. & other authors (2009).** Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS One* **4**, e5628.
- Newton, G. J., Mori, S., Nakamura, R., Hashimoto, K. & Watanabe, K. (2009).** Analyses of current-generating mechanisms of *Shewanella loihica* PV-4 and *Shewanella oneidensis* MR-1 in microbial fuel cells. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7674-7681.
- Oberender, J., Kung, J. W., Seifert, J., von Bergen, M. & Boll, M. (2012).** Identification and characterization of a succinyl-coenzyme A (CoA): benzoate CoA transferase in *Geobacter metallireducens*. *J Bacteriol* **194**, 2501-2508.
- Oh, S. T., Kim, J. R., Premier, G. C., Lee, T. H., Kim, C. & Sloan, W. T. (2010).** Sustainable wastewater treatment: how might microbial fuel cells contribute. *Biotechnol Adv* **28**, 871-881.
- Okabe, S., Satoh, H. & Watanabe, Y. (1999).** *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3182-3191.

- Okamoto, A., Hashimoto, K., Nealson, K. H. & Nakamura, R. (2013).** Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7856-7861.
- Okamoto, A., Hashimoto, K. & Nealson, K. H. (2014a).** Flavin redox bifurcation as a mechanism for controlling the direction of electron flow during extracellular electron transfer. *Angew Chem Int Ed Engl.*
- Okamoto, A., Kalathil, S., Deng, X., Hashimoto, K., Nakamura, R. & Nealson, K. H. (2014b).** Cell-secreted flavins bound to membrane cytochromes dictate electron transfer reactions to surfaces with diverse charge and pH. *Sci Rep* **4**, 5628.
- Parameswaran, P., Torres, C. I., Lee, H. S., Krajmalnik-Brown, R. & Rittmann, B. E. (2009).** Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and non-ARB in a biofilm anode: electron balances. *Biotechnol Bioeng* **103**, 513-523.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. (2004).** Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. In *MMEM*, pp. 2613-2627. Edited by G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans & J. D. van Elsas: Springer Netherlands.
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M. & other authors (2014).** *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Potter, M. C. (1911).** Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc Roy Soc* **B84**.
- Qian, X., Mester, T., Morgado, L. & other authors (2011).** Biochemical characterization of purified OmcS, a c-type cytochrome required for insoluble Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 404-412.
- Qu, Y., Feng, Y., Wang, X. & Logan, B. E. (2012).** Use of a coculture to enable current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* **78**, 3484-3487.
- Rainey, F. A., Dorsch, M., Morgan, H. W. & Stackebrandt, E. (1992).** 16S rDNA analysis of *Spirochaeta thermophila*: its phylogenetic position and implications for the systematics of the order *Spirochaetales*. *Syst Appl Microbiol* **15**, 197-202.
- Rasband, W. S. (1997 - 2004).** ImageJ. In *National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*.
- Ren, Z., Steinberg, L. M. & Regan, J. M. (2008).** Electricity production and microbial biofilm characterization in cellulose-fed microbial fuel cells. *Water Sci Technol* **58**, 617-622.
- Renslow, R., Babauta, J., Kuprat, A., Schenk, J., Ivory, C., Fredrickson, J. & Beyenal, H. (2013a).** Modeling biofilms with dual extracellular electron transfer mechanisms. *Phys Chem Chem Phys* **15**, 19262-19283.
- Renslow, R., Babauta, J., Majors, P. & Beyenal, H. (2013b).** Diffusion in biofilms respiring on electrodes. *Energy Environ Sci* **6**, 595-607.

- Richardson, S. M., Nunley, P. W., Yarrington, R. M., Boeke, J. D. & Bader, J. S. (2010).** GeneDesign 3.0 is an updated synthetic biology toolkit. *Nucleic Acids Res* **38**, 2603-2606.
- Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2007).** Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5347-5353.
- Richter, K., Schicklberger, M. & Gescher, J. (2012).** Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* **78**, 913-921.
- Rollefson, J. B., Levar, C. E. & Bond, D. R. (2009).** Identification of genes involved in biofilm formation and respiration via mini-Himar transposon mutagenesis of *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* **191**, 4207-4217.
- Saltikov, C. W. & Newman, D. K. (2003).** Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10983-10988.
- Satoh, H., Yamakawa, T., Kindaichi, T., Ito, T. & Okabe, S. (2006).** Community structures and activities of nitrifying and denitrifying bacteria in industrial wastewater-treating biofilms. *Biotechnol Bioeng* **94**, 762-772.
- Schröder, U. (2012).** Microbial fuel cells and microbial electrochemistry: into the next century! *ChemSusChem* **5**, 959-961.
- Schütz, B., Schicklberger, M., Kürmann, J., Spormann, A. M. & Gescher, J. (2009).** Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7789-7796.
- Scott, J. H. & Nealson, K. H. (1994).** A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J Bacteriol* **176**, 3408-3411.
- Shanks, R. M., Caiazza, N. C., Hinsa, S. M., Toutain, C. M. & O'Toole, G. A. (2006).** *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5027-5036.
- Shannon, K. E., Lee, D. Y., Trevors, J. T. & Beaudette, L. A. (2007).** Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci Total Environ* **382**, 121-129.
- Sievers, M., Schläfer, O., Bormann, H., Niedermeiser, M., Bahnemann, D. & Dillert, R. (2010).** Machbarkeitsstudie für die Anwendung einer mikrobiellen Brennstoffzelle im Abwasser- und Abfallbereich AZ 26580- 31.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat Biotechnol* **1**, 784 - 791.
- Smith, J. A., Tremblay, P. L., Shrestha, P. M., Snoeyenbos-West, O. L., Franks, A. E., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2014).** Going wireless: Fe(III) oxide reduction without pili by *Geobacter sulfurreducens* strain JS-1. *Appl Environ Microbiol* **80**, 4331-4340.

- Snider, R. M., Strycharz-Glaven, S. M., Tsoi, S. D., Erickson, J. S. & Tender, L. M. (2012).** Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 15467-15472.
- Stevens, J. M., Daltrop, O., Allen, J. W. & Ferguson, S. J. (2004).** C-type cytochrome formation: chemical and biological enigmas. *Acc Chem Res* **37**, 999-1007.
- Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S. & Lovley, D. R. (2010).** Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science* **330**, 1413-1415.
- Szöllősi, A., Hoschke, Á., Rezessy-Szabó, J. M. & Nguyen, Q. D. (2014).** Electricity generation by single-chamber microbial fuel cell using nickel on air-cathode. In *22nd european biomass conference and exhibition*. Hamburg.
- Tender, L. M., Gray, S. A., Groveman, E. & other authors (2008).** The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *J Power Sources* **179**, 571-575.
- Theunissen, S., De Smet, L., Dansercoer, A., Motte, B., Coenye, T., Van Beeumen, J. J., Devreese, B., Savvides, S. N. & Vergauwen, B. (2010).** The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation. *Res Microbiol* **161**, 144-152.
- Tremblay, P. L., Aklujkar, M., Leang, C., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2012).** A genetic system for *Geobacter metallireducens*: role of the flagellin and pilin in the reduction of Fe(III) oxide. *Environmental Microbiology Reports* **4**, 82-88.
- Vargas, M., Malvankar, N. S., Tremblay, P. L., Leang, C., Smith, J. A., Patel, P., Snoeyenbos-West, O., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2013).** Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. *MBio* **4**, e00105-00113.
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E. & other authors (1999).** Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 705-724.
- Walsh, C., Fisher, J., Spencer, R., Graham, D. W., Ashton, W. T., Brown, J. E., Brown, R. D. & Rogers, E. F. (1978).** Chemical and enzymatic properties of riboflavin analogues. *Biochemistry* **17**, 1942-1951.
- Widdel, F. & Pfennig, N. (1982).** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol* **131**, 360-365.
- Yang, T. H., Coppi, M. V., Lovley, D. R. & Sun, J. (2010).** Metabolic response of *Geobacter sulfurreducens* towards electron donor/acceptor variation. *Microb Cell Fact* **9**, 90.
- Yarzabal, A., Brasseur, G., Ratouchniak, J., Lund, K., Lemesle-Meunier, D., DeMoss, J. A. & Bonnefoy, V. (2002).** The high-molecular-weight cytochrome *c* C<sub>yc2</sub> of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *J Bacteriol* **184**, 313-317.

**Yates, M. D., Kiely, P. D., Call, D. F., Rismani-Yazdi, H., Bibby, K., Peccia, J., Regan, J. M. & Logan, B. E. (2012).** Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells. *ISME J* **6**, 2002-2013.

**Ye, Q., Roh, Y., Carroll, S. L., Blair, B., Zhou, J., Zhang, C. L. & Fields, M. W. (2004).** Alkaline anaerobic respiration: isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5595-5602.

**Yong, Y. C., Cai, Z., Yu, Y. Y., Chen, P., Jiang, R., Cao, B., Sun, J. Z., Wang, J. Y. & Song, H. (2013).** Increase of riboflavin biosynthesis underlies enhancement of extracellular electron transfer of *Shewanella* in alkaline microbial fuel cells. *Bioresour Technol* **130**, 763-768.

**Yoon, S., Sanford, R. A. & Löffler, F. E. (2013).** *Shewanella* spp. use acetate as an electron donor for denitrification but not ferric iron or fumarate reduction. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2818-2822.

**Yoshida, N., Nakasato, M., Ohmura, N., Ando, A., Saiki, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006).** *Acidianus manzaensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon growing autotrophically by the oxidation of H<sub>2</sub> with the reduction of Fe<sup>3+</sup>. *Curr Microbiol* **53**, 406-411.

**Zhang, X., Cheng, S., Huang, X. & Logan, B. E. (2010).** The use of nylon and glass fiber filter separators with different pore sizes in air-cathode single-chamber microbial fuel cells. *Energy Environ Sci* **3**, 659.

**Zhao, F., Harnisch, F., Schroder, U., Scholz, F., Bogdanoff, P. & Herrmann, I. (2006).** Challenges and constraints of using oxygen cathodes in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol* **40**, 5193-5199.

## Anhang

### 1 Sequenzen der Barcodes

Die genomischen DNA-Sequenzen sind in schwarz dargestellt und die integrierte in rot. Die Bindestellen der qPCR Primer und der Hydrolyse-Sonden sind unterstrichen und fett markiert. Es ist jeweils die Position im Genom der ersten gezeigten Base angegeben.

#### 1.1 *S. oneidensis* barcode

71499:

5'TTTTATCTCGCCAAACGGCTGGTTTACGTGGTGATTGCTGATTGTGAACCTACCTGGCAAACCTAAATCTATCCGC  
GAATGTTTAGATGCAGTATCCCGCGATTCTACTGTATCGACCTGATGGAAGGGCCATACCTGAGTGCAACGA  
GGCGGTGATAAAGCCTTTCAGACCTAAGGCCAAGTAATCATTGAGATGTAAGGTTAACTTGGTTGCTGTACGTCTA  
GGCCCTAGTTGCAACTGGGCTATGTAAGGAAGGACATAGCTCATGCTAAATCATCTACAGTGTGATAAGTCTTACTA  
GGTTGCTTTGGTTAGACAGAGCGCCTTGATATGCGCAAAAATCTGCGCATTGAGTGTGATAAATAGATTTTTCTTTTC  
AAAATAATCATTATAGCATTGATTTAGTTTAAATTTAGGTTTTTCGACACTCGTTACCCCGAGTTCAGGTTAATTT  
ACAAAGAACAGAGGTTACATGACTGTACTTGGCATTGGTGTGCGTTCTCCTTGCTCTCCGTGTGAGCCTACAGCGGC  
ATCCGAGCCGTGTTTACTGCTCTATGCCTTGAGGTGAAGGTGATAGGGAATGACATGCAAGCAAACGGATTGGCGA  
TAAACTGACTGACAAATTTGAGGCTAATTTCATAAGTCTGTGCTAATGGATCATTGCTCCCATTGCGAATAGGCTT  
GGCAAACCAATCAAGGTGAGAAAGCAGGTCTTGGATATATCAAACACAGTTAGCGAGTCATATAAAAGCCCAAAAT  
ATAACAAATTCGAATTCCTACATTGGTGGGTTGGCTAATGCTCCCTAATTGTTCTATATTACGCGGCTTGTTT  
GGGGGTTAACTTAGTATTGGTCATTCTGCAATTGATGCATCCGTGGGGATGTTGAAAAAGGTGGAATGTTGGAGA  
AGTTAGGGATGAAGGCTCTGTTAGCAAATATCTTTGGTCATTGGCAATCACCACCTTGGATGCATTGGTGAAAGCC  
CATCCAGGTAAGTATAGGTAGCTTATTAGCCCTATTACTCGTCTCTGCTGGCCTA3'

#### 1.2 *G. sulfurreducens* barcode

452604:

5'CACTTCAGATCACGAACGTCGTAGGCAAGGGAGAACAGCGGTGAGCGACTTCACGAAAGAAGAAACCAAAGACG  
GTGAACTGGACCGCAAGAACCTGGAGTTCATTCTCGATATACCGCTTCAGCTCACGGTGGAACCTGGGCCGACCAA  
GATCCTGGTCAAGGATGTGCTCCAGCTCAATCAGGGGGCGGTGGTGAATTGACCAAGCTTGCCGGAGAGCCCTTG  
GACGTTTTTCGTAACCTCAAGCTCGTCGCCCGCGGCGAGGCGGTGGTGGTCAACGAGAAGTTCGGGGTCCGGCTCG  
TGGATATCGTCAGCCCCAACGAACGGGTGGAGAAAGTACTGTGAAACAGCCGGCATCAGTTACGGCCCTGGCCCTG  
GCGGTCCCCGGCGTGGCCGGGCGCAGAGGCCGCCGGCGGAGCGAATTCAGCTTCGCCACCGTGTTCATCCAGA  
TGCTGGCCTCCCTCTACTGGTGCTGGGGCTCATCTATCTGGCCTATTACGCGGCAAACCGATGGTTTAGGCCCGGC  
GTCCACGGCAAGGGAACCGAACGCCACATCCGGCTGGTGGAAACCGCTACCTGGCGCCGAAGAGTCGCTGGTCC  
TGGTGGAGGTGGGGGGCCACGTTGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATCATCATGA  
ACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTC  
GAGGCCGCGATTAATTC AACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAG  
GTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCC  
AATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTCCGACCATCAAGCATTATC  
CGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCT  
GATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTCATTGATTCTGTTTGAATTCCT  
TTAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTT  
GATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTC  
AGTCGTCACATGGTATTCTCACTTGATAACCTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGATTGATGTTGG  
ACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACA  
GAAACGGCTTTTTCAAATAATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTGATGCTCGATGAGTT  
TTTCTAACGGTTCTATCGACCTACCTCTCCGCTCCTCCTTGATCTCACCTCACTTCTCCTGTCTTCACCTCGGTGTC  
TTCTGCAAGTGTCTGTTATGTTCTTCTCCTCCTATCCGGCCGATCGTATCGGGAGTTTCTCCTGCTCGGCT  
CTCCGGCGACAATCTCTCGTTCATCAAGCAGATAGACATCCTGGAAGAGATCGAGGTGCTCGACGAAACACCGG  
GCGACTCCCCTCGCCACTCTTTTCAGGGAAAATGGACGCGGTACGACACGGCTCGCCGCATGAAGCAGGGG  
CGTGCCGATGTCCCGAGCGCCGCGCCGGGGAAGGAAAAGCCTGAGCACCATGGACGGTGTCCCGATATTCAAACG

AATCCCTTTCATCGCCCTCTGCGTCATCCTGCTGACCGCCTCGCTGGCGGCCGCCGCCGAGCCCTGGCGCTGCCAG  
CGTTAGCATCGGGTGGGCAAGGCCACCAAGCCGGGCGATGTGTCGGTGGTCTCCAGATATTCTTCTGATGACG  
GTGCTGTCCCTGGCGCCGGGCTCCTCATGATGACCACCTGTTACGCGGATCGCGTGGTGTGCTGTTCTGCG  
CCACGCCATCGGCACCCAGCAGGCGCCCCAAACCAGATCATCATCGCCCTGTCCTGTTCTGACCTTCTCGTCAT  
GGCTCCGGTCTGGCAGCAGGTGAACACCCAGGCGATCCAGCCTTACCGGGCGGCCA3'

### 1.3 *G. metallireducens* barcode

253579:

5'CAGCCTCCGGCCAGGGTCCACCTGCTTTACTGCCGCTGCCGGCGCCTTCCGGCCGAAGAGGGGGAGATACGAG  
CCATACCCTTCTTCTCCAGGTCGTCACCGGGATGAAGCGGAGCGCCGCGGAGTTGACGCAGTAACGCAGCCCCC  
CTTGTCGCCGCGCCCGTCCGGTGAAGAGATGCCCCAGGTGGGAGTCGGCTTCTTTGGAGCGGACCTCGGTCCGGACC  
GTGCCGAAGCCGATGTCGGTCTCCTCCTTACGCTGTTCCGGGGCAGCCGGCGGGTGAAGCTGGGCCAGCCGGTGC  
CGAATCGAACTGTCCCTGGATGAGAAGAGCGGCTCACCGCTGACGATGTCCACATAGAGCCCTTCGCGGTGCTCG  
TTCCAGTAGTATTGTCGAAGGGGGCTCGTCCCCGATTTCTCGTCACGCGGACTGCAGCGGAGTGAGGCGCT  
GCTTCAGTCTTTCGTCAGAGTATTTCTCGCTGCATCGTCTCCTTTTCTGCTGTTCCGCCCGGAAGCGGGGGG  
GCCTGGCAACAACCTGCCAGTATCAGGCAGGCAACAACAATACCAGAATCGTCAATGCTCGTGTTCATCTTTTCC  
CCCGATGTTAAGATTATAGACAATTATCGAGGCATATCCAGCTCCGTAGCGCCACTCTTCCGACGTTGTCTCA  
AAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAA  
TACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTAACGGGAAACGTCTTGTCTCGAGGCCGCGATTAAATTCACATGGATGCTG  
ATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCC  
GATGCGCCAGAGTTGTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAA  
ACTGGCTGACGGAATTTATGCCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTAATCCTGATGATGCATGGTACTACCAC  
TGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGG  
CAGTGTCTCGCGCGGTTGCATTGATTCTGTTTGAATTTGCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCA  
GGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAA  
CAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTCCATTCTCACCGGATTAGTCGTAATGATGTTTCTACTTATGAT  
AACCTTATTTTACGAGGGGAAATTAATAGGTTGATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGA  
TCTTGCCATCCTATGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTCAAATAATGGTATTGAT  
AATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCAATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGCCGTGCTGTATGATAACGACTT  
GCCGACAAGCCTTGTCTGTTCTCTACGATGGCGGGATGGGCTTTGGAGACGTTGTCAATTTGATTGTCTACAGCAA  
GACGGCAGCCTATCGGTGGCAGCCTCCTGCATCGCATGATTCGCGGCCAGCGACCGAGCTGATGGAGAAATTCGA  
GAAATCCTGCGTCTGAAACCTACGCAACGGGTTTTCTCTGCGGACCTTGTACAGAAACGACAAGGCCAACCAGC  
CAGGAGAAACCCGCATCCCATGGCGAAGCTGTAGACGGATGCCCGGCCCGGATAGAGCTCCGCCGGGTACCGGTCC  
TTGATCAGGGCCACCAGTTGGGGCCCGCGATGCCGGCGGGGACCAGGCGGTGAGGATCGCGCCGTAGACGGCA  
GGCATGACCCGAGCGCCGAACATGTCGAGCAGCAACGCGGGCATGGTTCCGAAACCGCCCGCTCGCAGAGGAGC  
ACGTAGCAGACCAGCGGGCAAGTGCAGGGGAGAGTCGGTGCATCAGAAGCACGAACGCCAGGAACTGCGA  
GCCGAGGATCAGCCTGAAGTCTCGGGCCGGCCGATCCGGTCCGAGAGTCCCCCCAGAAAAACCTGCCGACCCCG  
TTGAACAGTGAATGGTTCGCAATCAGGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC  
GTAATCATGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA  
AAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCCGCTTTCAGTC  
GGGAAACCTGTGTCGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTGGGGCGCTCT  
TCCGTTCTCGCTACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGTCCGGCGAGCGGTATCAGCTACTCAAAGGCGGT  
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAAGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA  
CCGTAATAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAA  
GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCT  
GTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCTTCCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCT  
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGC  
TGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTGTTCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT  
AAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGA  
AAACTCAGTAAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTGGGGTGGGCGAAGA  
ACTCCAGCATGAGATCCCCGCGTGGAGGATCATCCAGCCCTGATAGAAACAGAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAA  
CACCATCATACTAAATCAGTAAGTTGGCAGCATACCCGACGCACTTTGCGCGAATAAATACCTGTGACGGAAG  
ATCACTTCGAGAATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGA  
GACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTA  
TCGAGATTTTCCAGGAGCTGATAGAAACAGAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAAACCCATCATACTAAATCAGTAAG  
TTGGCAGCATACCCGACGCACTTTGCGCCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCGAGAATAAATAAATCC

TGGTGTCCCTGTTGATACCGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGT  
TCCAACTTTACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTCTTTGGC  
ATCGTCTCTGCCTGTCCCTCAGTTCAGTAATTTCTCGATTTGCCTGTTTCCAGTCGGTAGATATCCACAAAACAG  
CAGGGAAGCAGCGCTTTTCCGCTGCATAACCCTGCTTCGGGGTATTATAGCGATTTTTTCCGGTATATCCATCCTTTT  
CGCACGATATACAGGATTTTGCCAAAGGGTTCGTGTAGACTTTCTTGGTGTATCCAACGGCGTCAGCGGGGCAGGA  
TAGGTGAAGTAGGCCACCCGCGAGCGGGTGTCTTCTTCACTGTCCCTTATTTCGCACCTGGCGGTGCTCAACGGG  
AATCTGCTCTGCGAGGCTGGCCGGTACCGCCGGCGTAACAGATGAGGGCAAGCGGATGGCTGATGAAACCAAG  
CCAACCAGGAAGGGCAGCCACCTATCAAGGTGACTGCCTCCAGACGAACGAAGAGCGATTGAGGAAAAGGCG  
GCGGCGCCGGCATGAGCCTGTCCGCTACCTGCTGGCCGTCGGCCAGGGCTACAAAATCACGGGCGTCTGGACT  
ATGAGCACGTCCGCGAGGGCGTCCCGGAAAACGATCCGGAAGCCAACTTTATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGA  
AATCTCGTATGGCAGGTTGGGCGTGGTGGTCAATTCGAAACCCAGAGTCCCGCTATTAACGCTTACAATTT  
CAGGTGGCACTTTTGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCT  
CATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGC  
CCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGA  
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC  
AAGAACGTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAA  
GAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC  
GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTACTGCGGCCAACTTACTTCTGA  
CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTACTGCGCTTATCGTTGG  
GAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC  
GAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGCAACAATTGATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT  
GCAGGACCATTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGTGGTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGCTC  
TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG  
GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAGTAAGCGAAAC  
GATCTCATCCTGTCTTGTATCAGATCTTATCCCTGCATCAGATCCTTGGCGCAAGAAAGCCATCCAGTTT  
ACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATCCGGTTCGCTTGTGTCATAAAAACCGCC  
CAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTTTGCGCTTGCCTTTCCCTTGTCCAGATAG  
CCCAGTAGCTGACATTCAGCGGGTACGACCGTTTTCTGCGGACTGGCTTTCTACGTGTTCCGCTTCTTTAGCAGC  
CCTTGCGCCCTGAGTGTGCGGCAGCGTGAAGCTAGCTTATCGCCATTCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGA  
AGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG  
GGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGCGCCAGTGCCCATACCTTCTTCCAGGTGCTCC  
ACCGGGATGAAGCGGAGCGCCGCGGAGTTGACGCAGTAACGCAGCCCCCTTGTCCCGCGCCCGTGGTGAAG  
AGATGCCCCAGGTGGGAGTCGGCTTCTTGGAGCGGACCTCGGTCCGGACCGTGCCGAAGCCGATGTCGGTCTCT  
CCTTACGCTGTTCCGGGCGACCGGCCGGTGAAGCTGGGCCAGCCGGTGCCGGAATCGAACTTGTCCCTGGATGA  
GAAGAGCGGCTCACCGCTGACGATGTCCACATAGAGCCCTTCCGGTGTCTGTTCCAGTAGGTATTGTGAAGGGG  
GGCTCGTCCCCGATTTCTCGTACGCGGTAAGTGCAGCGGAGTGAGGCGCTGCTTCCAGTCTTCTGTCAGAGTATTT  
CTCGTGTATCGTCTCTTTTCTGCTGTTGCGCCGCGGAAGCGGGGGGCTGGCAACAACGCGAGTATCAG  
GCAGGCAACAACAATAACCAGAATCGTCAATGCTCGTGTTCATCTTTTTCCCCGATGTTAAGATTATAGACAATTA  
TCGAGGCATATCCAGTCCGTAGCGCACTCTTCCGGGATGGGCTTTGGAGACGTTGTCAATTTGATTGTCTACAG  
CAAGACGGCAGCCTATCGGTGGCAGCCTCTGCATCGCATGATTCGCGGCCAGCGACCGAGCTGATGGAGAAAT  
CGAGAAATCTGCGCTGTAACCTACGCAACGGGTTTTCTCTGCGGACCTTGTGAGAAACGACAAGGCGAACC  
GACCAGGAGAAACCGCATCCCATGGCGAAGCTGTAGACGGATGCCCGGCCCGGATAGAGCTCCGCCGGGTACCG  
GTCCTTGTACAGGGCCACAGTTGGGGGCCCGCATGCCGGCGGGGACAGGCGGTGAGGATCGCGCCGTAGAC  
GGCAGGCATGACCCGAGCGCCGAACATGTGAGACGAAACGCGGGCATGTTCCGAAACCGCCCGCTGCGAGAG  
GAGCACGTAGCAGACCAGCAGGGCGAAGTGCCAGGGAGAGTCCGTGCGCATCAGAAGCACGAACGCCAGGAACT  
GCGAGCCGAGGATCAGCCTGAAGGTCTCGGGCCGGCCGATCCGGTCCGAGAGTCCCCCAGAAAAACCTGCCGAC  
CCCCTTGAACAGTGAAGTGTGCAATCAGGGTGGCGCCGATCCGCGCCAGGGCCTTTTTCCAGCCCCGACTGG  
CCTCGCCGAGATTTCTG3'

#### 1.4 *E. coli* barcode

1308484:

5'AGATAAAGTTATTATCTGCTTGTGGTGGTGAATGCACTGACCGGCTATAAGGAAAGGCCAAACAAGAACACGGTT  
GCAAAAACCGTGCCCTTAAATATTGAATCTCTATTGAAACACTTTCTTAAATGTCATTTGGCATATTACGAACAATT  
CCGCGTAAAAACGTTCTGTTACGCTAAACCTTATCCAGCAGGCTTTCAAGGATGTAACCATAACTCTGCGAACT  
AGTGTACATTGCGTGTAGCTTTGAGTGGGCAACTTTGTGTACACTTTTGTGTACCCAAAAACAATAATGTGTACCCA  
TTCAATGATACCGACACAAAGCTCAGGAAGGCGCTCGGCAAGAAAAGAGATGATATCGAGATTATTTCTGATTCCG

ACGGGCCCATGGCTAATCCCATGTCAGCCGTTAAGTGTTCCTGTGTCACTCAAATTGCTTTGAGAGGCTCTAAGGG  
CTTCTCAGTGCCTTACATCCCTGGCTTGTGTCACAACCGTTAAACCTTAAAAGCTTTAAAAGCCTTATATATCTTTT  
TTTTCTATAAACTTAAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGATTTATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTT  
AGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGGTTAGTTCGTTAAA  
CATGAGAGCTTAGTACGTTAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACGTACTATCAACAGGTTG  
AACTGCTGATCTTCAGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGATCTTGCGCCGCAAAAATAAAAATGAAGTT  
TTGGAGGCCTCATTTGGTGACGAAATAACTAAGCACTTGTCTCCTGTTTACTCCCCTGAGCTTGAGGGGTCAACATGA  
AGGTCATTGATAGCAGGATAATAACAGTAAAACGCTAAACCAATAATCCAAATCCAGCCATCCCAAATTGGTAGT  
GAATGATTATAAATAACAGTAAACAGTAATGGCCAATAACACCGGTTGCATTGGTAAGGCTCACCAATAATCCCTG  
TAAAGCACCTTGCTCATGACTCTTTGTTTGGATAGACATCACTCCCTGTAATGCAGGTAAGCGATCCCACCACCAGC  
CAATAAAATTAACAGGGAAATCTAACCAACCTCAGATATAACGCTAAAAGGCAAATGCACTACTATCTGCAA  
TAAATTCGAGCAGTACTGCCGTTTTTCGCCCATTTAGTGGCTATTCTTCTGCCACAAAGGCTTGAATACTGAGT  
GTAAAAGACCAAGACCCGCTAATGAAAAGCCAACCATCATGCTATTCCATCCAAAACGATTTTCGGTAAATAGCACCC  
ACACCGTTGCGGGAATTTGGCCTATCAATTGCGCTGAAAAATAAATAATCAACAAAATGGGCATCGTTTTAAATAAA  
GTGATGTACACCGAATTTGATTGCGTCTCAACCCCTACTTCGGTATCTGTATTATCACGTGATTTTTGGTTTCACGGA  
ACAAAACATAAACCAAGGAAAGTGACAATATTTAGCAACGCAGCGATAAAAAAGGACTATGCGGTGAAATCTC  
TCCTGCAAAACCACCAATAATAGGCCCGCTATTAAACCAAGCCAAAACCTTGCCCTAACCAACCGAACCACTTAC  
GCGTTGAGAAGCTGAGGTGGTATCGGCAATGACCGATGCCGCGACAGCCCAAGTAGCTCCTGTGATCCCTGAAAGC  
AAACGGCCTAAATACAGCATCCAAAGCGCACTTGAAAAAGCCAGCAATAAGTAATCCAGCGATGCGCCTATTAATGA  
CAACAACAGCACTGGCGCCGACCAAATCGGTGACACATTTTTCCAAGCCAAGGAGCAAAGATAACCTGCATTAACG  
CATAAAGTGCAAGCAATACGCCAAAGTGGTTAGCGATATCTCCGAAGCAATAAATTCACGTAATAACGTTGGCAAG  
ACTGGCATGATAAGGCCAATCCCATGGCATCGAGTAACGTAATTAACCAATGCGATCTTTGTCGAACTATTCATTTCA  
CTTTCTCTACTGATAGGGAGTGGGAAAATAACTCTATCAATGATAGGGTGTCAAATCGATGGCCCCCGATGGT  
AGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTG  
GGCCTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGT  
TGCGAAGCAACGCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGC  
CATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTTGCGTCTCAACCCCTACTTCGG  
TATCTGTATTATCACGTGATTTTTGGTTTCACGGAACCAAAACATAAACCAAGGAAAGTGACAATATTTAGCAACG  
CAGCGATAAAAAAGGACTATGCGGTGAAATCTCTCCTGCAAAACCACCAATAATAGGCCCGCTATTAACCAAGC  
CCAAAACCTTGCCCTAACCAACCGAACCACTTACGCGTTGAGAAGCTGAGGTGGTATCGGCAATGACCGATGCCG  
GACAGCCCCAGTAGCTCCTGTGATCCCTGAAAGCAAACGGCCATAAATACAGCATCCAAAGCGCACTTAAAAAGCCA  
GCAATAAGTAATCCAGCGATGCGCCTATTAATGACAACAACAGCACTGGGCGCCGACCAAATCGGTGAGACATTTTT  
CCAAGCCAAGGAGCAAAGATAACCTGCATTAACGCATAAAGTGCAAGCAATACGCCAAAGTGGTTAGCGATATCTTC  
CGAAGCAATAAATTCACGTAATAACGTTGGCAAGACTGGCATGATAAGGCCAATCCCATGGCATCGAGCAACGTA  
ATTACCAATGCGATCTTTGTCGAACTATTCATTTCACTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGGAAAATAACTCTATCA  
ATGATAGGGTGTCAAATCGATGGCCCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCA  
TCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGCCCTTCGTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAG  
TAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCC  
ATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCTTGC  
ATGCTGCAAGTCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGTGGAAGGATAGTATGGGTGTCA TAGGGCGGGAGGGA  
GTGTGTGTAGAATATAGGTGTGGGAGGTGGCGGGAGTGCTTATGGGAATTTGATGTGAAGGGTAAGAGGGCG  
GAGGGGAAGCTGTTTTGAAATTTGGGAGCGAGTTGGGATTACAGGGAGGGGAAGGTGGCGAGAGAAAGCGGAGG  
ATCTATGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTCATGTTTGACAGCTTACTACTGATCAGTGAATTAATGGCGATGA  
CGCATCCTCACGATAATCCGGGTAGGCGCAATCACTTTCTGCTCTACTCCGTTACAAAGCGAGGCTGGGTATTTCC  
CGGCCTTTCTGTTATCCGAAATCCACTGAAAGCACAGCGCTGGCTGAGGAGATAAATAAACGAGGGGCTGTA  
TGCACAAAGCATCTTCTGTTGAGTTAAGAACGAGTATCGAGATGGCACATAGCCTTGTCAAATTTGGAATCAGTTTT  
GTGCCAATACCAGTAGAAACAGACGAAGAAGCTAGAGGTGAATCACGACAAAGCGTATCAAAAACGTATGGAGTA  
GGGCTCTAACTCTGTATAAAAAGTTTCCAGCTAGCTGATAACGGGAAAGAAACAGAGAAGGGCACAAATATTGTG  
TACTTTAATGTGCCCTTAATTTATTGATTGGTGGTTGAATTGTCCGTAACTTTTTGATTTAAGTGCAATTTCTAATAA  
ATTAGAACACTTTCTAAATGTTTTCACTGAAACGTGTTTATAGACTCCTGCCGCTACGTACGGGTGAGCATCGGCCCA  
GGCCTGAGCTGCTTCCAGCGATTCAAATTCAGCAATAACGGTTGAGCCAGTAAATCCCGCAGCCCTGGATCGTTAC  
TGTCTACCGCTGGCATTGGACCAGCTGTCAACAAACGACCTTCATCATGCAGTAACTGTAACGTGCTAAATGTGCCG  
GACGAACGGAAAGGCGTTTTTCGAGGCTATCAGCTTTGCTTGTGAGCGTAAATAACATACAACACGGGCACAACCTCT  
TGTTCCGGGAAAGTTGTAAGTACGTTATTTGAAAGGGCGAAGATCTGCAACGGAAAGATGATGTCTTTGTTAAGGCC  
ATGCATAAAGTAAGGGTAATTACGCCAAAATGACATTTTCACTGATCCTGATCGTCTTGCCTTATTGAAT3'

---

## 2 Liste der Publikationen und Manuskripte

- ◆ **Dolch, K., Wuske, J. & Gescher, J.(in Vorbereitung)**. Proof of principle for monitoring exoelectrogens in MFCs with wastewater
  
- ◆ **Dolch, K., Danzer, J., Kabbeck, T., Bierer, B., Erben, J., Förster, A. H., Maisch, J., Nick, P., Kerzenmacher, S. & Gescher, J. (2014)**. Characterization of microbial current production as a function of microbe-electrode interaction. *Bioresource Technol*, **157C**, 284–292
  
- ◆ **Ziegler, S., Dolch, K., Asskamp, M., Eusterhues, K., Kriews, M., Wilhelms-Dick, D., Göttlicher, J., Majzlan, J. & Gescher J. (2013)**. Oxygen dependent niche formation in an acidophilic consortium built by Archaea and Bacteria. *ISME J*, **7(9)**, 1725-37
  
- ◆ **Sturm, G., Dolch, K., Richter, K., Rautenberg, M. & Gescher. J. (2012)**. Metal reducers and reduction targets. A short survey about the distribution of dissimilatory metal reducers and the multitude of terminal electron acceptors. *Microbial Metal Respiration*, (49-82). ISBN 978-3642328664.

## 3 Publikationen und Manuskripte

Bioresource Technology 157 (2014) 284–292



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)

## Characterization of microbial current production as a function of microbe–electrode–interaction



Kerstin Dolch<sup>a</sup>, Joana Danzer<sup>b</sup>, Tobias Kabbeck<sup>a</sup>, Benedikt Bierer<sup>b</sup>, Johannes Erben<sup>b</sup>, Andreas H. Förster<sup>a</sup>, Jan Maisch<sup>c</sup>, Peter Nick<sup>c</sup>, Sven Kerzenmacher<sup>b</sup>, Johannes Gescher<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute for Applied Biosciences, Department of Applied Biology, Karlsruhe Institute of Technology, Fritz-Haber-Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany

<sup>b</sup>Laboratory for MEMS Applications, IMTEK – Department of Microsystems Engineering, University of Freiburg, Georges-Koehler-Allee 103, 79110 Freiburg, Germany

<sup>c</sup>Botanical Institute, Molecular Cell Biology, Karlsruhe Institute of Technology, Kaiserstrasse 2, 76131 Karlsruhe, Germany

### HIGHLIGHTS

- Biological and electrochemical analysis of MFC anode material performance.
- Evaluation of a correlation between population and current density.
- Comparison of pure and mixed cultures as biological catalysts.
- Effect of co-culturing on biofilm formation and current production.
- Detailed comparison of *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* MFC performance.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 November 2013

Received in revised form 24 January 2014

Accepted 27 January 2014

Available online 4 February 2014

#### Keywords:

Microbial fuel cell  
*Shewanella oneidensis*  
*Geobacter sulfurreducens*  
 Electrode material  
 qPCR

### ABSTRACT

Microbe–electrode–interactions are keys for microbial fuel cell technology. Nevertheless, standard measurement routines to analyze the interplay of microbial physiology and material characteristics have not been introduced yet. In this study, graphite anodes with varying surface properties were evaluated using pure cultures of *Shewanella oneidensis* and *Geobacter sulfurreducens*, as well as defined and undefined mixed cultures. The evaluation routine consisted of a galvanostatic period, a current sweep and an evaluation of population density. The results show that surface area correlates only to a certain extent with population density and anode performance. Furthermore, the study highlights a strain-specific microbe–electrode–interaction, which is affected by the introduction of another microorganism. Moreover, evidence is provided for the possibility of translating results from pure culture to undefined mixed species experiments. This is the first study on microbe–electrode–interaction that systematically integrates and compares electrochemical and biological data.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

A number of microorganisms are able to transport electrons from the cell surface to an insoluble electron acceptor. This respiratory mechanism has most probably evolved to respire on insoluble minerals like hematite, ferrihydrite or birnessite in anoxic soils or sediments. The low specificity of the electron transfer processes

allows for the bioengineering of exhaustless insoluble electron acceptors in the form of anode materials that can be embedded in microbial fuel cells (MFCs). These MFCs contain anodes to which microbes transfer catabolic electrons, and cathodes at which electrons are transferred to a terminal electron acceptor. The applied research on MFCs progresses in various directions including the integration of anodes in the waste water treatment process as a tool for carbon elimination or in bioreactors as an enabling technology for unbalanced fermentations (Flynn et al., 2010).

All MFC applications share the necessity to establish optimal microbe–electrode–interactions allowing for high turnover rates and the construction of low-priced MFCs. A key to reduce costs is the introduction of cost-efficient electrode materials that can be produced in large quantities. A number of publications describe the usage of carbon materials with different configurations

\* Corresponding author. Tel.: +49 721 608 41940; fax: +49 721 608 41941.

E-mail addresses: [kerstin.dolch@kit.edu](mailto:kerstin.dolch@kit.edu) (K. Dolch), [joana.danzer@imtek.uni-freiburg.de](mailto:joana.danzer@imtek.uni-freiburg.de) (J. Danzer), [kabbeck@gmx.de](mailto:kabbeck@gmx.de) (T. Kabbeck), [bbierer@web.de](mailto:bbierer@web.de) (B. Bierer), [johannes.erben@imtek.uni-freiburg.de](mailto:johannes.erben@imtek.uni-freiburg.de) (J. Erben), [andreas.foerster@kit.edu](mailto:andreas.foerster@kit.edu) (A.H. Förster), [jan.maisch@kit.edu](mailto:jan.maisch@kit.edu) (J. Maisch), [peter.nick@kit.edu](mailto:peter.nick@kit.edu) (P. Nick), [kerzenma@imtek.uni-freiburg.de](mailto:kerzenma@imtek.uni-freiburg.de) (S. Kerzenmacher), [johannes.gescher@kit.edu](mailto:johannes.gescher@kit.edu) (J. Gescher).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.112>

0960-8524/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

including carbon paper, cloth, felt, mesh or brushes. However, a systematic comparison of materials with different characteristics is mostly lacking and it is not possible to compare current densities from different studies since the experiments were mostly not conducted under similar conditions (Logan, 2009). Furthermore, the biological context has only been rarely considered. The use of MFCs for applied processes demands stable microbe–electrode–interactions. This is particularly important since most applications will require hydrodynamic flow to provide substrates or to remove products. Hence, stable biofilms of exoelectrogenic microorganisms are necessary. This aspect of biofilm formation as key for anode performance has been mostly overlooked. Therefore, a systematic characterization of microbe–electrode–interaction and the impact of this interaction on the performance of MFCs was conducted. Strains and anode materials were compared using a measurement routine that was based on (I) the time that the microbes needed to establish a constant anode potential in an initial galvanostatic step and (II) the ability of the microbes to sustain a current gradient. The results were correlated with the density of biological material on the anodes. *Geobacter sulfurreducens* was superior over *Shewanella oneidensis* in anode reduction although it reduced under the tested conditions ferric citrate slower. The specific surface of the materials was key to anode performance but did not linearly correlate to limiting current densities. Interestingly, the biofilm behavior of the organisms changed in mixed species experiments. Last but not least, this study provides evidence for the possibility to choose a suitable anode material for field applications by using laboratory experiments with pure cultures of exoelectrogenic organisms.

## 2. Methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*S. oneidensis* MR-1 and *G. sulfurreducens* PCA (DSM12127) were cultured at 30 °C in a minimal medium which was developed based on compositions published by Coppi et al. (2001) and Holmes et al. (2004). The medium contained 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM KCl, 6 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 21 mM HCO<sub>3</sub>Na, 5 mM CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>, 20 mM sodium lactate, 10 mM sodium acetate, 0.2 mM of sodium ascorbate, 5.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 ml of NB trace mineral solution (Coppi et al., 2001), 1.0 ml selenite–tungstate solution [13 mM NaOH, 17 μM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, and 12 μM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>], 10 ml vitamin solution (German Type Culture Collection, DSMZ, media 141), 0.1% (w/v) yeast extract, and 1 mM cysteine. Prior to autoclaving, all anoxic media were boiled and thereafter purged from oxygen for 30 min with a mixture of 80% N<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub>. Thereafter, pH was adjusted to 7.2. For comparative growth experiments, 40 mM ferric citrate was added as electron acceptor. Prior to MFC experiments, microbial strains were pre-grown in the above described minimal medium containing 40 mM disodium fumarate, 10 mM NaNO<sub>3</sub>, and 1 mM ferric citrate. No electron acceptors were added to the medium in MFC experiments.

### 2.2. MFC setup and electrochemical measurements

MFCs were operated in a two-chamber setup adapted from previous work (Kloke et al., 2010) (Fig. A1). A Fumapem F-950 membrane (Quintech, Göppingen, Germany) was used to separate the anode chamber from a saturated calomel reference electrode (SCE) (Sensortechnik Meinsberg GmbH, Ziegra-Knobelsdorf, Germany) and the cathode chamber, which was filled with 25 ml of buffer containing 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM KCl, 68 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 ml of NB trace mineral solution, 1.0 ml selenite–tungstate solution, and 0.2 mM sodium

ascorbate. Cathodes were continuously purged with air. Potentials measured at the working electrode against SCE were converted to normal hydrogen electrode (NHE) potentials by addition of 241 mV. The anode chamber was filled with 25 ml of anoxic minimal medium. The whole compartment was flushed continuously with an 80% N<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> mixture to maintain a constant anoxic environment with a stable pH. The optical density of the bacterial culture was measured at 655 nm, and the starting cell density in the anodic chamber was 0.3. Lactate (0.4 mmol) was added to MFCs inoculated with *S. oneidensis* every 48 h to avoid limitations of electron donors. All MFC experiments were conducted at least in independent triplicates and at a constant temperature of 30 °C.

Three different materials were tested as anodes. Graphite foil (0.254 mm thick) was purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), graphite felt GFD2 EA (2 mm thick) from SGL Group, Carbon Company (Meitingen, Germany), and activated carbon cloth C-Tex 13 from Mast Carbon International Ltd. (Hampshire, United Kingdom). Material characteristics are described in detail in Kipf et al. (2013). Prior to usage, the electrodes were first rinsed with isopropanol and thereafter autoclaved in deionized water. The electrodes were connected via platinum wires (0.1 mm; Chempur, Karlsruhe, Germany) to a potentiostat (Pine Instruments, Grove City, USA).

The standard measurement protocol was modified after Golitsch et al. (2013) and consisted of two phases. First, a constant current of 222.22 nA cm<sup>-2</sup> was applied in a galvanostatic conditioning period until the measured anode potential reached a stable value. In the second phase (current sweep phase), the current was constantly increased with a rate of 3.24 nA s<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>. Current densities at 41 mV vs. NHE were used to compare anode performance of the two organisms on the three tested materials.

### 2.3. Mixed sewage MFCs

MFCs inoculated with sewage sludge were operated similarly, differing only in inoculum and volume. The anode and cathode chambers were filled with 40 ml of the above-mentioned medium and inoculated with 1 ml of a 4:1 mixture of material from an anaerobic digester and activated sludge. Both were obtained from the municipal waste water treatment plant “Kläranlage Untere Elz” in Teningen, Germany. The electrochemical measurements were performed as described above using a potentiostat (1470E, Solartron Analytical, Farnborough, United Kingdom).

### 2.4. Measurement of electrode double-layer capacitance

The double-layer capacitance of the used electrodes was determined by running current sweeps without inoculation. Assuming, that close to the open circuit potential no faradaic current is produced, the measured potential drop can be related to the behavior of a (dis)charging capacitor according to:

$$\Delta U = \frac{1}{2vC} I^2 \quad (1)$$

Herein  $C$  is the capacity in Farad,  $v$  represents the current sweep rate in A s<sup>-1</sup>,  $I$  is the current in Ampere, and  $\Delta U$  the potential with respect to the open circuit potential in Volt. The electrodes capacitance can now be obtained using 3.24 nA s<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> as sweep rate and fitting the function to the measured values for  $\Delta U$  and  $I$ .  $\Delta U$  was calculated as the difference between the open circuit potential and the measured potential during the current sweep.

The capacitance obtained for C-Tex 13 was measured in triplicate and is 3.56 F ± 0.29 F for the whole electrode (2.25 cm<sup>2</sup>). Calculated according to Kipf et al. (2013) the relative capacitance results in 12 μF cm<sup>-2</sup> BET surface.

Due to the much smaller specific surface of graphite felt and graphite foil, their capacitance is three orders of magnitude lower.

This renders the capacitive contribution to the total current almost negligible compared to the faradaic part. Nevertheless, measured average values of 6.9 mF for graphite felt and 12.6 mF for graphite foil were used for the correction.

### 2.5. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Whole anodes were fixed for 4 h at 4 °C in PBS buffer containing 4% formaldehyde. Thereafter, anodes were washed for 30 min at 4 °C in PBS and then treated with 80% and 70% ethanol for 1 min, respectively. To improve permeability, 0.1 M HCl were applied for 1 min and thereafter anodes were dried. Hybridizations were performed at 46 °C for 2 h in a moist atmosphere containing appropriate formamide concentrations (Table 1). The hybridization solution consisted of 5.4 mM HCl, 0.12 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, and appropriate concentrations of formamide. Furthermore, 6.67 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$  fluorescently labeled oligonucleotides, and, if necessary, the same concentration of helper oligonucleotides were added (Table 1). Thereafter, the anodes were first rinsed with the washing solution, and then incubated for 15 min in the washing solution at 48 °C. This solution consisted of 1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.25 mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS, and appropriate concentrations of NaCl (46 mM for *S. oneidensis* and 215 mM for *G. sulfurreducens* hybridizations, respectively). Thereafter, anodes were rinsed with deionized water and incubated for 15 min in SSC buffer [75 mM NaCl, 7.5 mM  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ , pH 6.0]. Afterwards, samples were dried at 37 °C and counterstained with SYTO 45 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Images were recorded by widefield fluorescence either at an AxioImager Z1 (Zeiss, Oberkochen, Germany) using a 40 $\times$  water immersion lens and a cooled digital CCD camera (AxioCam MRm, Zeiss) or a Leica DM 5500 B microscope using a 63 $\times$  water immersion lens and a DFC 300 FX digital color camera from Leica (Wetzlar, Germany). With the Zeiss microscope the filter sets 38 HE (excitation at 470 nm, beam splitter at 495 nm and emission at 525 nm), 43 HE (excitation at 550 nm, beam splitter at 570 nm and emission at 605 nm), and 47 HE (excitation at 436 nm, beam splitter at 455 nm and emission at 480 nm) were used for FITC, Cy3, and SYTO 45, respectively. For the Leica microscope, the filter sets L5 (excitation filter 480/40 and suppression filter 527/30) and Y3 (545/30 and 610/75) were used for FITC and Cy3, respectively. Picture-stacks were assembled using the software tool ImageJ (Rasband, 1997–2004).

### 2.6. Extraction of DNA

After completion of the MFC program, anodes were cut into two pieces and then DNA was extracted using the innuPREP Stool DNA Kit from Analytic Jena (Jena, Germany) according to the manufacturer's instruction. Standard curves were compiled with pure cultures. Therefore, the cells were first counted using a Neubauer counting chamber (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and serial dilutions were prepared in triplicate. From each of the six dilution steps DNA was extracted according to the manufacturer's instructions.

### 2.7. Quantitative PCR (qPCR)

Strain-specific primers were designed with the software tool Beacon Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, USA) to quantify the abundance of *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* in the anodic chambers via qPCR (Table 2). All qPCR reactions were developed in a CFX96 Cyclor (Bio-Rad, Munich, Germany) using white polypropylene thin-walled plates (4titude Wotton, United Kingdom) and adhesive qPCR seal (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The reaction volume of 20  $\mu\text{l}$  was chosen according to the DyNAMO Flash SYBR Green qPCR Kit manual (biozym, Hessisch Oldendorf, Germany). The primer concentration was 0.5  $\mu\text{M}$ , and 1  $\mu\text{l}$  of template-DNA was added. The optimal annealing temperature was determined with isolated DNA of the pure strains using a temperature gradient qPCR. All experiments were accompanied by no template controls. All qPCR reactions were verified on a 2.5% agarose gel.

Standard curves were established using biological triplicates and applied on each qPCR plate. On the basis of the standard curves, cell counts of each isolated DNA sample were determined. Cell quantifications of anode samples are based on at least three MFCs. As mentioned before, anodes were split in two pieces, which were independently used for DNA extraction. Hence, two DNA samples were generated per MFC. Quantitative PCR experiments with these samples were conducted in technical triplicates. The cell count per anode was gained by adding the cell count means of the two half anodes.

### 2.8. Analytical measurements and statistical analysis

Lactate and acetate concentrations were quantified via HPLC according to Kipf et al. (2013). Ferrous iron concentrations were determined according to Ruebush et al. (2006). Statistical analysis was conducted using SPSS (IBM, Ehningen, Germany). All data sets were normally distributed. An unpaired *t*-test was used to determine significance of the data. The level of significance was set to 5%.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Establishing a growth medium

The main goal of this study was to analyze the performance of MFCs as a function of microbial activity and microbe–electrode-interaction. A byproduct of this analysis was a direct comparison of the two exoelectrogenic model organisms *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens*. The first milestone that had to be reached was to establish one medium that would support growth of both organisms to a highly similar extent to circumvent artifacts caused by differential responses of the two model organisms to the medium. The bicarbonate buffered medium contained a mixture of lactate and acetate as carbon and electron sources. Reduction of ferric citrate was used as readout to assess growth. Ferric iron reduction rates varied to a minor extent between the two strains (Fig. 1). Of note, *S. oneidensis* was catalyzing extracellular electron transfer

**Table 1**  
Fluorescently labeled oligonucleotide probes and helper oligonucleotides used for *in situ* hybridization experiments.

Probe	Target	Sequence (5'–3')	Specificity	Source or reference	FA [%]
SHWE227	16S rRNA	AGC TAA TCC CAC CTA GGT WCA TC	<i>Shewanella</i> spp.	Huggett et al. (2008)	40
Geo2	16S rRNA	GAA GAC AGG AGG CCC GAA A	<i>G. sulfurreducens</i>	Richter et al. (2007)	20
HGEO2-1	Helper probes for GEO2	GTC CCC CCC TTT TCC CGC AAG A		Richter et al. (2007)	
HGEO2-2	Helper probes for GEO2	CTA ATG GTA CGC GGA CTC ATC C		Richter et al. (2007)	

**Table 2**  
Sequences of primers used for real-time PCR experiments.

Probe	Sequence (5'–3')	Usage
S.o. SYBR GREEN for	TAT TCA AGT GCT TCT ATT AG	Quantification of <i>S. oneidensis</i> cells
S.o. SYBR GREEN rev	AAG AAC TTC TAC TCA ACA	
G.s. SYBR GREEN for	TCT GGT TTA TGG AAG AAG TTT GG	Quantification of <i>G. sulfurreducens</i> cells
G.s. SYBR GREEN rev	TGT TAA AGG TCT GAT GTG TGA GA	

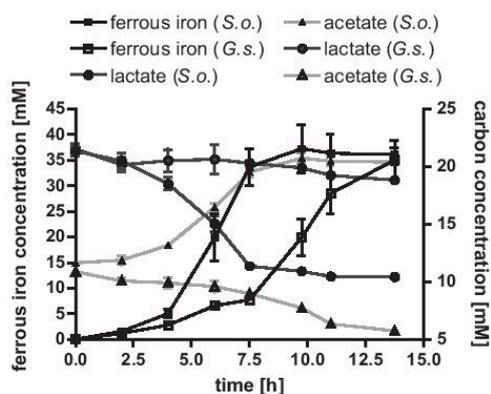
under these ferric iron-reducing conditions faster than *G. sulfurreducens* [ $1.28 \pm 0.17$  vs.  $1.86 \pm 0.25$  mM  $\text{Fe}^{2+}$   $\text{h}^{-1}$ ].

Ferric citrate was added in concentrations (40 mM) that were limiting with respect to the abundance of electron donors. As expected, *S. oneidensis* used only lactate as carbon and energy source (Yoon et al., 2013).  $10.9 \pm 0.3$  mM lactate were consumed and converted to  $8.8 \pm 0.2$  mM acetate and biomass. This indicates an anabolic substrate usage of 2.1 mM, which equals to 19%. Concomitantly, 37 mM ferric citrate were reduced to  $\text{Fe}^{2+}$ , indicating a release of roughly 4 mol electrons per mol of catabolically consumed lactate. These electrons most probably stem from the oxidation of (I) lactate to pyruvate, and (II) formate to  $\text{CO}_2$  (Scott and Neelson, 1994). Under the same conditions, *G. sulfurreducens* oxidized  $5.1 \pm 0.3$  mM acetate and  $2.7 \pm 0.6$  mM lactate. Without labeling studies it is neither possible to determine the primary electron donor nor to what extent it was used for the buildup of biomass or catabolism. However, it is known, that *G. sulfurreducens* can couple the reduction of ferric iron to the oxidation of acetate (Caccavo et al., 1994) and lactate (Call and Logan, 2011). What can be extracted from this data is, that *G. sulfurreducens* cells pre-adapted to this medium containing both electron donors, consumed lactate and acetate simultaneously.

Taking together, the established medium allowed reduction of a colloidal but cell-impermeable electron acceptor by *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* with similar rates, which was of outmost importance for following experiments.

### 3.2. Galvanostatic conditioning

MFC experiments were started by applying a constant but low current of  $222.22 \text{ nA cm}^{-2}$  and the decrease of anode potential was followed over time. The time until a constant potential was



**Fig. 1.** Growth curves of *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* in the established basic anaerobic medium. Experiments were conducted in quadruplicates. Error bars indicate standard deviation. Ferrous iron concentrations are indicated by squares. Circles and triangles show lactate and acetate concentrations, respectively. *S. oneidensis* data sets are indicated by closed symbols, whereas *G. sulfurreducens* data is marked by open symbols.

reached was referred to as *conditioning period*. Interestingly, this period varies with the tested anode materials as well as with the microbial strains used. These differences in length of the conditioning periods could reflect the ability of the cells to establish an initial and stable interaction with the electrode material. This interaction is most probably dependent on the capability of the cells to conduct electron transfer onto the anode surface as well as to some extent on their ability to establish a biofilm on the anode material. Biofilm formation will be more important for *G. sulfurreducens*, since previous studies established the necessity of direct contact between *Geobacter* cells and the insoluble electron acceptor (Nevin and Lovley, 2000). In contrast, growth of *S. oneidensis* under batch conditions leads to the release of flavin molecules that can be used as mediators for electron transfer between cell and anode surface (Marsili et al., 2008).

Three graphite based anode materials were tested that had been previously characterized in detail and show a large variation in terms of porosity and specific surface area (Kipf et al., 2013). On the macroscopic scale, graphite felt ( $60 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) and C-Tex 13 ( $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) comprise fabrics of varying three dimensional properties, while graphite foil can be approximated as a two dimensional material. As indicated in Fig. 2, the two tested organisms show an extreme variation in the conditioning period. On graphite foil, *S. oneidensis* needs 162 h to establish a potential of  $-97$  mV, while *G. sulfurreducens* cells need only 8 h to trigger the potential to a thereafter constant value of  $-229$  mV. From all three materials tested, graphite felt seems to be the most suitable for an interaction with *S. oneidensis*. Within 33 h, the potential of the anode dropped to  $-210$  mV, which is close to the  $-241$  mV that can be gained in MFCs inoculated with *G. sulfurreducens* in 11 h. On C-Tex 13, the material with the highest surface per weight ratio, *Geobacter* cells establish within 17 h a potential of  $-238$  mV and are thereby 10 times faster compared to *S. oneidensis*. Nevertheless, *Shewanella* cells at least lowered the anode potential to  $-234$  mV.

The final potential of the conditioning period will be dependent on the redox potential of the enzymes or shuttles that conduct terminal electron transfer. Outer membrane cytochromes expressed by both organisms under anode reducing conditions as well as flavins have midpoint or redox potentials within this range (Marsili et al., 2008; Hartshorne et al., 2007; Lloyd et al., 2003). Along these lines, it is interesting to note that *S. oneidensis* was not capable of adjusting the anode potential to values below  $-200$  mV if graphite foil was used as electron acceptor. This could be due to the surface properties that might prevent sufficient biofilm formation. Alternatively, there is evidence for a function of released flavin molecules as electron shuttles (Marsili et al., 2008). Hence, the reduced hyperpolarization of the anode could indicate that the interaction of flavins with the material might also be hampered.

It was expected that the coverage of anodes with cells in conjunction with the electrodes double-layer capacitance would play an important role for the duration of the conditioning period. Hence, increased surface area should result in longer conditioning times. With exception of the interaction between graphite foil and *S. oneidensis*, indeed conditioning times rise with material surface area. Nevertheless, at least for *Geobacter*, the differences in conditioning time do not directly reflect the differences in surface area of the materials that are by far more pronounced. This is most

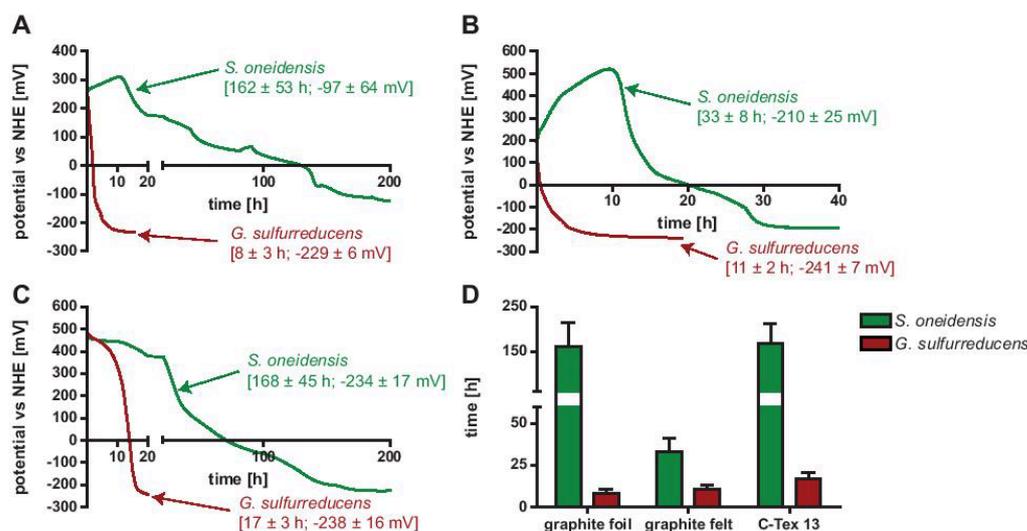


Fig. 2. Galvanostatic conditioning. Conditioning periods at  $222.22 \text{ nA cm}^{-2}$  for *S. oneidensis* (green) and *G. sulfurreducens* (red). Graphs show one example of the six independently conducted experiments. Numbers indicate average conditioning period duration and final potentials. Standard deviations are given. (A) Graphite foil, (B) graphite felt, and (C) C-Tex 13. (D) Overview of the time needed for establishing a constant potential for each material and strain.

probably due to the fact that only a certain amount of the material is accessible for the bacterium while a large proportion will be buried within the fabric. This part is not only inaccessible but most probably even insulated from the surrounding medium by the bacterial biofilm. Compared to *G. sulfurreducens*, *S. oneidensis* shows more prominent differences in conditioning time between graphite felt and C-Tex 13. As will be shown in Section 3.4, coverage of the material with *S. oneidensis* biofilms is rather low. Hence, shuttling compounds will most probably be important for electron transfer. This was also shown in previous reports in which it was concluded that 70% of the *S. oneidensis* electron transfer to anode surfaces is being conducted by flavin molecules that shuttle electrons between planktonic cells and the anode (Marsili et al., 2008). Hence, in contrast to what was mentioned regarding the interaction of *G. sulfurreducens* with the anode materials, *S. oneidensis* is not able to cover the surface confluent and more anode material will be available for the small shuttling compounds. This might explain why the conditioning period of *S. oneidensis* on C-Tex 13 is five times as long as on graphite felt.

In conclusion, although *S. oneidensis* shows faster ferric iron reduction in the established growth medium, *G. sulfurreducens* is able to adapt faster to the reducing conditions at the anode.

### 3.3. Current sweep experiments

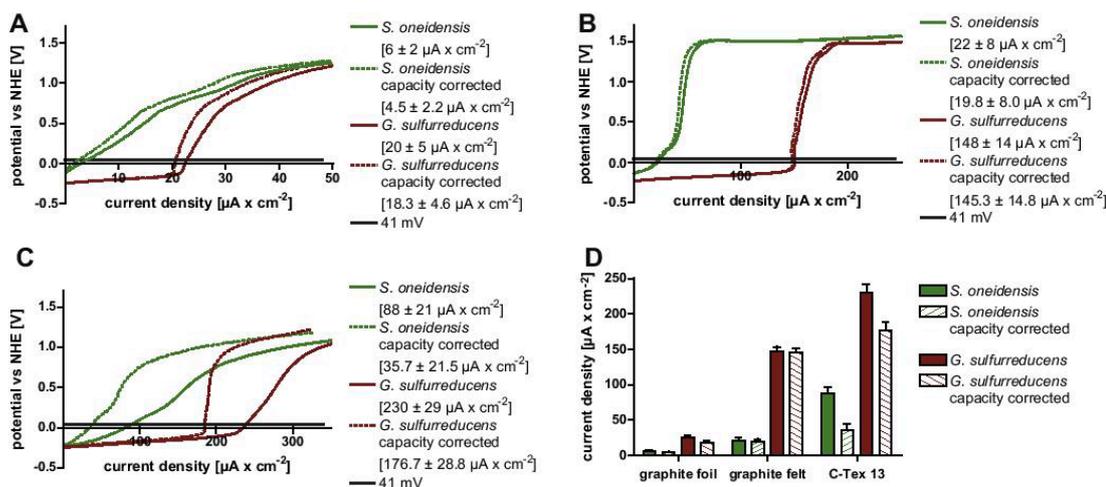
Current sweep experiments were conducted as a second step following the conditioning period. Thereby, it was possible to observe changes of anode potential as a function of applied current density starting from one homogenous starting potential. MFCs with *S. oneidensis* inoculated graphite foil showed a more positive starting potential and certainly represent the exception. Besides a similar initial starting point regarding the anode potential, it was thereby also possible to compare the respiratory electron transfer rates irrespective of potential initial limitations or differences of microbe–electrode-interactions. Current densities determined at a potential of 41 mV were used to compare the performance of the two strains on the three materials. This value was chosen since MFCs inoculated with the two strains did not show uniform curve

progression and since the results were best comparable at this value (Fig. 3). At a certain point, all curves migrate with steep slopes to potentials higher than 1 V, which is due to abiotic water cleavage on the anodes to sustain the current draw. At lower current densities, *G. sulfurreducens* exhibit slower electrode polarization compared to *S. oneidensis*. One potential reason for this difference could be that *S. oneidensis* cells conduct electron transfer mostly via electron shuttles. Hence, the traveling distance for the electrons will be longer, which results in higher polarization losses. In contrast, the only mode of electron transfer for *G. sulfurreducens* is direct contact, which is more efficient and hence resulting in lower polarization. Especially when using high surface materials as C-Tex 13, capacitive current can account for a large proportion of the performance. To make sure, that performance is clearly related to microbial activity and not to the discharging of a capacitor, obtained polarization curves were corrected from the contribution of the double-layer capacitance of the materials by subtracting the capacitive current according to Eq. (1).

For both strains, a connection between available surface area and current density is evident. *S. oneidensis*, as well as *G. sulfurreducens* showed ascending performance from graphite foil over graphite felt to C-Tex 13. Apparently, the area of available surface determines to a certain extent the number of electron transfer processes per time. In all cases, *Geobacter* cells sustained current densities that were 4–7.3 times higher compared to *S. oneidensis*. It should also be mentioned that the amount of residual substrates was quantified after each current sweep experiment using HPLC analysis. These experiments indicated that electron donor limitation was not observable during the current sweeps (data not shown).

### 3.4. Anode population

So far, the conducted MFC experiments lead to electrochemical data, but do not provide sufficient evidence to conclude whether population density on anodes is the limiting factor for MFC performance, or whether the ability of the cells to conduct electron transfer onto the anodes might also vary between different



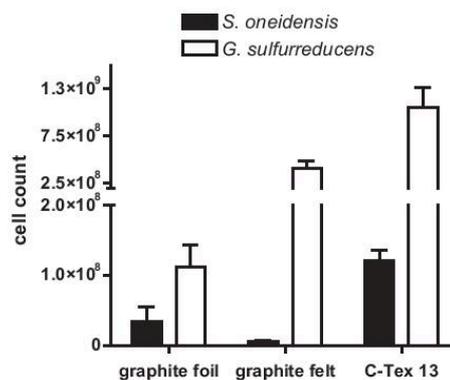
**Fig. 3.** Current sweep experiments. Current sweep experiments with ascending currents of  $3.24 \text{ nA s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  for *S. oneidensis* (green) and *G. sulfurreducens* (red). Graphs show one example of the six independently conducted experiments. Numbers indicate average current density values at 41 mV. Standard deviations are given. Dashed lines indicate capacitance corrected curves. (A) Graphite foil, (B) graphite felt, and (C) C-Tex 13. (D) Comparison of the current densities at 41 mV. Capacitance corrected values are marked with stripes.

carbon-based anode materials. Hence, the population density after current sweep experiments was assessed using two independent methods. As suggested by Yates et al., PCR dependent and independent analyses were used concomitantly to avoid artifacts (Yates et al., 2012). First, FISH was conducted. In previous studies, the anodic population was visualized by embedding whole anodes in a matrix for subsequent cryostat sectioning (Okabe et al., 1999). In the current study, a new protocol was established, that circumvents time consuming and artifact-prone embedding and slicing. As indicated in Fig. A2A–F, it is obvious that the amount of *G. sulfurreducens* cells on the anode surfaces increases in the order graphite foil, graphite felt, C-Tex 13. Hence, the material with the highest surface area seems to be colonized with the highest amount of cells. Overall, *G. sulfurreducens* forms denser biofilms on the materials if compared to *S. oneidensis*. The latter seems to colonize all materials with less than 10% of the cells that can be seen in *G. sulfurreducens* samples. Moreover, it is hard to judge which of the materials has been covered by the most amount of cells. Hence, qPCR was established as a method to quantify cells that were bound to the anode materials.

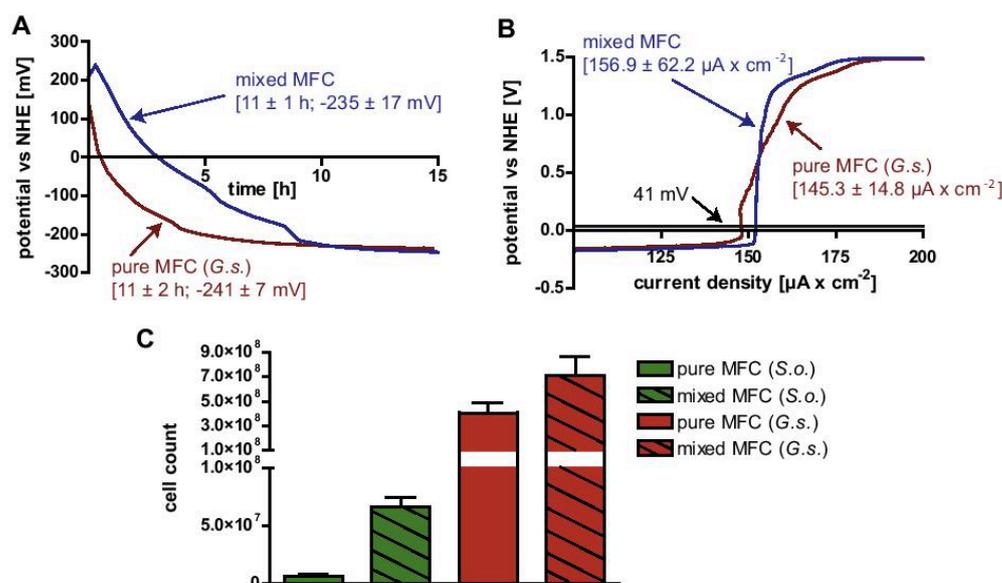
Again, the total amount of sessile *G. sulfurreducens* cells increased with increasing available surface area (Fig. 4). On C-Tex 13  $1.05 \cdot 10^9 \pm 3.59 \cdot 10^8$  cells could be detected, whereas only 39% and 11% of this cell number were found on graphite felt and graphite foil, respectively. It is interesting to compare these cell numbers with the current density values at 41 mV obtained in the current sweep experiments. Here, C-Tex 13 was indeed the material that allowed the best performance, followed by graphite felt and graphite foil. Nevertheless, the progression of the decreasing current density values is not parallel to the decreasing cell numbers, since MFCs with graphite felt and graphite foil as anode materials showed current densities at 41 mV of 82% and 10%, respectively as compared to C-Tex 13. Hence, either the kinetics of electron transfer from cell to anode surface is hampered on C-Tex 13 compared to graphite felt and/or there is a certain percentage of physiologically inactive or less active cells on this material. A comparison of the *S. oneidensis* cell quantification with *G. sulfurreducens* verifies the impression of the FISH experiments, since graphite foil is only

populated by 31.2%, graphite felt by 1.4%, and C-Tex 13 by 11.6% of what was observed for *G. sulfurreducens*.

Standard deviations were consistently higher in the *S. oneidensis* experiments. This again indicates the importance of flavin driven electron transport for *this organism*. The cells do not have to be localized to the anode in order to thrive via extracellular electron transfer. Therefore, localization is expected to be more flexible for *S. oneidensis* compared to *G. sulfurreducens*. Of note, this might give a direction for an optimization of *S. oneidensis* strains for fuel cell applications. The aim could be to develop strains with similar biofilm producing properties as *G. sulfurreducens*. This idea was followed in experiments conducted by Lin et al. who embedded *S. oneidensis* on anodes in a PMBVF/PVA hydrogel (Lin et al., 2012). Moreover, it is known that several molecular factors are involved in biofilm formation. Hence, strain design by genetic



**Fig. 4.** Anode population. Graph displays the number of sessile *S. oneidensis* (black bars) and *G. sulfurreducens* (white bars) cells on the different materials as determined by qPCR. Experiments were conducted in triplicates. Error bars indicate standard deviation.



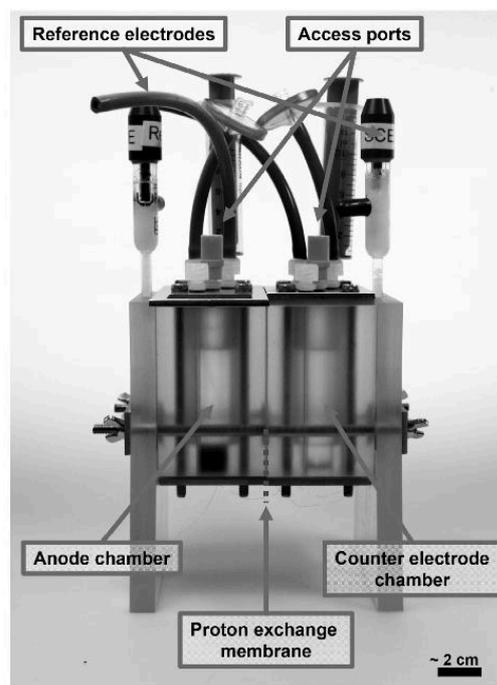
**Fig. 5.** Mixed MFCs. Comparison between pure culture MFCs and mixed culture MFCs (*S. oneidensis* (S.o.) and *G. sulfurreducens* (G.s.)) with graphite felt as anode material. (A) Examples of conditioning period graphs (red, *G. sulfurreducens*; blue, mixed MFC). (B) Examples of capacitance corrected current sweep graphs (red, *G. sulfurreducens*; blue, mixed MFC). (C) Comparison of sessile cells between pure culture MFCs and mixed MFCs. The number of sessile cells of *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* is shown in green and red, respectively. Cell numbers were determined using qPCR. Striped bars indicate the data gained from mixed MFCs. All data sets are derived from triplicates for the pure culture MFCs and quadruplicates for the mixed culture MFCs. Error bars indicate standard deviation.

manipulation would potentially offer further possibilities. These factors include for instance the Mxd-proteins involved in the production of extracellular polymeric substance (Müller et al., 2013), or the biofilm-promoting factor A (BpfA) (Theunissen et al., 2010). Overexpression of corresponding genes in a strain that is inoculated under conditions of hydrodynamic flow in MFCs could be a useful experiment to develop strains with increased exoelectrogenic performance.

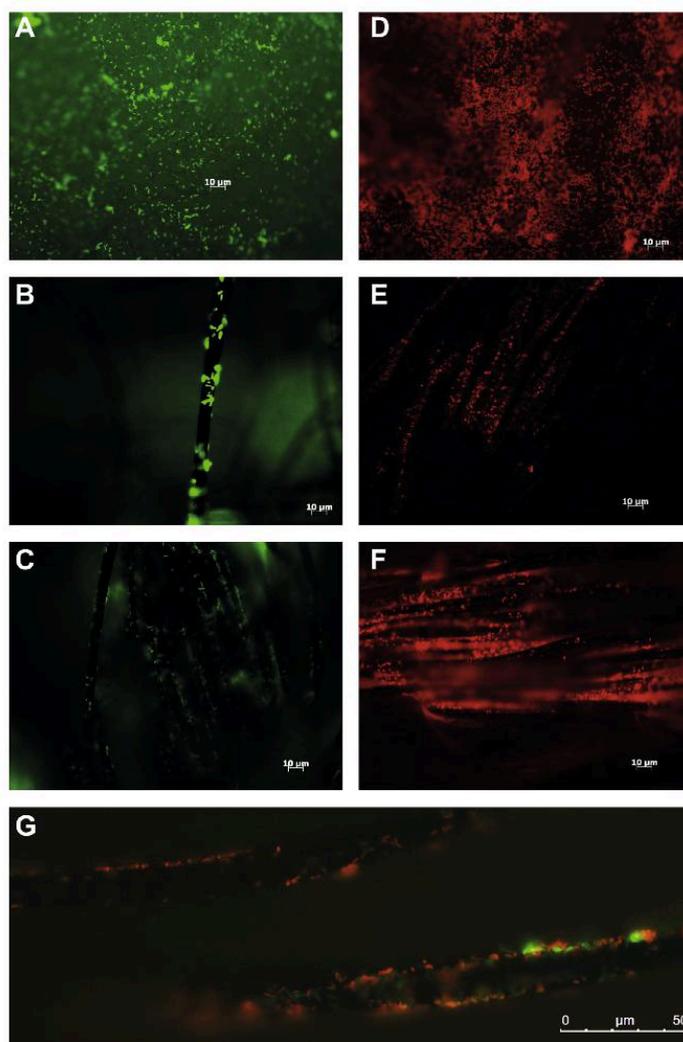
Of note, graphite felt is the material that is covered with the lowest number of *S. oneidensis* cells. Nevertheless, although graphite foil is covered with more cells, it is still the material with the lowest current densities. One explanation for this finding could be that the electron transport from flavin to graphite foil is kinetically hindered. This hypothesis was already raised before based on the graphite foil potentials at the end of the conditioning period. It might arouse the question why the *S. oneidensis* cells that are bound to the graphite foil surface are not able to compensate for a potentially impaired flavin-based electron transfer. A possible answer to this question was given in a recent publication by Okamoto et al. (2013). The authors could provide evidence for a role of flavins as cofactors of outer membrane cytochromes. This is in line with crystallographic data showing possible flavin binding pockets in the structure of the outer membrane cytochrome MtrF of *S. oneidensis* (Clarke et al., 2011). Hence, if direct cell-to-surface electron transfer and shuttle-based electron transfer are both dependent on flavins, it is evident that surface bound cells would have to cope with the same limitations that occur for the electrochemical interaction with flavins and the foil material.

### 3.5. Performance of *S. oneidensis*/*G. sulfurreducens* mixed MFCs

So far, the interaction of isolated strains with graphite based electrode materials was analyzed. The conducted experiments revealed that *S. oneidensis* is less effective in forming biofilms. This



**Fig. A1.** MFC system. The reactor was made out of polycarbonate. Anode and cathode chambers can be separated to introduce the separator membrane.



**Fig. A2.** Fluorescence *in situ* hybridization images of *S. oneidensis* (green) and *G. sulfurreducens* (red) cells on different anode materials as well as in mixed culture. (A–C) *S. oneidensis* biofilms on graphite foil, graphite felt, and C-Tex 13, respectively. (D–F) *G. sulfurreducens* biofilms on graphite foil, graphite felt, and C-Tex 13, respectively. (G) Mixed species biofilm of *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* cells on graphite felt.

seems to be compensated by its ability to use flavins as electron shuttles. A remaining question was whether a co-culture of *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* would show different characteristics in the established characterization routine. Co-culturing could, for instance, result in higher current densities since now the effective direct electron transfer of *G. sulfurreducens* could be combined with the use of flavins as electron shuttles. It was further unclear whether *S. oneidensis* would be detectable on the anode surface or whether this bacterium would be outcompeted by *G. sulfurreducens*. Therefore, MFCs were inoculated with a 1:1 mixture of the two proteobacteria. The conditioning period as well as the final anode potential itself were highly similar for the pure *G. sulfurreducens* culture and the co-culture, respectively [ $11 \pm 2$  h vs.  $11 \pm 1$  h and  $-241 \pm 7$  mV vs.  $-235 \pm 17$  mV] (Fig. 5A). The capacitance corrected values of the *G. sulfurreducens* MFCs were slightly lower

than the values of the mixed MFCs [ $145.3 \pm 14.8$  vs.  $156.9 \pm 62.2 \mu\text{A cm}^{-2}$ ] (Fig. 5B). However, the observed difference was not significant [unpaired *t*-test  $p = 0.279$ ]. FISH revealed mixed species biofilms with a clear dominance of *G. sulfurreducens* cells (Fig. A2G), which – as determined by qPCR – accounted for 91% of the total community (Fig. 5C). Although only 9% of the biofilm consortium consisted of *S. oneidensis*, it is interesting to note that the amount of *S. oneidensis* cells was 11-fold higher than what was observed in single species experiments. Hence, it seems as if the presence of *G. sulfurreducens* leads to a higher number of sessile *S. oneidensis* cells. Furthermore, the total amount of *G. sulfurreducens* bound to the anode surface increased 1.7-fold. One possible reason for the successful interaction between *S. oneidensis* and *G. sulfurreducens* cells in anode biofilms might be that the catabolic end product of *S. oneidensis* is acetate, which is the preferred

substrate for *G. sulfurreducens*. Furthermore, growth of *S. oneidensis* is negatively affected by rising acetate concentrations (Tang et al., 2007) possibly due to a decreasing intracellular pH (Luli and Strohl, 1990). Hence, a synergistic effect might result from simultaneous acetate production and removal.

### 3.6. MFCs with mixed sewage

In a last series of experiments, it was the aim to evaluate whether data obtained under laboratory conditions with pure cultures of exoelectrogenic bacteria could be transferred into field experiments. In other words, the question was whether a material that was tested with superior qualities under defined laboratory conditions would also be superior if inoculated with sewage sludge. Due to the limited performance of graphite foil, only graphite felt and C-TEX 13 were used for these experiments. On graphite felt, the conditioning period step took approximately 24 h and was thereby between the values that were measured for *G. sulfurreducens* [ $11 \pm 2$  (SD) h] and *S. oneidensis* [ $33 \pm 8$  (SD) h]. The lowest potential was with  $-252 \pm 19$  (SD) mV similar to what was obtained in pure culture experiments. On C-TEX 13, 72 h were necessary to establish a constant potential of  $-272 \pm 6$  (SD) mV. Regarding current densities at 41 mV, graphite felt allows only for  $3 \pm 5$  (SD)  $\mu\text{A cm}^{-2}$ , which is far below the values that could have been obtained with pure cultures. Nevertheless, also in these experiments C-TEX 13 showed better performance than graphite felt. The current density value at 41 mV of  $77 \pm 14$  (SD)  $\mu\text{A cm}^{-2}$  was even more than twofold higher compared to experiments with a pure *S. oneidensis* culture. However, it could not compete with pure cultures of *G. sulfurreducens* that allowed current densities of up to  $177 \mu\text{A cm}^{-2}$ .

## 4. Conclusions

MFC applications are dependent on stable biofilms, high current densities and short conditioning times. This combination demands compromises. Hence, the particular application will dictate whether longer conditioning times can be tolerated if current density is not enormously enhanced. Furthermore, population density cannot be directly converted into corresponding current densities, since an activity gradient runs through the anode biofilms. Hence, biofilms of a specific density will promise best efficiency. Interestingly, growth of mixed species biofilms can change the concentration of anode-attached microorganisms. This is an important implication for biotechnological processes that benefit from rigidity and stability of mixed species consortia.

## Acknowledgements

Financial support by the Baden-Württemberg Stiftung under the program "Umwelttechnologieforschung" is gratefully acknowledged. Furthermore, the authors thank Elena Kipf for designing the adapted two-chamber MFC setup used in this work and photographs thereof.

## Appendix A

See Figs. A1 and A2.

## References

- Caccavo Jr., F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., McInerney, M.J., 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (10), 3752–3759.

- Call, D.F., Logan, B.E., 2011. Lactate oxidation coupled to iron or electrode reduction by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (24), 8791–8794.
- Clarke, T.A., Edwards, M.J., Gates, A.J., Hall, A., White, G.F., Bradley, J., Reardon, C.L., Shi, L., Beliaev, A.S., Marshall, M.J., Wang, Z., Watmough, N.J., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Butt, J.N., Richardson, D.J., 2011. Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (23), 9384–9389.
- Coppi, M.V., Leang, C., Sandler, S.J., Lovley, D.R., 2001. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7), 3180–3187.
- Flynn, J.M., Ross, D.E., Hunt, K.A., Bond, D.R., Gralnick, J.A., 2010. Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *MBio* 1 (5).
- Golitsch, F., Bucking, C., Gescher, J., 2013. Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosens. Bioelectron.* 47, 285–291.
- Hartshome, R.S., Jepsen, B.N., Clarke, T.A., Field, S.J., Fredrickson, J., Zachara, J., Shi, L., Butt, J.N., Richardson, D.J., 2007. Characterization of *Shewanella oneidensis* MtrC: a cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron transport to extracellular electron acceptors. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (7), 1083–1094.
- Holmes, D.E., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Electron transfer by *Desulfohalobium propionicum* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2), 1234–1237.
- Huggett, M.J., Crocetti, G.R., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D., 2008. Recruitment of the sea urchin *Helicocraris erythrogramma* and the distribution and abundance of inducing bacteria in the field. *Aquat. Microb. Ecol.* 53, 161–171.
- Kipf, E., Koch, J., Geiger, B., Erben, J., Richter, K., Gescher, J., Zengerle, R., Kerzenmacher, S., 2013. Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresour. Technol.* 146, 386–392.
- Kloke, A., Rubenwolf, S., Bucking, C., Gescher, J., Kerzenmacher, S., Zengerle, R., von Stetten, F., 2010. A versatile miniature bioreactor and its application to bioelectrochemistry studies. *Biosens. Bioelectron.* 25 (12), 2559–2565.
- Lin, X., Nishio, K., Konno, T., Ishihara, K., 2012. The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices. *Biomaterials* 33 (33), 8221–8227.
- Lloyd, J.R., Leang, C., Hodges Myerson, A.L., Coppi, M.V., Cui, S., Methe, B., Sandler, S.J., Lovley, D.R., 2003. Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* 369 (Pt 1), 153–161.
- Logan, B.E., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (5), 375–381.
- Luli, G.W., Strohl, W.R., 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (4), 1004–1011.
- Marsili, E., Baron, D.B., Shikhar, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., Bond, D.R., 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (10), 3968–3973.
- Müller, J., Shukla, S., Jost, K.A., Spormann, A.M., 2013. The *mxl* operon in *Shewanella oneidensis* MR-1 is induced in response to starvation and regulated by ArcS/ArcA and BarA/UvrY. *BMC Microbiol.* 13, 119.
- Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2000. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (5), 2248–2251.
- Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y., 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7), 3182–3191.
- Okamoto, A., Hashimoto, K., Nealon, K.H., Nakamura, R., 2013. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (19), 7856–7861.
- Rasband, W.S., 1997–2004. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2007. Lack of electricity production by *Petrobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (16), 5347–5353.
- Ruebush, S.S., Brantley, S.L., Tien, M., 2006. Reduction of soluble and insoluble iron forms by membrane fractions of *Shewanella oneidensis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (4), 2925–2935.
- Scott, J.H., Nealon, K.H., 1994. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J. Bacteriol.* 176 (11), 3408–3411.
- Tang, Y.J., Meadows, A.L., Keasling, J.D., 2007. A kinetic model describing *Shewanella oneidensis* MR-1 growth, substrate consumption, and product secretion. *Biotechnol. Bioeng.* 96 (1), 125–133.
- Theunissen, S., De Smet, L., Dansercoer, A., Motte, B., Coenye, T., Van Beeumen, J.J., Devreese, B., Savvides, S.N., Vergauwen, B., 2010. The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation. *Res. Microbiol.* 161 (2), 144–152.
- Yates, M.D., Kiely, P.D., Call, D.F., Rismani-Yazdi, H., Bibby, K., Peccia, J., Regan, J.M., Logan, B.E., 2012. Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells. *ISME J.* 6 (11), 2002–2013.
- Yoon, S., Sanford, R.A., Löffler, F.E., 2013. *Shewanella* spp. use acetate as an electron donor for denitrification but not ferric iron or fumarate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (8), 2818–2822.

---

## 1 **Proof of principle for monitoring exoelectrogens in MFCs with wastewater**

2 Kerstin Dolch <sup>a</sup>, Jessica Wuske <sup>a</sup>, Johannes Gescher <sup>a,\*</sup>

3 <sup>a</sup> Institute for Applied Biosciences, Department of Applied Biology, Karlsruhe Institute of  
4 Technology, Fritz-Haber-Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany

5 \* Corresponding author. Tel.: +49 721 608 41940; fax: +49 721 608 41941

6 *E-mail addresses:* kerstin.dolch@kit.edu (K. Dolch)

7 jessica.wuske@gmx.de (J. Wuske)

8 johannes.gescher@kit.edu (J. Gescher)

### 9 **Abstract**

10 The most energy demanding step of waste water treatment is the aeration dependent  
11 elimination of organic carbon. Microbial fuel cells (MFC) offer an alternative strategy in  
12 which carbon elimination is conducted by anaerobic microorganisms that transport  
13 respiratory electrons originating from carbon oxidation to an anode. Hence chemical  
14 energy is directly transformed in electrical energy. This process potentially offers  
15 solutions for the future of an energy producing water treatment process. Compared to  
16 conventional aerobic treatment, the microbiology behind microbial fuel cells is far from  
17 being as robustly steerable or foreseeable. In this publication the use and stability of  
18 barcode containing exoelectrogenic model biofilms under realistic waste water treatment  
19 conditions is described. Genomic barcodes were integrated in *Shewanella oneidensis*,  
20 *Geobacter sulfurreducens*, and *G. metallireducens*. These barcodes are unique for each  
21 strain and allow to distinguish those cells from naturally occurring wild types and to  
22 quantify the amount of cells in a biofilm via multiplex qPCR. MFCs were pre-incubated  
23 with these three strains and after six days the anodes were transferred into MFCs with  
24 synthetic wastewater with 1% wastewater sludge. Over the time the system stabilized and  
25 each day 50 mg \* l<sup>-1</sup> organic carbon was oxidized and the coulomb efficiency was  
26 constant. In the end the initial community size decreased but seemed to reach a stable  
27 value of 61.5% *G. sulfurreducens barcode cells*, 10.5% for *S. oneidensis barcode cells*,  
28 and 17.9% for *G. metallireducens barcode cells* when compared to the starting  
29 composition of the community.

30 **Keywords:** Wastewater treatment, Microbial fuel cell, *Shewanella*, *Geobacter*,  
31 barcoding, qPCR

### 32 **1. Introduction**

33 The goal of the next decade is to achieve the exit from nuclear and fossil-fuel energy. In  
34 doing so, the supply of energy should not be neglected. To be able to do this, renewable

1 forms of energy production have to be established on the one side. On the other side, the  
2 energy-demand of each person has to be minimized. To unite those two goals, the  
3 implementation of a microbial fuel cell (MFC) in a wastewater treatment (WWT) plant is  
4 one of many tools (Rabaey et al. 2007) as the WWT process is a high energy consuming  
5 process. The first steps in a WWT plant are not limited by oxygen and are processed  
6 under anoxic conditions. The organic substrate gets first fermented into organic acids and  
7 hydrogen by fermenting organisms. Those organic acids then need to be degraded further  
8 to CO<sub>2</sub> to totally eliminate the organic carbon. This oxidation step is conducted by  
9 aerobic microorganisms. Therefore the wastewater has to be aerated which is energy-  
10 demanding. For cost reduction an MFC could be implemented instead or before this  
11 aerobic oxidation step.

12 In the past, it was shown, that MFCs with wastewater can produce energy while reducing  
13 the amount of organic carbon in the wastewater (Cha et al. 2010). The anodic community  
14 was analyzed in a few studies. Of the detected organisms are some closely related to  
15 microorganisms which were shown to be able of transferring respiratory electrons onto an  
16 anode (Ki et al. 2008). Nevertheless, the anode will also serve as an unspecific surface for  
17 biofilm growth and be occupied by microorganisms which do not contribute to the  
18 transfer of electrons.

19 For improving the performance of an MFC the anodic microbial community has to be  
20 selected and monitored (Ishii et al. 2013). With the lack of understanding the ecology of  
21 microbial communities that produce electricity (Oh et al. 2010) this cannot be done  
22 easily.

23 In an MFC microorganisms are supposed to function as a biocatalyst on the anode (Di  
24 Lorenzo et al. 2009). Those organisms are called exoelectrogenic and are able to transfer  
25 the electrons, which are generated during their metabolism in the cytoplasm, to the outer  
26 surface of the cell. This is normally achieved under anoxic conditions. Model organisms  
27 for exoelectrogens are *Shewanella* spp. and *Geobacter* spp. While *S. oneidensis* is a  
28 facultative anaerobic microorganism which can use a wide variety of different electron  
29 acceptors (Venkateswaran et al. 1999), not all strains of *Geobacter* are able to grow in the  
30 presence of oxygen. *G. sulfurreducens* can tolerate up to 10% oxygen (Lin et al. 2004),  
31 however *G. metallireducens* is inhibited by oxygen. However the spectrum of substrates  
32 which can be oxidized by *G. metallireducens* is large (Aklujkar et al. 2009). For *G.*  
33 *sulfurreducens* it is known that they form conductive and thick biofilms on anodes in a  
34 MFC (Malvankar et al. 2012).

1 Hence, a combination of those microorganisms would be a good anodic population. For  
2 monitoring the three exoelectrogens and for being able to distinguish them from naturally  
3 occurring wild types from the wastewater sludge, barcodes were integrated into the  
4 genome of each strain. A barcode is a synthetic and unique DNA sequence which was  
5 integrated in a non-coding region to prevent changing the phenotype. An MFC was  
6 started with all three strains at the same time. After the current density stabilized, the  
7 anodes were transferred into new MFCs containing synthetic wastewater with 1%  
8 wastewater sludge. The current density, the total amount of organic carbon (TOC), and  
9 the coulomb efficiency were measured over the time. Our results show that the model  
10 organisms can be kept to a surprisingly large extends on the anode surface.

## 11 **2. Material and Methods**

### 12 **2.1. Bacterial strains and growth conditions**

13 Prior to MFC experiments, microbial strains were pre-grown in the minimal medium  
14 adapted from Dolch et al. (Dolch et al. 2014) with minor changes. The final concentration  
15 of the yeast extract was 0.2% (w/v), of cysteine 2.5 mM, and of CaCl<sub>2</sub> 0.4 mM.

16 Additionally 0.02% of peptone was added. For each strain an appropriate combination of  
17 electron donor and -acceptor was added. For *S. oneidensis barcode* 20 mM sodium lactate  
18 and 40 mM disodium fumarate were used, for *G. sulfurreducens barcode* 20 mM sodium  
19 lactate, 10 mM acetate, and 40 mM disodium fumarate, and for *G. metallireducens*  
20 *barcode* 10 mM acetate, 4.4 mM propionate, and 10 mM sodium nitrate.

21 No electron acceptors in addition to the anode were added to the medium in MFC  
22 experiments. The medium contained as electron donor 12.5 mM sodium lactate and 5 mM  
23 sodium propionate.

24 *E. coli* strains were cultured in lysogeny broth medium at 37°C.

25 If necessary, the according antibiotic concentration or diaminopimelic acid was added.

### 26 **2.2. Strain preparations**

27 A unique and artificial sequence (“barcode”) (Gao et al. 2010) was integrated into each  
28 genome in a non-coding region. The sequence was designed with the GeneDesign  
29 software (Richardson, 2010). DNA was isolated of the wild type strains with the Wizard  
30 Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, Germany) according to the  
31 manufacture’s instruction. All amplified PCR fragments and digested plasmids were  
32 purified using a Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System according to the  
33 manufacture’s instruction (Promega, Mannheim, Germany). Each vector insert as well as

1 the final strain were sequenced to verify accuracy and orientation (GATC Biotech,  
2 Konstanz, Germany). All used bacteria are listed in table 1 and all plasmids in table 2.  
3 For *S. oneidensis* the plasmid pMQ150 was linearized with BamHI and Sall (New  
4 England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany). Primers 1 and 4 were designed with a  
5 homology to 35 nt of the ends of the linearized pMQ150. Primers 1 and 2 amplify a 500  
6 bp region upstream of the insertion sequence and primers 3 and 4 a 500 bp region  
7 downstream. The primer 2 and 3 encode further the synthetic sequence with an overlap of  
8 25 nt to each other. Primers 1 and 4 were used to amplify the sequence by a two-step  
9 PCR. The whole fragment was ligated into the linear plasmid according to the isothermal  
10 assembly method (Gibson et al. 2009). Afterwards the plasmid was transferred in *E. coli*  
11 WM3064 and conjugation with *S. oneidensis* MR-1 was performed at 30°C (Saltikov and  
12 Newman 2003).

13 For the transformation of *G. sulfurreducens* two PCR fragments were amplified. From the  
14 upstream region of the insertion side a 602 nt long sequence was amplified with the  
15 primers 5 and 6 and for the downstream region of 601 nt was amplified using primers 7  
16 and 8. With primers 9 and 10 a kanamycin resistance gene was amplified from pSCVAM.  
17 Primer 7 and 10 further encode the synthetic sequence with an overlapping region of 25  
18 nt. All PCR fragments were assembled with PCR. The PCR construct was cloned using  
19 the CloneJET™ PCR Cloning Kit from Fermentas was used and then electroporated in *E.*  
20 *coli* S17-1. For the transformation of *G. sulfurreducens* the 2.2 kbp fragment was  
21 amplified with the primers 5 and 8. The transformation was performed after Coppi et al.  
22 (Coppi et al. 2001). As a minor modification, agar plates containing 35 instead of 25 µg \*  
23 ml<sup>-1</sup> kanamycin were used.

24 For *G. metallireducens* the procedure was similar to *G. sulfurreducens*. An upstream  
25 fragment of 598 nt (primer 11 and 12), the kanamycin resistance (primer 13 and 14) as  
26 well as the 599 nt downstream sequence (primer 15 and 16) were amplified via PCR. The  
27 whole construct was ligated with the isothermal assembly method into the HindIII (New  
28 England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) linearized plasmid pk18mob\_amp. The  
29 transformation of *G. metallireducens* was performed according to Oberender et al.  
30 (Oberender et al. 2012). As a minor modification, anoxic aqua bidest. was used for  
31 resuspension of the cells.

32 For the cloning of *E. coli barcode* the system by Haldimann and Wanner (Haldimann and  
33 Wanner 2001) was used. The synthetic sequence was ordered from GenScript and  
34 amplified with primers 17 and 18. The primers further contain homology regions to the

---

1 vector pAH162 that was cleaved with BamHI and SalI (New England Biolabs, Frankfurt  
2 am Main, Germany). The amplicon was ligated into the linearized plasmid pAH162 via  
3 isothermal *in vitro* ligation (Gibson et al. 2009). The plasmid pAH162\_E.c.barcode was  
4 transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  containing pAH123. After 1 h at 42°C the culture was  
5 transferred onto agar plates containing 8  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  tetracycline.

### 6 **2.3. MFC setup and electrochemical measurements**

7 MFCs were operated in a two chamber setup designed by Frederik Golitsch. As working  
8 electrode material graphite felt GFD2 EA (2 mm thick) from SGL Group, Carbon  
9 Company (Meitingen, Germany) was used. Prior to usage, the electrodes were first rinsed  
10 with isopropanol and thereafter installed in the MFC before filling the whole setup with  
11 deionized water and autoclaving. The electrodes were connected via cannulas (0.9 x 120  
12 mm; Vivomed, Geislingen, Germany) and platinum wires (0.1 mm; Chempur, Karlsruhe,  
13 Germany) to a potentiostat (Pine Instruments, Grove City, USA).

14 The anode chamber was filled with 2 l of anoxic minimal medium without electron  
15 acceptor. It was continuously flushed with an 80% N<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> mixture to maintain a  
16 constant anoxic environment with a stable pH. The optical densities of the bacterial  
17 cultures were measured at 655 nm, and the starting cell density of each strain in the  
18 anodic chamber was 0.04. All MFC experiments were conducted in independent sextets  
19 and at a constant temperature of 30°C.

20 After six days, the measurement was stopped. Three anodes were immediately transferred  
21 into a new setup containing anoxic synthetic wastewater according to DIN EN ISO 11733  
22 (recipe 2) . As the potable water is hard water in Karlsruhe, deionized water was used  
23 instead. At the same time point the flushing was stopped and replaced by stirring. As  
24 additional inoculation 1% of wastewater sludge was used from the wastewater treatment  
25 plant in Karlsruhe, Germany. The standard measurement protocol consisted of measuring  
26 the current at 0.241 V vs. NHE. The three remaining MFCs were used for analyzing.

### 27 **2.4. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)**

28 FISH analysis was conducted according to Dolch et al. (Dolch et al. 2014) and the used  
29 probes are listed in Tab. 4.

30 Images were recorded by a Leica DM 5500 B microscope using a 63x water immersion  
31 lens and a DFC 300 FX digital color camera from Leica (Wetzlar, Germany). For the  
32 Leica microscope, the filter sets L5 (excitation filter 480/40 and suppression filter  
33 527/30), Y3 (545/30 and 610/75), and A4 (360/40 and 470/40) were used for FITC, Cy3,

1 and DAPI respectively. Picture-stacks were assembled using the software tool ImageJ  
2 (Rasband 1997 - 2004).

### 3 **2.5. Extraction of DNA**

4 After completion of the MFC program, DNA was extracted using the innuPREP Stool  
5 DNA Kit from Analytic Jena (Jena, Germany) according to the manufacturer's  
6 instruction. Whole anodes were used for the lysing step with the addition of *E. coli*  
7 *barcode* cultures for control. Afterwards, the manufacturer's instructions were followed  
8 with three times 1 ml. Standard curves were compiled with pure cultures. Therefore, the  
9 cells were first counted separately using an improved Neubauer counting chamber  
10 (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and a serial dilution of each strain was  
11 prepared. Afterwards for each dilution step, all three strains were pooled in one vial.  
12 From each of the six dilution steps DNA was extracted in triplicates according to the  
13 manufacturer's instructions. DNA was also isolated from the wastewater sludge as the  
14 control for the qPCR.

### 15 **2.6. Quantitative PCR (qPCR)**

16 Strain-specific primers and hydrolysis probes were designed with the software tool  
17 Beacon Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, USA) to quantify the abundance of  
18 *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode*, and *G. metallireducens barcode* in the  
19 MFCs via qPCR (Tab. 5). All qPCR reactions were done in a CFX96 Cycler (Bio-Rad,  
20 Munich, Germany) using white polypropylene thin-walled plates (4titude Wotton, United  
21 Kingdom) and adhesive qPCR seal (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The reaction  
22 volume of 20 µl was chosen according to the DyNAmo Flash qPCR Kit manual (biozym,  
23 Hessisch Oldendorf, Germany). The primer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)  
24 concentration was 0.5 µM, the hydrolysis probe (biomers, Ulm, Germany) concentration  
25 was 0.25 µM, and 1 µl of template-DNA was added. The optimal annealing temperature  
26 was determined with isolated DNA of the pure strains using a temperature gradient qPCR  
27 and the DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit (biozym, Hessisch Oldendorf, Germany).  
28 Primer pairing or primer-dimer formation was not detectable. The limit of detection  
29 (LOD) was determined for each strain separately. For *S. oneidensis barcode* this was  $144 \geq \text{LOD} \geq 14.4$  cells per reaction, for *G. sulfurreducens barcode*  $154 \geq \text{LOD} \geq 30.8$  and for  
30 *G. metallireducens barcode*  $404 \geq \text{LOD} \geq 40.4$ . All experiments were accompanied by no  
31 template controls and the isolated DNA from the wastewater sludge was taken as a  
32 negative control.  
33

---

1 Standard curves were established using biological triplicates and applied on each qPCR  
2 plate. On the basis of the standard curves, cell counts of each isolated DNA sample were  
3 determined. Cell quantifications of anode samples are based on three separate DNA  
4 samples from two independent MFCs. Quantitative PCR experiments with these samples  
5 were conducted in technical triplicates. The cell count per anode was gained by  
6 calculating the mean of the samples and multiplied by the amount of used lyses solution.

### 7 **2.7. Electric conductivity**

8 The conductivities of the anode media and the synthetic wastewater were measured with  
9 the HI 99300 EC / TDS meter (HANNA Instruments, Kehl am Rhein, Germany).

### 10 **2.8. Analytical measurements and statistical analysis**

11 Each day a sample was taken for measuring the amount of total organic carbon (TOC).  
12 TOC was analyzed using a multi N/C 2100S and TOC-Gas-Generator TG 600 from  
13 Analytik Jena (Jena, Germany). It was assumed that each consumed molecule of carbon  
14 could theoretically lead to transferring four electrons onto the anode. The coulomb  
15 efficiency was calculated by dividing the amount of measured electrons transferred to the  
16 anode by the theoretical amount.

17 Statistical analysis was conducted by calculating the median and the MADN (normalized  
18 median of absolute deviation) (Babanova et al. 2014) for the MFC data. For qPCR  
19 analysis the average and standard error were calculated.

## 20 **3. Results**

### 21 **3.1. Strain preparation**

22 The main interest was to develop a system with which it is possible to monitor the  
23 survival of artificially introduced microorganisms in an environmental sample.

24 *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens*, and *G. metallireducens* were chosen due to their ability  
25 of being exoelectrogenic. To monitor the survival of the three strains, a synthetic and  
26 unique DNA-sequence was integrated into the genome of each strain. These barcodes  
27 make it possible to distinguish them from natural occurring wild type strains from the  
28 wastewater. Additionally, this step allowed the specific quantification of each strain via  
29 multiplex qPCR. A fourth strain – *E. coli* – was used as an internal control in the DNA  
30 isolation step. The four strains were called *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens*  
31 *barcode*, *G. metallireducens barcode*, and *E. coli barcode* respectively. They did not  
32 show different behavior than the wild types (data not shown). As an environmental  
33 sample, wastewater in MFCS was chosen and therefore the question was whether the

1 three exoelectrogens *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode*, and  
2 *G. metallireducens barcode* can survive in an MFC fed with wastewater.

### 3 **3.2. Establishing a biofilm on the anodes**

4 The work flow of the MFC experiments is depicted in figure 1. The experiments were  
5 started with establishing a stable biofilm in phase I consisting of *S. oneidensis barcode*,  
6 *G. sulfurreducens barcode* and *G. metallireducens barcode* on the anode. Therefore six  
7 MFCs with CO<sub>2</sub>-buffered media were inoculated with these three strains and a potential  
8 of 241 mV vs. NHE was applied. The electric conductivity of the medium was 8.1 mS \*  
9 cm<sup>-1</sup>. As electron donor, lactate and propionate were chosen in accordance to their  
10 metabolisms. For six days the current density was measured over the time. Within the  
11 first hours the increase was steep. It then leveled and after six days on each anode the  
12 biofilm showed a stable current density ( $392.39 \pm 209.73 \mu\text{A} * \text{cm}^{-2}$ ) (Fig. 2 A).

### 13 **3.3. Current production of the pre-incubated anodes in wastewater**

14 In phase II, the focus was on how this biofilm of defined organisms, grown with directly  
15 available electron donors, would behave in an undefined medium with no directly  
16 available electron donor. Therefore three of these pre-incubated anodes were immediately  
17 transferred into new setups containing anoxic synthetic wastewater with 1% wastewater  
18 sludge. As carbon source peptone, meat extract, and glucose were added according to  
19 DIN EN ISO 11733. None of them can be used by *S. oneidensis*, *G. sulfurreducens*, or *G.*  
20 *metallireducens* as electron donor. The electric conductivity was 0.6 mS \* cm<sup>-1</sup>.

21 The same potential was applied and the current density was measured. Right from the  
22 beginning, there was current production and no visible lag-phase. Therefore, the food  
23 chain immediately started to work and undefined carbon sources were fermented into  
24 organic acids which could be used by the attached cells on the anode. When the current  
25 density dropped below the starting value, the same amount of organic carbon was added.  
26 This was repeated twice. The addition of carbon source always resulted right away in an  
27 increase of the current density; however it was always lower than in phase I (Fig. 2 B).

### 28 **3.4. Reduction of organic carbon and coulomb efficiency**

29 Each day samples were taken for studying the amount of total organic carbon (TOC) in  
30 the MFCs. The question was, if the amount of organic carbon can be reduced and at the  
31 same time current be produced.

32 In figure 3 B the chronology of the consumption of the TOC is depicted. Before each  
33 addition of new carbon source, the TOC-values dropped to similar levels. In the first

1 period this took almost five days. After that, it took around three days to consume around  
2 150 mg of organic carbon which means a rate of 50 mg of organic carbon per day.  
3 For evaluating the efficiency of the MFCs in respect to reducing the organic carbon load  
4 in wastewater and thereby producing electricity, the coulomb efficiency is a nominal  
5 value. In figure 3 B the coulomb efficiency is shown over the time. In the first five days it  
6 increased steadily until new carbon source was added. Thereafter it stabilized and did not  
7 change when new carbon was added. After 14 days the coulomb efficiency was  $7.3 \pm$   
8 1.2%.

### 9 **3.5. Microbial population**

10 So far, it was shown that the pre-incubated anodes together with wastewater sludge were  
11 able to produce energy by oxidizing the undefined organic carbon. Therefore it was of  
12 further interest, how this biofilm behaved and developed. From each phase one MFC was  
13 used for performing FISH-analyses. The anodes were stained for bacteria (red) and  
14 archaea (green). Certainly, archaea were not detectable on the anode of phase I (Fig. 4 A).  
15 All graphite fibers were covered with a thin and uniform biofilm of bacteria with thicker  
16 parts in between crossings of fibers. The pre-incubated anode showed thicker biofilms  
17 with almost 50  $\mu\text{m}$  radius around the fibers after 14 days in wastewater (Fig. 4 B).  
18 Surprisingly, the biofilm only consisted of bacteria. Therefore, the supernatant of phase II  
19 was also stained for bacteria and archaea. Most of the cells were grouped into flocks. In  
20 those flocks, some archaea (green) were found (Fig. 4 C and D). Still, the majority of the  
21 community consisted of bacteria. To further distinguish if those bacteria belong to the  
22 *Geobacteraceae* which are found quite often in MFCs with wastewater, the wastewater  
23 sludge was stained with GEO3 (data not shown) as well as the supernatant of the MFC  
24 after phase II (Fig. 4 D). In both samples no fluorescence was detected.

### 25 **3.6. Survival of the three exoelectrogens**

26 For monitoring the survival of the three exoelectrogens *S. oneidensis barcode*, *G.*  
27 *sulfurreducens barcode*, and *G. metallireducens barcode* in a wastewater MFC from each  
28 phase two MFCS were used for isolating DNA. The whole anode was used and *E. coli*  
29 *barcode* was added as a homogeneity control. From each lysed anode a triplicate was  
30 used for the further process. Afterwards, a multiplex qPCR was performed with a  
31 standard curve of known cell count of *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode*,  
32 and *G. metallireducens barcode*. The  $C_q$ -values of the *E. coli barcode* were only used as  
33 an internal control. The values did not differ and therefore homogeneity was guaranteed.

1 The pre-incubation was started with an equal amount of each strain. After six days of  
2 incubation at 241 mV vs. NHE, *G. sulfurreducens barcode* was the dominant of the three  
3 barcode containing organisms (planktonic I and sessile I). While  $40.2 \pm 7.1\%$  of the  
4 planktonic cells were *S. oneidensis barcode* in phase I, only  $6.7 \pm 2.5\%$  of the sessile cells  
5 accounted for this organism. The amounts of *G. metallireducens barcode* in both fractions  
6 were even less (Fig. 5).

7 After transferring the anodes into wastewater and incubating for 14 days, none of the  
8 three strains was detected in the planktonic part. On the anode, the dominance of  
9 *G. sulfurreducens barcode* was even more pronounced with  $97.9 \pm 2.6\%$ . In cell numbers,  
10 this means a survival of the anodic population of 61.5% *G. sulfurreducens barcode*,  
11 10.5% *S. oneidensis barcode*, and 17.9% *G. metallireducens barcode*.

## 12 **4. Discussion**

### 13 **4.1. Establishing traceable microorganisms**

14 In this work, four strains are presented which had each a synthetic and unique DNA  
15 sequence inserted in their genome. This insertion was called “barcode” and therefore the  
16 strains were called *S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode*, *G. metallireducens*  
17 *barcode*, and *E. coli barcode*. Instead of deleting a gene with the barcode sequence (Gao  
18 et al. 2010), the barcode was integrated in a non-coding region of the genome. And  
19 therefore, the phenotypes were not changed.

20 These barcode sequences were further used for quantifying the cells. By applying a  
21 standard curve of known cell count of each strain, a multiplex qPCR was performed. This  
22 was a faster approach than staining with FISH-probes and performing fluorescence-  
23 activated cell sorting (FACS). And it further made it possible to calculate the percentage  
24 of each strain in a biofilm.

25 However the biggest advantage was that these barcodes allowed distinguishing these  
26 strains from naturally occurring strains. In this paper, we proved this by settling the three  
27 exoelectrogens (*S. oneidensis barcode*, *G. sulfurreducens barcode*, and *G.*  
28 *metallireducens barcode*) on anodes of MFCs and then transferring these anodes into new  
29 MFCs supplied with wastewater. Taken together with the possibility of quantification, we  
30 were able to monitor the survival of the artificially introduced strains *S. oneidensis*  
31 *barcode*, *G. sulfurreducens barcode*, and *G. metallireducens barcode* in wastewater.  
32 Hence, this barcode system allows to develop a synthetic anodic biofilm and to thereby  
33 influence the performance of an MFC. As we still have a lack of understanding of the  
34 ecology of microbial communities on anodes (Oh et al. 2010) this system further presents

1 a platform for studying microbial communities by monitoring their development under  
2 e.g. different applied potentials or process conditions. Ishii et al. see the solution for  
3 accelerated treatment rates and efficient energy recovery in selecting and monitoring an  
4 optimized community (Ishii et al. 2013).

5 The stability of the anodic biofilm under long-term usage and with real wastewater under  
6 continuing conditions will be shown shortly by our group.

#### 7 **4.2. Performance of the MFCs**

8 In this work it was shown, that the three exoelectrogenic strains were able to establish a  
9 stable current producing biofilm on the anode in a CO<sub>2</sub>-buffered medium in phase I.

10 These anodes were then transferred to a new setup containing anoxic synthetic  
11 wastewater with 1% wastewater sludge in phase II. The current densities in phase II were  
12 always lower than in phase I. One reasonable explanation could be the lower electric  
13 conductivity of the synthetic wastewater (Logan 2012). None of the carbon sources of the  
14 synthetic wastewater were degradable by the applied exoelectrogens. Nonetheless, there  
15 was immediately current production. This means, that the food chain started right away  
16 by fermenting the higher molecular carbon sources into organic acids like acetate, lactate,  
17 propionate and formate (Kong et al. 2008) which could be then oxidized by the  
18 exoelectrogens. This is supported by the complete coverage of the anode surface by the  
19 exoelectrogens after phase I. Therefore, organisms from the wastewater could not directly  
20 interact with the anode and transfer electrons. This had to be achieved via the  
21 exoelectrogenic biofilm. Another possibility of transferring the electrons onto the anode  
22 would be to use the conductivity of *G. sulfurreducens* cells. Anodic biofilms of *G.*  
23 *sulfurreducens* are conductive (Malvankar et al. 2012). Therefore the electrons can be  
24 transferred onto *G. sulfurreducens* which then forwards the electrons via cytochromes and  
25 pilis to the anode (Vargas et al. 2013).

26 The current density dropped whenever the organic carbon was depleted and by adding  
27 more synthetic wastewater, the current density was regained. After around 8 days, the  
28 coulomb efficiency stabilized. The pre-incubated anodes were able to degrade 50 mg \* l<sup>-1</sup>  
29 TOC per day while anodes with just wastewater sludge accumulated organic carbon (data  
30 not shown). This shows, while the pre-incubated anodes might not be quite sufficient in  
31 producing energy from the wastewater, they are more sufficient in reducing the amount of  
32 organic carbon in the wastewater.

1 Another focus was set on the established biofilm and how it developed. After the pre-  
2 incubation a uniform and thin biofilm covered the graphite felt fibers. This biofilm  
3 became thicker in the wastewater. *Geobacteracaeae* are known to be found enriched in  
4 MFCs (Ki et al. 2008). Therefore the planktonic cells were stained with GEO3 – a probe  
5 for the *Geobacter* cluster. Quite surprisingly, there could be none detected. This was the  
6 same for the wastewater sludge. On the other side, the amount of sessile exoelectrogens  
7 declined. As there was no *Geobacter* spp. in the planktonic part, the biofilm was not  
8 detached. It is known, that *Geobacter sulfurreducens* needs CO<sub>2</sub> to be able to grow  
9 (Mahadevan et al. 2006). In this paper we were able to show, that if *Geobacter* can build  
10 under CO<sub>2</sub>-buffered condition a biofilm, it can survive and produce electricity in an  
11 anodic biofilm in wastewater without CO<sub>2</sub> as a buffer. This is in accordance with Jung  
12 and Regan, who found *Geobacter* spp. on an anode in a non-CO<sub>2</sub>-buffered system (Jung  
13 and Regan 2011).

14 The highest survival rate showed *G. sulfurreducens barcode* with two cells out of three.  
15 From *G. metallireducens barcode* only every fifth and from *S. oneidensis barcode* every  
16 tenth cell survived. As the anode was covered with the cells, the higher survival rate of *G.*  
17 *sulfurreducens* could be explained by the good ability of *G. sulfurreducens* to build a  
18 biofilm (Malvankar et al. 2012).

19 Therefore, this synthetic biofilm could be used to clean wastewater. And by introducing  
20 new genetic engineered strains which can e.g. produce cellulases and thereby help to  
21 degrade the cellulose in wastewater, the wastewater cleaning process can be amplified.  
22 Another possibility would be to add bacterial strains which perform an unbalanced  
23 fermentation of substrates which are less reduced than the product (Flynn et al. 2010).  
24 And thereby producing wanted products from wastewater.

## 25 **5. Conclusions**

26 By introducing unique and synthetic DNA sequences in non-coding regions, the survival  
27 of microorganisms can be monitored under environmental conditions. Furthermore, the  
28 survival rate can be quantified by applying multiplex qPCR. This was proved by pre-  
29 incubating an anode of an MFC with those marked bacterial strains and then mounting  
30 this anode in an MFC with wastewater. As a further point, the degradation of the organic  
31 carbon of the wastewater could be reduced by this bacterial community under realistic  
32 conditions.

## 33 **6. Acknowledgements**

1 Financial support by the Baden-Württemberg Stiftung under the program  
2 “Umweltechnologieforschung” is gratefully acknowledged. Furthermore, the authors  
3 thank Frederik Golitsch for designing the MFC set up and Prof. Boll from the University  
4 of Freiburg for providing the wild type strain of *G. metallireducens* and the plasmid  
5 pK18mob.

## 6 7. References

- 7 1. Aklujkar, M., Krushkal, J., DiBartolo, G., Lapidus, A., Land, M.L. and Lovley, D.R. (2009)  
8 The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism,  
9 physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC*  
10 *Microbiol* 9, 109.
- 11 2. Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. (1990)  
12 Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for  
13 analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56(6), 1919-1925.
- 14 3. Babanova, S., Bretschger, O., Roy, J., Cheung, A., Artyushkova, K. and Atanassov, P.  
15 (2014) Innovative statistical interpretation of *Shewanella oneidensis* microbial fuel cells  
16 data. *Phys Chem Chem Phys* 16(19), 8956-8969.
- 17 4. Cha, J., Choi, S., Yu, H., Kim, H. and Kim, C. (2010) Directly applicable microbial fuel cells  
18 in aeration tank for wastewater treatment. *Bioelectrochemistry* 78(1), 72-79.
- 19 5. Coppi, M.V., Leang, C., Sandler, S.J. and Lovley, D.R. (2001) Development of a genetic  
20 system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 67(7), 3180-3187.
- 21 6. Di Lorenzo, M., Scott, K., Curtis, T.P., Katuri, K.P. and Head, I.M. (2009) Continuous feed  
22 microbial fuel cell using an air cathode and a disc anode stack for wastewater treatment.  
23 *Energy Fuels* 23(11), 5707-5716.
- 24 7. DIN EN ISO 11733:2004-11, Water quality - determination of the elimination and  
25 biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - activated sludge  
26 simulation test (ISO 11733:2004).
- 27 8. Dolch, K., Danzer, J., Kabbeck, T., Bierer, B., Erben, J., Forster, A.H., Maisch, J., Nick, P.,  
28 Kerzenmacher, S. and Gescher, J. (2014) Characterization of microbial current  
29 production as a function of microbe-electrode-interaction. *Bioresour Technol* 157, 284-  
30 292.
- 31 9. Flynn, J.M., Ross, D.E., Hunt, K.A., Bond, D.R. and Gralnick, J.A. (2010) Enabling  
32 unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *MBio* 1(5).
- 33 10. Gao, H., Barua, S., Liang, Y., Wu, L., Dong, Y., Reed, S., Chen, J., Culley, D., Kennedy, D.,  
34 Yang, Y., He, Z., Nealson, K.H., Fredrickson, J.K., Tiedje, J.M., Romine, M. and Zhou, J.  
35 (2010) Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type cytochromes on aerobic and anaerobic  
36 respiration. *Microb Biotechnol* 3(4), 455-466.
- 37 11. Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A. and Smith, H.O. (2009)  
38 Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*  
39 6(5), 343-345.
- 40 12. Haldimann, A. and Wanner, B.L. (2001) Conditional-replication, integration, excision, and  
41 retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol*  
42 183(21), 6384-6393.
- 43 13. Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Wu, A., Yamanaka, Y., Nealson, K.H. and  
44 Bretschger, O. (2013) Identifying the microbial communities and operational conditions  
45 for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water Res* 47(19), 7120-  
46 7130.

- 1 14. Jung, S. and Regan, J.M. (2011) Influence of external resistance on electrogenesis,  
2 methanogenesis, and anode prokaryotic communities in microbial fuel cells. *Appl*  
3 *Environ Microbiol* 77(2), 564-571.
- 4 15. Ki, D., Park, J., Lee, J. and Yoo, K. (2008) Microbial diversity and population dynamics of  
5 activated sludge microbial communities participating in electricity generation in  
6 microbial fuel cells. *Water Sci Technol* 58(11), 2195-2201.
- 7 16. Kong, Y., Xia, Y. and Nielsen, P.H. (2008) Activity and identity of fermenting  
8 microorganisms in full-scale biological nutrient removing wastewater treatment plants.  
9 *Environ Microbiol* 10(8), 2008-2019.
- 10 17. Lin, W.C., Coppi, M.V. and Lovley, D.R. (2004) *Geobacter sulfurreducens* can grow with  
11 oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl Environ Microbiol* 70(4), 2525-2528.
- 12 18. Logan, B.E. (2012) Essential data and techniques for conducting microbial fuel cell and  
13 other types of bioelectrochemical system experiments. *ChemSusChem* 5(6), 988-994.
- 14 19. Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J., Gorby, Y.A. and  
15 Goodwin, S. (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism  
16 capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of  
17 iron and other metals. *Arch Microbiol* 159(4), 336-344.
- 18 20. Lutz, R. and Bujard, H. (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in  
19 *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic*  
20 *Acids Res* 25(6), 1203-1210.
- 21 21. Mahadevan, R., Bond, D.R., Butler, J.E., Esteve-Nunez, A., Coppi, M.V., Palsson, B.O.,  
22 Schilling, C.H. and Lovley, D.R. (2006) Characterization of metabolism in the Fe(III)-  
23 reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl*  
24 *Environ Microbiol* 72(2), 1558-1568.
- 25 22. Malvankar, N.S., Lau, J., Nevin, K.P., Franks, A.E., Tuominen, M.T. and Lovley, D.R. (2012)  
26 Electrical conductivity in a mixed-species biofilm. *Appl Environ Microbiol* 78(16), 5967-  
27 5971.
- 28 23. Oberender, J., Kung, J.W., Seifert, J., von Bergen, M. and Boll, M. (2012) Identification  
29 and characterization of a succinyl-coenzyme A (CoA): benzoate CoA transferase in  
30 *Geobacter metallireducens*. *J Bacteriol* 194(10), 2501-2508.
- 31 24. Oh, S.T., Kim, J.R., Premier, G.C., Lee, T.H., Kim, C. and Sloan, W.T. (2010) Sustainable  
32 wastewater treatment: how might microbial fuel cells contribute. *Biotechnol Adv* 28(6),  
33 871-881.
- 34 25. Rabaey, K., Rodriguez, J., Blackall, L.L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., Verstraete, W.  
35 and Nealson, K.H. (2007) Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven  
36 and driving communities. *ISME J* 1(1), 9-18.
- 37 26. Rasband, W.S. (1997 - 2004) ImageJ.
- 38 27. Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K.P. and Lovley, D.R. (2007) Lack of electricity production  
39 by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not  
40 necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Appl Environ Microbiol*  
41 73(16), 5347-5353.
- 42 28. Saltikov, C.W. and Newman, D.K. (2003) Genetic identification of a respiratory arsenate  
43 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19), 10983-10988.
- 44 29. Shanks, R.M., Caiazza, N.C., Hinsa, S.M., Toutain, C.M. and O'Toole, G.A. (2006)  
45 *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from  
46 Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72(7), 5027-5036.
- 47 30. Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in*  
48 *vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat*  
49 *Biotechnol* 1(9), 784 - 791.
- 50 31. Vargas, M., Malvankar, N.S., Tremblay, P.L., Leang, C., Smith, J.A., Patel, P., Snoeyenbos-  
51 West, O., Nevin, K.P. and Lovley, D.R. (2013) Aromatic amino acids required for pili

- 
- 1 conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter*  
2 *sulfurreducens*. MBio 4(2), e00105-00113.
- 3 32. Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor,  
4 B.J., Ringelberg, D.B., White, D.C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E.  
5 and Nealson, K.H. (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description  
6 of *Shewanella oneidensis* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2, 705-724.
- 7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

1 Tab. 1: Bacteria used in this paper.

<b>strain</b>	<b>relevant genotype</b>	<b>reference</b>
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Z1	<i>aciq</i> , <i>PN25-tetR</i> , <i>SpR</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$ , $\Phi80 lacZ$ $\Delta M15$	(Lutz and Bujard 1997)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ Z1 <i>barcode</i>	synthetic sequence; 1308612:: <i>tet</i> barcode	this work
<i>E. coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> $\Delta M15$ <i>RP4-1360</i> $\Delta(araBAD)567$ <i><math>\Delta adapA1341::[erm pir(wt)]</math></i>	(Saltikov and Newman 2003)
<i>E. coli</i> $\lambda pir$ S17-1	<i>thi pro recA hsdR [RP4-2Tc::Mu- Km::Tn7]</i> $\lambda pir$ <i>Tpr Smr</i>	(Simon et al. 1983)
<i>Geobacter</i> <i>metallireducens</i> GS- 15	wild type	(Lovley et al. 1993)
<i>G. metallireducens</i> <i>barcode</i>	synthetic sequence; 254254:: <i>kan</i> barcode pk18mob	this work
<i>Geobacter</i> <i>sulfurreducens</i> PCA	wild type	DSM12127
<i>G. sulfurreducens</i> <i>barcode</i>	synthetic sequence; 453226:: <i>kan</i> barcode	this work
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	wild type	(Venkateswaran et al. 1999)
<i>S. oneidensis</i> <i>barcode</i>	synthetic sequence; 71982:: <i>barcode</i>	this work

2

3

1 Tab. 2: Plasmids.

<b>plasmid</b>	<b>relevant genotype</b>	<b>reference</b>
pAH123	Int <sub>Φ80</sub>	(Haldimann and Wanner 2001)
pAH162	Tet <sup>r</sup>	(Haldimann and Wanner 2001)
pAH162_E.c.barcode	Tet <sup>r</sup> , synthetic sequence for <i>E. coli barcode</i>	this work
pASK-IBA43	Amp <sup>r</sup>	IBA, Göttingen, Germany
pJET1.2/blunt Cloning Vector	Amp <sup>r</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
pJET_G.s.barcode	Km <sup>r</sup> , synthetic sequence for <i>G. sulfurreducens barcode</i>	this work
pk18mob	Km <sup>r</sup>	(Oberender et al. 2012)
pk18mob_amp	Amp <sup>r</sup>	this work
pk18mob_amp_G.m.barcode	Km <sup>r</sup> , synthetic sequence for <i>G. metallireducens barcode</i>	this work
pMQ150	deletion vector, den/arsh, <i>ura3</i> , Km <sup>r</sup> , <i>sacB</i> , R6K-ori	(Shanks et al. 2006)
pMQ150_S.o.barcode	Km <sup>r</sup> , synthetic sequence for <i>S. oneidensis barcode</i>	this work
pSCVAM	Km <sup>r</sup> , R6K-ori	A. Förster, unpublished
puc57_E.c.barcode	Amp <sup>r</sup> , synthetic sequence for <i>E. coli barcode</i>	GenScript, Picataway, USA

2

3

1 Tab. 3: Primer sequences.

number	name	sequence 5' -> 3'
1	up_for Barcoding S.o.	AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGC AGGTCTCGCCAAACGGCTGGTT
2	up_rev Barcoding S.o.	GCTCACACGGAGAGCAAGGAGAACGCACACC AATGCCAAGTACAGTCAAGATAAAAACTTGTT ACCCAGT
3	down_for Barcoding S.o.	CGTTCTCCTTGCTCTCCGTGTGAGCCTACAGC GGCATCCGAGCCGTGTTTACTGCTCTATGCCT TGAG
4	down_rev Barcoding S.o.	TGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCC GGGAGCAGAGACGAGTAATAGGG
5	600bp_up_for	GTAGGCAAGGGAGAACAGC
6	600bp_up_rev	ATTTTGAGACACAACGTGGCCCCCACCTCCA CCAGG
7	600bp_down_for	ACTTCTCCTGTCCTTCACCTCGGTGTCCTTCT GCCAAGTGTTCTGTTTCATGTTCTTCTCCTCC TCCTATCCGGCCGATCGTATCGGGAGTTTCTC CTGCTCG
8	600bp_down_rev	AGGCTGGATCGCCTGGGT
9	kan_for	CTGGTCCTGGTGGAGGTGGGGGGCCACGTTGT GTCTCAAAT
10	kan_rev	CACTTGGCAGGAAGGACACCGAGGTGAAGGA CAGGAGAAGTGAGGTGAGATGCAAGGAGGAG ACGGAGAGGTAGGTCGATAGAACCGTTAGAA AACTCATCGAGCATC
11	pK18mob Fragment for	TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGT AAAACGACGGCCAGTGCCCATAACCCTTCTTC TCCAG
12	G.m. up-rev	CAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCGAAAGA GTGGCGCTACGGA
13	G.m. kan-for	CCCAGCTCCGTAGCGCCACTCTTTCGCCACGT TGTGTCTCAAAT
14	G.m. kan-rev	CGTAGAGGAACCAGCAAGGCTTGTCGGCAAG TC GGTATCATAACAGAGCACGGCTTAGAAAACT CATCGAGCATC
15	G.m. down-for	GTGCTCTGTATGATACCGACTTGCCGACAAGC CTTGCTGGTTCTCTACGATGGCGGGATGGGC TTTGGAGA
16	pK18mob Fragment rev	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGA GTCGACCTGCAGGCATGCCTGATTGCGACCAG TTCAC
17	puc57-pAH162_for	GACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAA GCTTGCATGCCTGCAGGTCCAAGCTTGCATGC CTGCCTGCAG
18	puc57-pAH162_rev	TCAGTGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCGA GCTCGGTACCCGGGGATCTTCGAGCTCGGTAC CCGG

- 1 Tab. 4: Fluorescently labeled oligonucleotide probes and helper oligonucleotides used for  
 2 fluorescent *in situ* hybridization experiments.

<b>probe</b>	<b>target</b>	<b>sequence (5' → 3')</b>	<b>specificity</b>	<b>reference</b>	<b>FA [%]</b>
ARCH91 5	16S rRNA	GTGCTCCCCCGC CAATTCCT	Archaea	(Amann et al. 1990)	20
EUB388- I	16S rRNA	GCTGCCTCCCGT AGGAGT	Bacteria	(Amann et al. 1990)	0 - 50
GEO3-A	16S rRNA	CCGCAACACCTA GTACTCATC	Geobacter cluster	(Richter et al. 2007)	30
GEO3-B	16S rRNA	CCGCAACACCTA GTTCTCATC	Geobacter cluster	(Richter et al. 2007)	30
HGEO3-3	Helfersonde für GEO3	GTTTACGGCGGG TACTACC		(Richter et al. 2007)	
HGEO3-4	Helfersonde für GEO3	CACTGCAGGGGT CAATAC		(Richter et al. 2007)	

3

4

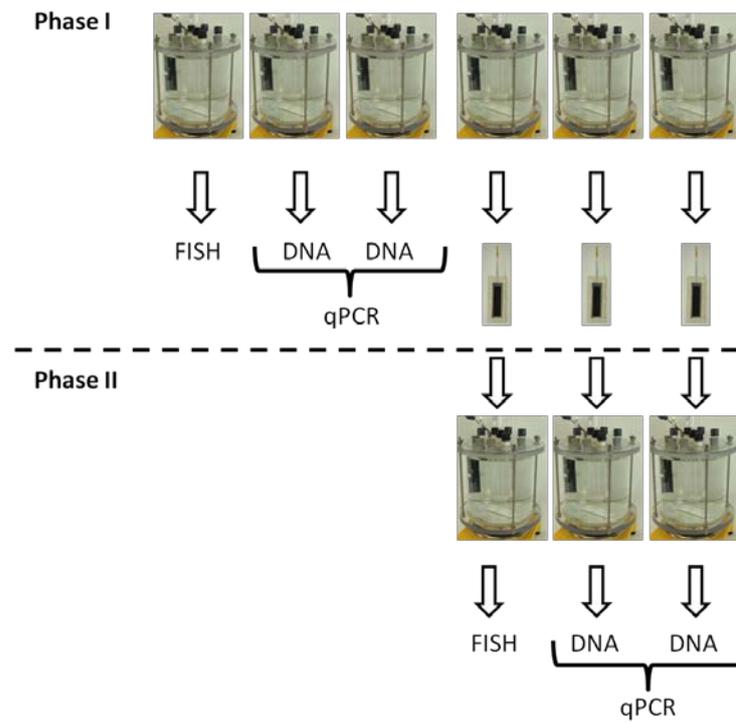
1 Tab. 5: Sequences of primers and probes used for real-time PCR experiments.

<b>probe</b>	<b>sequence (5' → 3')</b>	<b>usage</b>
S.o. for	GACTGTACTTGGCATTGG	Quantification of <i>S. oneidensis</i> barcode cells
S.o. rev	GATCCATTAGCACAGACTTA	
S.o. hydrolysis probe	CGTTCTCCTTGCTCTCCGTGT	
G.s. for	CGGTTCTATCGACCTACC	Quantification of <i>G. sulfurreducens</i> barcode cells
G.s. rev	CTGCTTGATGAACGAGAG	
G.s. hydrolysis probe	CTCACCTCACTTCTCCTGTCCTTC	
G.m. for	CCGTGCTCTGTATGATAC	Quantification of <i>G. metallireducens</i> barcode cells
G.m. rev	CAGGATTTCTCGAATTTCTC	
G.m. hydrolysis probe	TGCTGGTTCCTCTACGATGGC	
E.c. for	GAAGGATAGTATGGGTGTCA	Quantification of <i>E. coli</i> barcode cells
E.c. rev	GATCCTCCGCTTTCTCTC	
E.c. hydrolysis probe	TCCCTGAATCCCAACTCGCTC	

2

3

1

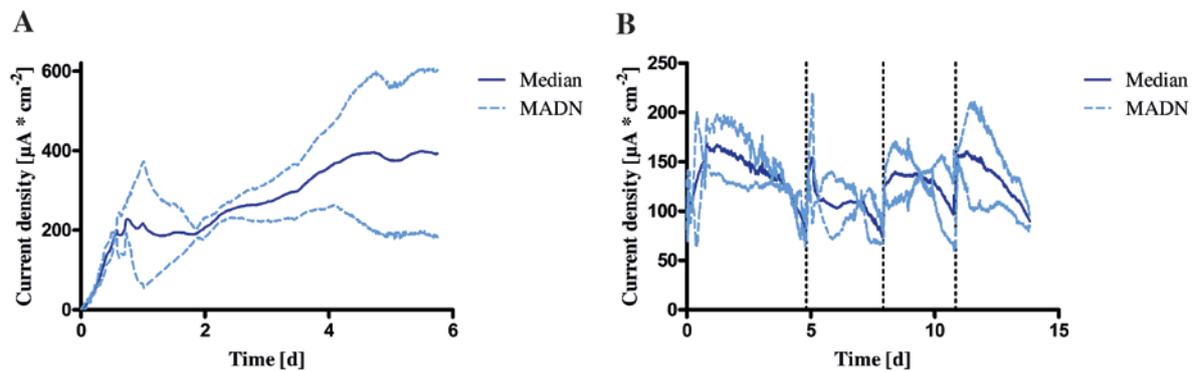


2

3 **Fig. 1: Work flow.** In phase I the three strains were incubated at 241 mV vs. NHE in a  
 4 CO<sub>2</sub>-buffered media for six days. Afterwards one MFC was used for FISH, two for qPCR  
 5 and three for transferring the anodes into new MFCs and starting the second phase. In  
 6 phase II the MFCs were run with synthetic wastewater and 1% wastewater sludge. After  
 7 14 days one MFC was used for FISH and two for qPCR.

8

1

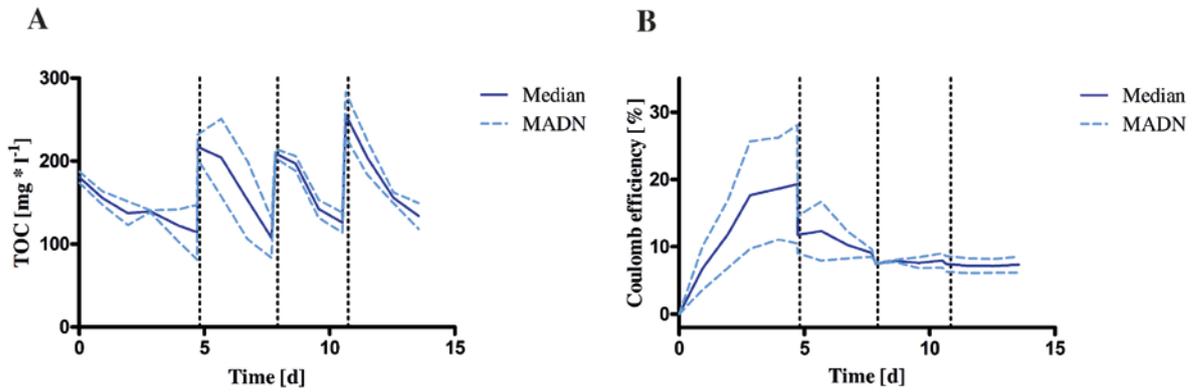


2

3 **Fig. 2: Electrochemical data from phase I and II.** Solid lines indicate the median and4 dashed lines the MADN. **A)** Current density graph of phase I. The graph shows the  
5 median of six independent MFCs with the three exoelectrogens in  $\text{CO}_2$ -buffered media.6 **B)** Current density of three independent MFCs in phase II. Anodes with exoelectrogens  
7 were transferred into anoxic synthetic media containing 1% wastewater sludge. Vertical  
8 dashed lines show the time points of adding concentrated synthetic wastewater.

9

1



2

3 **Fig. 3: Phase II.** The solid lines show the median of three independent MFCs and the

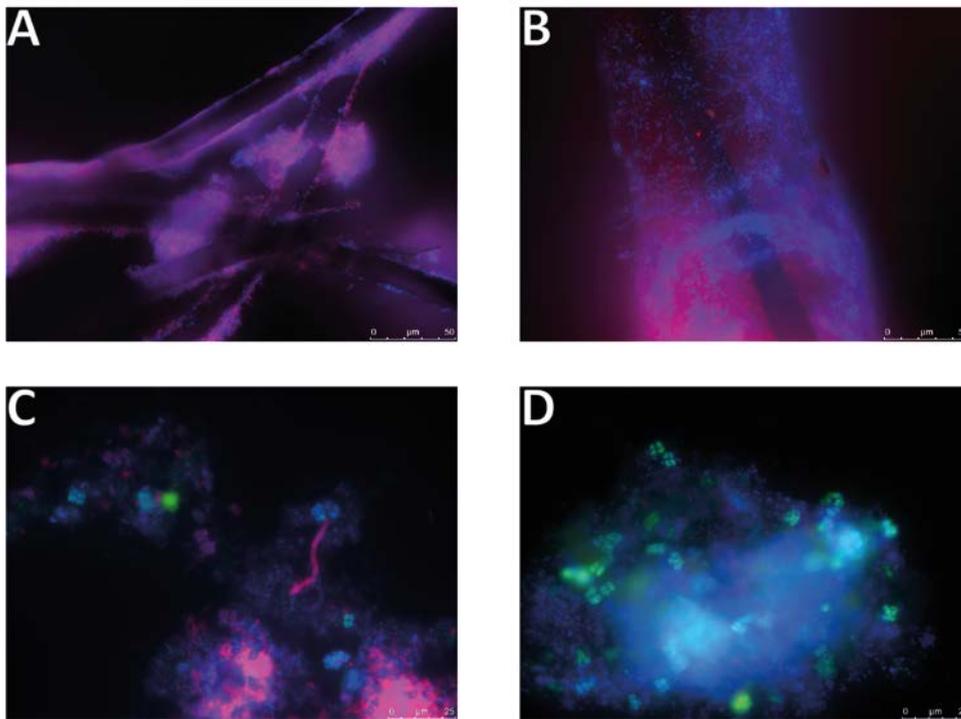
4 dashed lines the MADN. The dashed vertical lines indicate the addition of synthetic

5 wastewater. **A)** Amount of total organic carbon (TOC) in the MFCs in phase II. **B)**

6 Coulomb efficiency of the MFCs in phase II.

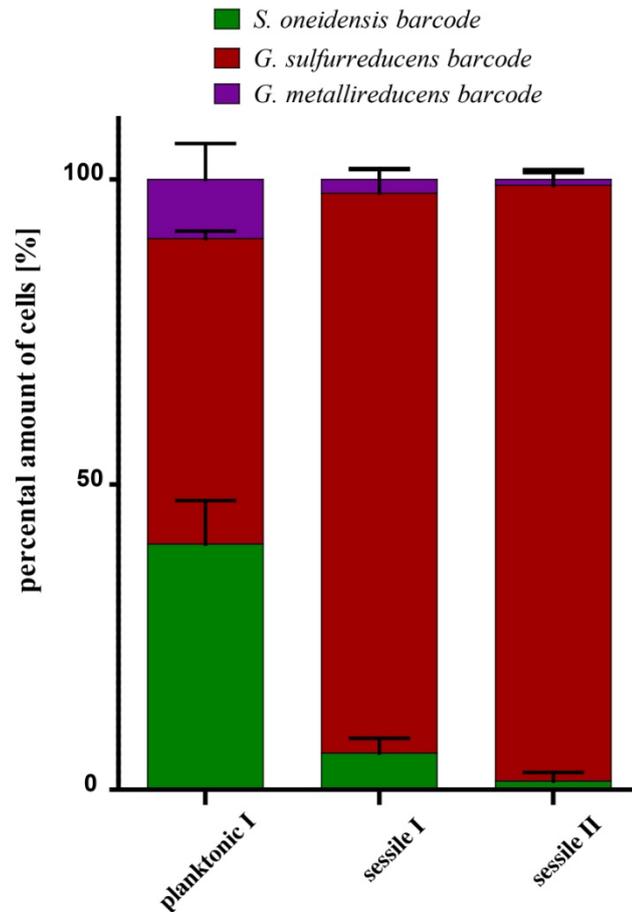
7

1



2

3 **Fig. 4: Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) pictures of the two phases.** DNA was  
4 stained unspecifically with DAPI (blue). Biofilm on anode after **A)** phase I and **B)** phase  
5 II. Bacteria (EUB388-I) was stained in red and archaea (ARCH915) in green. Planktonic  
6 cells after phase II **C)** stained with EUB388-I (red) and ARCH915 (green) and **D)** GEO3  
7 (red) and ARCH915 (green).



1

2 **Fig. 5: Amount of cells in phase I and II.** From the supernatant (planktonic cells) as  
3 well as from the anode (sessile cells) three samples were taken from each MFC to isolated  
4 DNA. The amount of cells of *S. oneidensis barcode* (green), *G. sulfurreducens barcode*  
5 (red), and *G. metallireducens barcode* (purple) were quantified by applying multiplex  
6 qPCR. In the planktonic samples from phase II the amounts of cells were below the LOD-  
7 value for each strain. The error bar indicates the standard deviation of two independent  
8 MFCs from each phase.

9

10

11

#### 4 Danksagung

Mein größter Dank geht an **Prof. Dr. Johannes Gescher**, der sich dieses tolle und spannende Projekt überlegt hat und für sein Vertrauen in mich bei der Durchführung. Danke, dass ich so vieles Neues lernen und ausprobieren durfte und dass du bei allen Problemen stets hinter mir standest!

Besonders möchte ich mich auch bei der gesamten **AG Gescher** bedanken, mit denen das Abendteuer Umzug von Freiburg nach Karlsruhe so gut gelungen ist und auch bei denen, die erst in Karlsruhe dazu gestoßen sind. Danke für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, auf Konferenzen und bei Retreats! Ein besonderes Dankeschön an **Sibylle** für die wissenschaftlichen Diskussionen und an **Fredi** für seine kreative Bastelleidenschaft. Und ein Dank an all meine Studenten und Praktikanten: **Jessica, Tobi, Judith, Lisa, Oscar & Robin!**

Außerdem ein spezielles Grazie und спасибо an **France** und **Anna** für das gemeinsame Durchhalten beim Intervalltraining und beim „super slow“!

Genauso werde ich die gemeinsamen Tanzeinlagen mit **Michael** bei den VAAMs vermissen.

Meinem Kooperationspartner, der **AG Kerzenmacher** von der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg möchte ich für die spannende und abwechslungsreiche Zusammenarbeit danken. Ein besonderer Dank an **Sven, Elena** und **Joana**.

Ein weiterer Dank geht an **Dr. Jan Maisch** und **Prof. Dr. Peter Nick** vom Botanischen Institut vom KIT für die freundliche Betreuung und die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops.

Ein ganz besonderer Dank an meine Karlsruher, die mir das Einleben in meine neue Heimat so einfach und schön gemacht haben! Schön, dass es euch gibt: **Uli, Katha** und **Angie**. Und an **Michi**, mit der sogar Zug fahren Spaß macht. Hartelijke dank aan **Jos**, van wie wij leerden hoe grappig wij Duitsers zijn!

Und ein Dank an meine Weltenbummler **Dani, Toni** und **Christian**. Die spontanen Reisen mit euch waren stets wunderbar. Auf viele weitere schöne Reisen!

Non vorrei dimenticare la miglior coinquilina **Chiara!**

Danke auch für die schönen und abwechslungsreichen Stunden mit **Ole, Nele, Danny** und **Nico**. Es ist mir ein besonderes Vergnügen euch aufwachsen zu sehen!

Ich wäre heute aber nicht hier, wenn nicht meine Eltern **Ingrid** und **Matthias** von Anfang an an mich geglaubt und mich bei meinen Zielen so unterstützt hätten. Vielen Dank dafür!



