

**WACHSTUM AN KATHODEN: ÖKOLOGISCHE,
PHYSIOLOGISCHE UND MOLEKULARE UNTERSUCHUNG ZUR
STROMGETRIEBENEN AUTOTROPHIE**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von

Anna Katharina Geiger

aus

Freiburg im Breisgau

Dekan: Professor Dr. Willem Klopper

Referent: Professor Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Professor Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 2016

Regentropfenfeuchte Luft, stets 22 Grad
Zu den Quellen rollten wir im Kart
Brodelnd schweflige Dämpfe
Das war der Start!

Saure Bouillon auf 60 Grad
Farblose Tröpfchen vermehrt und verwahrt
Dann hieß es warten
Bis sich was tat

Dann gigabyteweise Daten
Nach endlosem Warten
Sudo apt-get install QIIME
Was leben denn hier wohl für Arten?

Schonwieder Daten, wie komm ich da ran?
Mit Windows, Ubuntu oder El Capitan?
Von NOVA zu SciTE zu origin zu Word
BLAST-p, BLAST-n was ist jetzt dran?

Wer hat Rus, wer FoxA und wer MtrB?
Wer von euch nimmt das viele C?
Acidianus bist du wirklich drin?
Find ich's raus, bevor ich geh?

Am Schreibtisch im dunklen Kämmerlein
Tag aus und Tag ein
Sonnenschein im Kopf
In Wahrheit allein.

Über die Zeit
Mit vieler Menschen Geleit
Mit rauchenden Köpfen, so manchem Glas Wein
Ward diese Arbeit bereit!

Erklärung an Eides statt

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2011 bis Dezember 2015 am Institut für Angewandte Biologie der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe, den 08.03.2016

Katharina Geiger

Publikationen

Ziegler, Sibylle; Dolch, Kerstin; Geiger, Katharina; Krause, Susanne; Asskamp, Maximilian; Eusterhues, Karin; Kriews, Michael; Wilhelms-Dick, Dorothee; Goettlicher, Joerg; Majzlan, Juraj; Gescher, Johannes. Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *The ISME Journal*, 2013.

Majzlan, Juraj; Majzlan, Oto; Gescher, Johannes; Geiger, Katharina; Simon, Rolf; Göttlicher, Jörg; Steininger, Ralph. A microbiological and entomological assessment of the environmental impact of geochemically inert, Cr-rich waste near Sereď, Slovakia. Submitted to *Environmental Science and Technology*.

Geiger, Katharina; Dötsch, Andreas; Golitsch, Frederik; Reiner, Johannes E.; Hügler, Michael; Wilcke, Wolfgang; and Gescher Johannes. Physiological and molecular investigation on an electroautotrophic consortium at high temperatures followed by the reverse engineering with a distinct organism. To be submitted.

Beiträge zu Konferenzen

Vortrag auf dem 15. *Swiss Geoscience meeting* (SGM), Bern/Schweiz, November 2012.
Biogeochemical analysis as a tool to isolate extremophilic archaea.

Posterpräsentation auf dem 15. *International Symposium on Microbial Ecology* (ISME), Seoul/Korea, August 2014.

Characterization of a thermophilic electrolithoautotrophic growing consortium.

Posterpräsentation auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) Dresden/Deutschland, Oktober 2014.

Characterization of a thermophilic electrolithoautotrophic growing consortium.

Posterpräsentation auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) Marburg/Deutschland, März 2015.

Insights into the lifestyle of a thermophilic electrolithoautotrophic growing consortium.

Vortrag zur Jahreskonferenz der Innovationsallianz *ZeroCarbFP* - Teilprogramm Bioplastics – Teilvorhaben Elektroden-gestützte CO₂-Fixierung, Dortmund/Deutschland, August, 2015.

Zusammenfassung

Elektroautotrophie beschreibt eine Lebensweise, bei der Mikroorganismen elektrische Energie als Elektronenquelle für die Reduktion von CO₂ nutzen. Ein elektroautotropher Organismus muss demnach befähigt sein, respiratorische Elektronen von einer Kathode zu beziehen und diese an die Fixierung von CO₂ zu koppeln. Diese Stoffwechselleistung, die als mikrobielle Elektrosynthese bezeichnet wird, hat das Potential einer zukunftsweisenden Technologie, da sie die Rückgewinnung des Treibhausgases CO₂, in Form reduzierter organischer Verbindungen, mit einer möglichen Speichermethode für regenerativ erzeugte, überschüssige Energie verbindet. Innerhalb der Bioelektrochemie bildet die mikrobielle Elektrosynthese einen vergleichsweise jungen Forschungszweig. Dementsprechend sind bisher nur wenige Mikroorganismen als elektroautotroph beschrieben. Für zukünftige Anwendungen ist es von besonderem Interesse, neue elektroautotrophe Organismen zu isolieren und zu beschreiben. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Anreicherung thermophiler Organismen, die zur Elektrosynthese fähig sind. Die Verwendung thermophiler Organismen hat mehrere Vorteile. In der Anwendung würde durch thermophile, elektroautotrophe Organismen, beispielsweise bei einer Aufbereitung CO₂-haltiger Abgase aus Kohlekraftwerken, ein Abkühlen der heißen Abgasströme entfallen.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, Mikroorganismen aus verschiedenen heißen Quellen unter elektroautotrophen Bedingungen anzureichern und Isolate zu erstellen. Der beobachtete Stromfluss konnte auf mikrobielle Aktivität zurückgeführt werden. Ferner wurde mit mehreren Analysen gezeigt, dass sich auf der Kathode ein Biofilm aus Archaea und Bacteria angesiedelt hatte, wobei die Bacteria den größeren Anteil der Gemeinschaft bildeten. Die Erstellung eines Metagenoms und eines Metatranskriptoms zeigte, dass die angereicherten Mikroorganismen CO₂ über den Wood-Ljungdahl-Weg, den 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Weg und den reduktiven Citratzyklus fixieren. Durch Versuche mit isopenreinem ¹³C-markiertem Bicarbonat wurde die autotrophe Lebensweise der Organismen bestätigt. Diese Experimente zeigten weiterhin, dass die Fixierung von CO₂ mit der Aufnahme von kathodischen Elektronen einherging.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Publikationen | III |
| Zusammenfassung..... | IV |
| Inhaltsverzeichnis..... | V |
| Abkürzungsverzeichnis | XI |
| Abbildungsverzeichnis..... | XIV |
| Tabellenverzeichnis | XVI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Mikrobielle elektrochemische Technologien | 2 |
| 1.1.1 Mikrobielle Elektrokatalyse | 3 |
| 1.1.2 Primäre mikrobielle elektrochemische Technologien..... | 4 |
| 1.1.2.1 Mikrobielle Brennstoffzellen | 5 |
| 1.1.2.2 Mikrobielle Elektrosynthese | 6 |
| 1.2 Extrazellulärer Elektronentransport | 8 |
| 1.2.1 Direkter extrazellulärer Elektronentransport auf eine Anode | 9 |
| 1.2.2 Indirekter extrazellulärer Elektronentransport auf eine Anode..... | 12 |
| 1.2.3 Direkter Elektronentransport von einer Kathode..... | 12 |
| 1.2.4 Indirekter Elektronentransport von einer Kathode | 13 |
| 1.3 CO₂-Fixierungswege in Mikroorganismen | 15 |
| 1.4 Elektroautotrophe Mikroorganismen | 17 |
| 1.4.1 Thermophile Mikroorganismen in elektrochemischen Systemen | 20 |
| 1.5 Die mikrobielle Elektrosynthese - eine zukunftsweisende Technologie..... | 22 |
| 2 Zielsetzung..... | 24 |
| 3 Material..... | 25 |

| | | |
|----------------|--|-----------|
| 3.1 | Aufbau des Elektrosynthese-Reaktors | 25 |
| 3.2 | Probenmaterial | 26 |
| 3.2.1 | Standorte der Probenentnahme auf São Miguel | 27 |
| 3.2.1.1 | Dokumentation der Probenentnahme auf São Miguel | 27 |
| 3.2.2 | Beschreibung der Probe aus dem Taroko Nationalpark (Taiwan) | 29 |
| 3.2.3 | Primer | 29 |
| 3.3 | Sonden..... | 31 |
| 3.4 | Chemikalien, Enzyme und Kits..... | 31 |
| 4 | Methoden..... | 33 |
| 4.1 | Anreicherung im Elektrosynthese-Reaktor | 33 |
| 4.2 | Anreicherung, Isolierung und Zellzucht von Anreicherungen aus dem Reaktor | 34 |
| 4.2.1 | Kryo-Konservierung..... | 35 |
| 4.3 | Anreicherung in FeCO₃-Gradientenröhrchen | 36 |
| 4.3.1 | Kultivierung der isolierten Organismen in R2A-Medium | 37 |
| 4.4 | Bestimmung stoffwechselphysiologischer Parameter..... | 38 |
| 4.4.1 | Nitrat-Nitrit-Reduktion | 38 |
| 4.4.2 | Sulfat-Reduktion | 38 |
| 4.4.3 | Gesamtkohlenstoffanalyse | 38 |
| 4.5 | Inkorporation von ¹³C markiertem Bicarbonat..... | 39 |
| 4.6 | Molekularbiologische Methoden..... | 40 |
| 4.6.1 | DNA-Isolierung | 40 |
| 4.6.2 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 40 |
| 4.6.3 | Reinigung von DNA..... | 41 |
| 4.6.4 | Gesamt-DNA-Amplifizierung | 42 |
| 4.6.5 | RNA-Isolierung und Amplifizierung..... | 42 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.6.6 | Umschreiben von aRNA in cDNA | 44 |
| 4.7 | Sequenzierungsmethoden..... | 44 |
| 4.7.1 | Sequenzierung nach Sanger..... | 44 |
| 4.7.2 | 454-Sequenzierung..... | 44 |
| 4.7.3 | Illumina-Sequenzierung..... | 46 |
| 4.8 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 46 |
| 4.9 | Catalyzed reporter deposition Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (CARD-FISH) | 47 |
| 4.9.1 | Probenfixierung..... | 48 |
| 4.9.2 | Verwendete Puffer | 49 |
| 4.9.3 | Sonden | 50 |
| 4.9.4 | CARD-FISH Protokoll..... | 51 |
| 4.9.5 | Klassische Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) | 53 |
| 4.10 | Mikroskopie | 53 |
| 4.10.1 | Fluoreszenzmikroskopie | 53 |
| 4.10.2 | Rasterelektronenmikroskopie (REM)..... | 54 |
| 4.11 | Bioinformatische Methoden | 54 |
| 4.11.1 | 16S Community-Analyse mit QIIME | 54 |
| 4.11.2 | KEGG, KAAS..... | 55 |
| 5 | Ergebnisse | 56 |
| 5.1 | Thermophile Elektrosynthese..... | 56 |
| 5.1.1 | Initiale Anreicherung | 58 |
| | Chronoamperometrie..... | 59 |
| | Mikroskopische Analysen | 60 |
| | 16S rRNA Diversitäts-Analysen | 62 |
| | Metagenom-Analyse | 67 |

| | |
|---|-----|
| Metatranskriptom-Analyse | 70 |
| ¹³ C-Inkorporation | 76 |
| 5.1.2 Transplantations-Versuch..... | 77 |
| Chronoamperometrie..... | 77 |
| Mikroskopische Analyse | 79 |
| 5.1.3 Elektrosynthese-Versuch in Medium ohne HEPES..... | 80 |
| Chronoamperometrie..... | 81 |
| Mikroskopische Analyse | 82 |
| 16S rRNA Diversitäts-Analyse | 84 |
| 5.2 Anreicherungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor | 86 |
| 16S rRNA Diversitäts-Analyse | 87 |
| Analyse stoffwechselphysiologischer Parameter | 90 |
| 5.3 Anreicherung in FeCO ₃ -Gradientenröhrchen | 93 |
| 5.3.1 Isolierung von <i>Crenotalea</i> sp. | 94 |
| 5.3.2 Isolierung eines Bakteriums aus der Ordnung Rhizobiales | 96 |
| 6 Diskussion..... | 98 |
| 6.1 Thermophile Elektrosynthese..... | 98 |
| 6.1.1 Initiale Anreicherung | 98 |
| Chronoamperometrie..... | 99 |
| Mikroskopische Analysen | 100 |
| 16S rRNA Diversitäts-Analysen | 101 |
| Metagenom-Analyse | 103 |
| Metatranskriptom..... | 105 |
| ¹³ C-Inkorporation | 107 |
| 6.1.2 Transplantations-Versuch..... | 108 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.1.3 | Elektrosynthese-Versuch in Medium ohne HEPES | 109 |
| | Chronoamperometrie | 109 |
| | Mikroskopische Analyse | 110 |
| | 16S rRNA Diversitäts-Analyse | 110 |
| 6.2 | Anreicherung aus dem Elektrosynthese-Reaktor | 111 |
| 6.2.1 | Anreicherung mit Sulfat als Elektronenakzeptor | 112 |
| 6.2.2 | Anreicherung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor | 113 |
| 6.2.3 | Anreicherung mit Nitrat als Elektronenakzeptor | 114 |
| 6.3 | Anreicherung in FeCO ₃ -Gradientenröhrchen | 115 |
| 6.3.1 | Isolierung von <i>Crenotalea</i> sp. | 115 |
| 6.3.2 | Isolierung eines Bakteriums aus der Ordnung Rhizobiales | 115 |
| 7 | Ausblick | 117 |
| 7.1 | Thermophile Elektrosynthese..... | 117 |
| 7.2 | Anreicherungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor | 118 |
| 7.3 | Anreicherungen in FeCO ₃ -Gradientenröhrchen | 118 |
| 8 | Referenzen | 120 |
| | Anhang..... | 136 |
| | Manuskript..... | 136 |
| | Danksagung..... | 178 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Erklärung |
|--------------------|---|
| 3HP/4HB | 3-Hydroxypropionat/ 4-Hydroxybutyrat |
| AE | Arbeitselektrode |
| AQDS | Anthraquinon-2,6-disulfonat |
| aRNA | amplifizierte RNA |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BES | bioelektrochemische Systeme |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| bp | Basenpaare |
| ca. | circa |
| CARD-FISH | catalyzed reporter deposition Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung |
| cDNA | copy/komplementäre DNA |
| CDS | <i>coding sequences</i> |
| CymA | Cytoplasmatic membraneprotein A |
| DAPI | 4',6'-Diamidin-2-Phenylindol |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| Dicarb/4HB | Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | desoxy-Nukleinsäuretriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| e ⁻ | Elektron |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EET | <i>extrazellulärer Elektronentransfer</i> |
| ES | Elektrosynthese |
| et al. | et alia („und andere“) |
| FA | Formaldehyd |

| | |
|----------------|---|
| FccA | flavocytochrome c |
| FeOx | ferrous oxidizing |
| Fox | Ferrous oxidizing |
| g | Erdbeschleunigung |
| gDNA | genomische DNA |
| GE | Gegenelektrode |
| H ⁺ | Proton |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRP | <i>horse radish peroxidase</i> |
| IPCC | <i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i> |
| J | Stromdichte |
| KAAS | <i>KEGG Automated Annotation Server</i> |
| KEGG | <i>Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes</i> |
| KIT | Karlsruher Institut für Technologie |
| MEC | <i>microbial electrolysis cell</i> |
| MES | mikrobielle Elektrosynthese |
| MET | Mikrobielle elektrochemische Technologien |
| MFC | <i>microbial fuel cell</i> |
| Mto | Metal oxidizing |
| MtrA | metal reducing protein A |
| NAD | Oxidierter Form des Nicotin-Amid-Dinukleotids |
| NADH | Reduzierter Form des Nicotin-Amid-Dinukleotids |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnological Information</i> |
| NDIR | nichtdispersiver Infrarotsensor |
| NGS | <i>next generation sequencing</i> |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| org. | organisch |
| OTU | <i>operational taxonomic unit</i> |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |

| | |
|---------|--|
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PFTE | Polytetrafluorethylen |
| QIIME | <i>Quantitative insight into microbial ecology</i> |
| rDNA | ribosomale DNA |
| RDP | <i>Ribosomal Database Project</i> |
| RE | Referenzelektrode |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| RT | Raumtemperatur |
| rTCA | Reductiver Citratzyklus |
| RuBisCO | Ribulose Bisphosphat carboxylase |
| Rus | Rusticyanin |
| SCE | <i>standard calomel electrode</i> |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SHE | <i>standard hydrogen electrode</i> |
| sp. | Spezies |
| ssDNA | <i>single stranded DNA</i> |
| TC | <i>total carbon</i> |
| TIC | <i>total inorganic carbon</i> |
| TOC | <i>total organic carbon</i> |
| vs. | versus |
| WL | Wood-Ljungdahl |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der mikrobiellen Technologien: mikrobielle Brennstoffzelle (MFC) und mikrobielle Elektrosynthese (MES). | 6 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung des extrazellulären Elektronentransports auf eine Anode. | 9 |
| Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der verlängerten Elektronentransportkette in <i>Shewanella oneidensis</i> | 10 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen zum extrazellulären Elektronen-transport von einer Kathode in die Zelle. | 14 |
| Abbildung 5: Aufbau des Elektrosynthese-Reaktors. | 26 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung von São Miguel. | 27 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung der Elektrosynthese-Reaktoren mit Überführungen und Analysen im zeitlichen Verlauf. | 57 |
| Abbildung 8: Änderung der Stromstärke in der initialen Anreicherung. | 59 |
| Abbildung 9: CARD-FISH Analyse der Kathode aus der initialen Anreicherung. | 60 |
| Abbildung 10: REM-Aufnahmen der Kathode aus der initialen Anreicherung. | 61 |
| Abbildung 11: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität des Biofilms im Inokulum und auf der Kathode. | 63 |
| Abbildung 12: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität im Biofilm auf der Kathode und der planktonischen Phase im Reaktor. | 65 |
| Abbildung 13: Graphische Darstellung der phylogenetischen Zuordnung (auf Familienebene) der im Metagenom gefundenen Gene. | 68 |
| Abbildung 14: Schematische Darstellung der CO ₂ -Fixierungswege. | 73 |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen zur direkten Aufnahme von Elektronen von einer Kathode. | 75 |
| Abbildung 16: Versuchsaufbau ¹³ C-Inkorporation. | 76 |
| Abbildung 17: Änderung der Stromstärke im Spender- und Transplant-Reaktor. | 79 |
| Abbildung 18: CARD-FISH Analyse der Kathode aus dem Transplant-Reaktor. | 80 |
| Abbildung 19: Änderung der Stromstärke in der Überführung ohne HEPES. | 82 |
| Abbildung 20: CARD-FISH Analyse der Kathode aus dem Reaktor ohne HEPES. | 83 |
| Abbildung 21: REM Aufnahmen der Kathode aus dem Reaktor ohne HEPES. | 83 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 22: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität in dem Elektrosynthese-Reaktor mit Medium ohne HEPES..... | 85 |
| Abbildung 23: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität für Archaea und Bacteria von den drei Anreicherungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor. | 88 |
| Abbildung 24: Änderung des pH-Wertes in den drei Anreicherungsansätzen..... | 91 |
| Abbildung 25: Änderung der Sulfat-Konzentration in den drei Anreicherungen..... | 91 |
| Abbildung 26: Änderung der Nitrat- und Nitrit-Konzentration in der Anreicherung mit Nitrat als Elektronenakzeptor..... | 92 |
| Abbildung 27: Schematische Darstellung der drei Anreicherungen aus dem Elektrosynthesereaktor..... | 93 |
| Abbildung 28: A Gelbe Kolonien von <i>Crenotalea</i> sp. auf R2A-Patte. B Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von <i>Crenotalea</i> sp..... | 94 |
| Abbildung 29: Phylogenetischer Stammbaum des Isolats <i>Crenotalea</i> sp. und nächstverwandter Spezies. | 95 |
| Abbildung 30: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des Rhizobiales Isolats. A und B: lange, dünne stäbchenförmige Zellen, teilweise an einem Zellpol zusammenhängend..... | 96 |
| Abbildung 31: Phylogenetischer Stammbaum des Rhizobiales Isolats und der nächstverwandten Spezies..... | 97 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Zusammenstellung bekannter CO ₂ -Fixierungswege..... | 16 |
| Tabelle 2: Mikroorganismen in Elektrosynthese-Systemen..... | 18 |
| Tabelle 3: Mischkulturen in Elektrosynthese-Systemen..... | 20 |
| Tabelle 4: Auflistung der entnommenen Proben..... | 28 |
| Tabelle 5: Verwendete Primer..... | 29 |
| Tabelle 6: Verwendete Sonden..... | 31 |
| Tabelle 7: Verwendete Kits, Enzyme und Farbstoffe..... | 31 |
| Tabelle 8: Zusammensetzung Elektrosynthesemedium..... | 33 |
| Tabelle 9: Zusammensetzung Wolfe's Mineralexier (DSMZ Medium 792)..... | 34 |
| Tabelle 10: Zusammensetzung Anreicherungsmedium (nach DSMZ Medium 182)..... | 35 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung modifiziertes Wolfe's Mineralmedium..... | 36 |
| Tabelle 12: Zusammensetzung Vitaminlösung (DSMZ 1116)..... | 37 |
| Tabelle 13: Zusammensetzung R2A-Medium (nach Reasoner und Geldreich)..... | 37 |
| Tabelle 14: Zusammensetzung der Konditionierungs-Lösung..... | 38 |
| Tabelle 15: Zusammensetzung TAE-Puffer..... | 47 |
| Tabelle 16: Zusammensetzung PBS..... | 48 |
| Tabelle 17: Zusammensetzung Hybridisierungspuffer für CARD-FISH, bei -20 °C lagern..... | 49 |
| Tabelle 18: Zusammensetzung des Waschpuffers, CARD-FISH..... | 50 |
| Tabelle 19: Zusammensetzung CARD-FISH Lösungen..... | 50 |
| Tabelle 20: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea im Inokulum und auf der Kathode (zu Abbildung 11)..... | 63 |
| Tabelle 21: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria im Inokulum und auf der Kathode (zu Abbildung 11)..... | 64 |
| Tabelle 22: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea auf der Kathode und in der planktonischen Phase (zu Abbildung 12)..... | 65 |
| Tabelle 23: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria auf der Kathode und in der planktonischen Phase (zu Abbildung 12)..... | 66 |
| Tabelle 24: Auflistung der prozentualen Verteilung der Gene und deren taxonomischer Zuordnung (zu Abbildung 13)..... | 68 |
| Tabelle 25: Zusammenfassung der Transkriptom-Ergebnisse zu CO ₂ -Fixierung..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 26: Detaillierte Auflistung der im Metatranskriptom gefundenen Schlüsselenzyme zu den CO ₂ -Fixierungswegen. | 71 |
| Tabelle 27: Auflistung möglicher Mechanismen des Elektronentransfers von der Kathode in die Zellen mit Schlüsselenzymen und der Anzahl jeweils gefundener RNA reads. | 74 |
| Tabelle 28: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea auf der Kathode in der Überführung in Medium ohne HEPES (zu Abbildung 22)..... | 84 |
| Tabelle 29: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria auf der Kathode in der Überführung in Medium ohne HEPES (zu Abbildung 22)..... | 85 |
| Tabelle 30: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea in den jeweiligen Anreicherungen (zu Abbildung 23)..... | 88 |
| Tabelle 31: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria in den jeweiligen Anreicherungen (zu Abbildung 23)..... | 89 |
| Tabelle 32: Shannon Indices der drei Anreicherungen. | 90 |

1 Einleitung

„Der Klimawandel ist die größte gemeinsame Herausforderung der Menschheit (UN-Generalsekretär Ban Ki-Moon, 2014).“ Der Weltklimarat IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) hat 2014 in seinem fünften Bericht über die derzeitige Sachlage dargestellt, dass die durchschnittliche Temperatur auf der Erde von 1880 bis 2012 um 0,85 °C angestiegen ist. Damit einhergehend hat in den Jahren von 1850-2012 die durchschnittliche Menge an Kohlendioxid in der Atmosphäre um mehr als 100 ppm auf ca. 380 ppm zugenommen (IPCC, 2013). Der Großteil der CO₂ Emission ist dabei anthropogenen Ursprungs (> 35 Gt CO₂/Jahr, 2012), während natürlichen Faktoren wie Vulkanausbrüchen oder Veränderungen in der Sonnenaktivität nur geringe Bedeutung beigemessen wird. Als Hauptursache für den derzeitigen Klimawandel wird die Freisetzung der klimaschädlichen Treibhausgase Methan, Distickstoffmonoxid und besonders Kohlendioxid durch den Menschen aufgeführt. Durch die CO₂ Emissionen in den Jahren von 1970 bis 2012 ist der Anteil an CO₂ in der Atmosphäre um ca. 40 % gestiegen und ist damit so hoch wie niemals zuvor in den letzten 800.000 Jahren. Die restlichen 60 % des emittierten CO₂, die nicht in der Atmosphäre verblieben sind, wurden von Land und Ozeanen aufgenommen (IPCC, 2013). Dies hat in zunehmendem Maße Einfluss auf die Umwelt, da es durch die Veränderung des Klimas beispielsweise zum Abschmelzen von Gletschern und dem Eis der Arktis und damit zu einer Erhöhung des Meeresspiegels und weiterhin zu einer Ansäuerung der Meere durch die vermehrte CO₂ Aufnahme kommt. Dies wiederum hat extreme Auswirkungen auf die Biodiversität, da sich natürliche Lebensräume zusehends verändern. Darüber hinaus sind bereits heute direkte Folgen der Klimaveränderung zu beobachten, wie beispielsweise extrem trockene und heiße Sommer oder auch die Ausbreitung von Arten an Orten, die früher nicht durch eben jene besiedelt waren. Weiterhin hat die Klimaerwärmung auch direkten Einfluss auf die Ausbreitung Vektor-vermittelter Krankheiten wie beispielsweise

Malaria oder Dengue, da die jeweiligen Überträger (*Anopheles* bzw. *Stegomyia aegypti*) in neue Gebiete einwandern (Thornton *et al.* 2014).

Der Energiesektor hat mit 35 % den global gesehen größten Anteil an der Emission von Treibhausgasen (Stand 2010), es muss daher das Ziel des Klimaschutzes sein, in diesem Bereich auf eine CO₂ neutrale Wirtschaftsweise hinzuarbeiten (IPCC,2014). Zu den problematischen Treibhausgasemissionen kommt zudem noch der begrenzte Bestand an fossilen Brennstoffen hinzu. Bei der UN-Klimakonferenz 2015 in Paris haben 195 Staaten einen Klimavertrag unterschrieben, in dem u.a. beschlossen wurde, die globale Erderwärmung auf 1,5 °C zu beschränken. Damit solch ambitionierte Ziele erreichbar sind, wird der Fokus in den kommenden Jahren verstärkt auf der Entwicklung von Elektrizität und Brennstoffen aus alternativen und erneuerbaren Ressourcen sowie der Entwicklung von Methoden zur CO₂ Sequestrierung liegen (IPCC, 2014). In diesem Zusammenhang haben die sogenannten mikrobiellen elektrochemischen Technologien (Microbial Electrochemical Technologies - METs) im letzten Jahrzehnt stark an wissenschaftlichem Interesse gewonnen und einige dieser Technologien haben es bereits in die Anwendung geschafft (Logan and Rabaey 2012; Rosenbaum and Franks 2014). Die Funktionsweise der METs und deren Anwendungsgebiete werden im Folgenden genauer beschrieben, der Fokus wird dabei auf der mikrobiellen Elektrosynthese, einer speziellen Form einer MET, liegen.

1.1 Mikrobielle elektrochemische Technologien

Unter dem Begriff der mikrobiellen elektrochemischen Technologien werden solche Technologien zusammengefasst, bei denen Mikroorganismen aktiv mit Elektronenleitern interagieren. Bei einem solchen Elektronenleiter kann es sich sowohl um eine physikalische Elektrode aus Graphit oder Metall oder auch um ein natürlich vorkommendes leitfähiges Material wie beispielsweise ein Metalloxid handeln (Friedman *et al.* 2013). Die beteiligten Mikroorganismen können dabei entweder Elektronen von einer Elektrode aufnehmen oder sie an diese abgeben (Logan and Rabaey 2012). Nachdem sich viele Forschergruppen in den vergangenen Jahrzehnten mit den Grundlagen von bioelektrochemischen Systemen (BES) beschäftigt haben, finden diese METs in den letzten Jahren auch vermehrt Eingang in direkte Anwendungen. Neben den BES, an denen aktive Mikroorganismen beteiligt sind, gibt es auch

noch die sogenannte Enzym-, Protein- und DNA-Elektrochemie, auf die an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen wird. In diesem Abschnitt soll zum einen auf die Grundlagen von BES aus elektrochemischer Sicht eingegangen werden, aber auch auf die Voraussetzungen, die beteiligte Mikroorganismen mitbringen müssen, um in einem solchen System ihre Leistung einbringen zu können.

1.1.1 Mikrobielle Elektrokatalyse

Die in einem BES stattfindenden Interaktionen von Mikroorganismen mit einer Elektrode müssen sich bei einem Potential abspielen, welches dem physiologischen Potentialfenster der Redox-Bedingung im natürlichen Umfeld der jeweiligen Organismen entspricht (Schröder *et al.* 2015). Aerobe Mikroorganismen, die in ihrem natürlichen Lebensraum Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor [$E^0(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 0,82 \text{ V}$] nutzen, sind demnach an deutlich höhere Redoxpotentiale angepasst als strikte Anaerobier, deren *c*-Typ Cytochrome in der äußeren Membran bereits bei Potentialen von +0,6 V gegen die Standard Wasserstoffelektrode (standard hydrogen electrode - SHE) beschädigt würden (TerAvest *et al.* 2014) (Fuchs and Schlegel 2014). Auf der Gegenseite kann die Entwicklung von molekularem Wasserstoff [$E^0(2 \text{ H}^+/\text{H}_2) = -0,42 \text{ V}$] als die untere Potentialgrenze der mikrobiellen Elektrochemie angesehen werden (Schröder *et al.* 2015).

Werden Mikroorganismen als Katalysatoren zur Beschleunigung elektrochemischer Reaktionen eingesetzt, spricht man von einer sogenannten mikrobiellen Elektrokatalyse (Hallenbeck *et al.* 2014). Geht man davon aus, dass ein Katalysator definiert ist als ein Faktor, der eine Reaktion zwar beschleunigt oder erst möglich macht, jedoch unverändert aus dieser Reaktion wieder hervorgeht, kann man Mikroorganismen nicht als Katalysatoren im klassischen Sinn bezeichnen. Mikroorganismen sind aktiv an einer Reaktion beteiligt, indem sie beispielsweise Reduktionsäquivalente aus der Reaktion beziehen, um diese für anabole oder katabole Prozesse zu nutzen (Schröder *et al.* 2015). Die Verwendung von Mikroorganismen als Katalysatoren in elektrochemischen Systemen hat dennoch einen gewissen Vorteil gegenüber herkömmlichen Katalysatoren, da diese oftmals anfällig sind für störende Substanzen (hier ist beispielsweise die Sensitivität von Platinkatalysatoren gegenüber Kohlenstoffmonoxid oder Sulfidionen zu nennen), oder aber auch aus Kostengründen (Hallenbeck *et al.* 2014; Steele and Heinzl 2001). Weitere, nicht zu

vernachlässigende Vorteile der Nutzung von Mikroorganismen als Katalysatoren für bestimmte Reaktionen sind zum einen die Regio- und Stereoselektivität mikrobieller Reaktionen. Darüber hinaus können extremophile Organismen gezielt eingesetzt werden, wo konventionelle Katalysatoren unwirksam wären (Rosenbaum and Henrich 2014). Grundlegend für die Beteiligung der Mikroorganismen ist dabei, dass es den Organismen möglich ist, die Reduktionsäquivalente oder Elektronen aus den intrazellulären Elektronentransferketten über ihre Zellmembran hinweg mit einer Elektrode auszutauschen. Eine solche Reaktion wird durch den extrazellulären Elektronentransfer (EET) der Mikroorganismen ermöglicht. Mikroorganismen, die bei einer mikrobiellen Elektrokatalyse eingesetzt werden, können dabei einerseits organische Substrate biochemisch umsetzen und die dabei anfallenden Elektronen auf eine Anode übertragen, andererseits sind auch Organismen bekannt, die Elektronen von einer Kathode aufnehmen können, um diese für ihren Stoffwechsel zu nutzen (Rosenbaum and Franks 2014).

1.1.2 Primäre mikrobielle elektrochemische Technologien

Wie bereits oben beschrieben, versteht man unter METs Anwendungen, bei denen Mikroorganismen mit Elektroden interagieren. Bezogen auf den Grad der Interaktion der beteiligten Mikroorganismen mit einer Elektrode unterscheidet man zwischen primären und sekundären METs. Bei primären METs werden Prozesse genutzt, die sich in die mikrobielle Elektrochemie eingliedern und bei denen die Interaktion zwischen den Mikroorganismen und der Elektrode in einem physiologisch relevanten Potentialbereich ablaufen muss. Die Interaktion erfolgt dabei meist über einen EET zwischen den Organismen und der Elektrode. Zum Großteil unterliegen die Vorgänge, die bei primären METs Anwendung finden, dem oben beschriebenen faradayschen Prozess der mikrobiellen Elektrokatalyse. Bei sekundären METs hingegen erfolgt keine direkte Interaktion der Mikroorganismen, vermittelt über EET, mit der Elektrode. Die Interaktion ist hier eher indirekter Natur und unterliegt nicht den Grenzen der mikrobiellen Elektrochemie. Ein Anwendungsgebiet für sekundäre METs ist beispielsweise die Kontrolle eines mikrobiellen Systems, vermittelt durch einen elektrochemischen Prozess, in Bezug auf die Justierung des pH oder der Kontrolle des Sauerstoff-Partialdrucks oder der Konzentration eines Substrates oder Produktes im Medium. Im Gegensatz zu primären METs liegen die angelegten Potentiale bei sekundären METs nicht im physiologischen Bereich der Mikroorganismen, sie sind meist stark positiv

oder negativ. Im Folgenden werden exemplarisch die Anwendungsgebiete primärer METs beschrieben. Unabhängig von deren Funktion bestimmt dabei stets die Differenz des Redoxpotentials zwischen der Oxidation (Anode) und der Reduktion (Kathode), ob bei dem jeweiligen Prozess Strom produziert oder dem System Energie zugeführt wird (Rosenbaum and Franks 2014).

1.1.2.1 Mikrobielle Brennstoffzellen

Die mikrobielle Brennstoffzelle (*microbial fuel cell* - MFC) stellt die derzeit am besten untersuchte primäre MET dar (Patil *et al.* 2015). Klassischerweise besteht eine MFC aus einem Anoden- und einem Kathodenraum, welche durch eine protonenpermeable Membran voneinander getrennt sind. Im Anodenkompartiment setzen Mikroorganismen durch Oxidation organische Substrate zu beispielsweise Acetat oder CO₂ und Protonen um. Die dabei frei werdenden Elektronen werden von den Mikroorganismen über EET auf die Anode übertragen, es kommt zur Produktion von Strom. Die Anode stellt in diesem Fall einen extrazellulären terminalen Elektronenakzeptor dar, weswegen dieser Vorgang physiologisch gesehen einer anaeroben Atmung entspricht (Torres *et al.* 2010). Im Anodenkompartiment müssen daher strikt anaerobe Bedingungen herrschen. Die auf die Anode übertragenen Elektronen wandern anschließend über einen Stromverbraucher zur Kathode. Dort reagieren sie mit den Protonen und einem Elektronenakzeptor (klassischerweise Sauerstoff) zu Wasser. Durch die protonenpermeable Membran wird ein Ladungsausgleich gewährleistet (Logan *et al.* 2006). Eine schematische Darstellung einer MFC ist in Abbildung 1 zu sehen. Zu Beginn lag das Augenmerk der MFC-Forschung hauptsächlich auf der Erzeugung von Strom (Rabaey *et al.* 2004). Mittlerweile wird die MFC Technologie bereits in Großprojekten eingesetzt, wie beispielsweise bei der Abwasseraufbereitung oder der Bioremediation kontaminierter Grundwässer und Sedimente (Franks 2012; Lovley 2012; Williams *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010). Weiterhin findet die MFC Technologie Einsatz bei der Stromproduktion an abgelegenen Orten, so kann auch das Laden elektronischer Geräte, wie beispielsweise von Mobiltelefonen über MFCs gewährleistet werden (Ieropoulos *et al.* 2013). Der Einsatz einer MFC als Biosensor ist ein weiteres potentiell Anwendungsgebiet, welches derzeit eingehend erforscht wird (Golitsch *et al.* 2013; Abrevaya *et al.* 2015).

Nach einem ähnlichen Prinzip wie die MFC Technologie funktioniert die sogenannte mikrobielle Elektrolysezelle (*microbial electrolysis cell* - MEC). Hierbei muss, zusätzlich zu der Spannung, die durch die Mikroorganismen an der Anode entsteht, noch eine externe Spannung zugeführt werden. Durch die Fortschritte, die in den letzten Jahrzehnten auf dem Gebiet der erneuerbaren Energien verzeichnet wurden, ist es möglich, die für MEC-Prozesse benötigte Energie aus „sauberen“ Quellen, z.B. Wind- oder Solarenergie, zu erhalten. Die MEC Technologie wird beispielsweise zur Produktion von Wasserstoff, Methan oder Natriumhydroxid an der Kathode genutzt (Cheng and Logan 2007; Cheng *et al.* 2009; Rozendal *et al.* 2009).

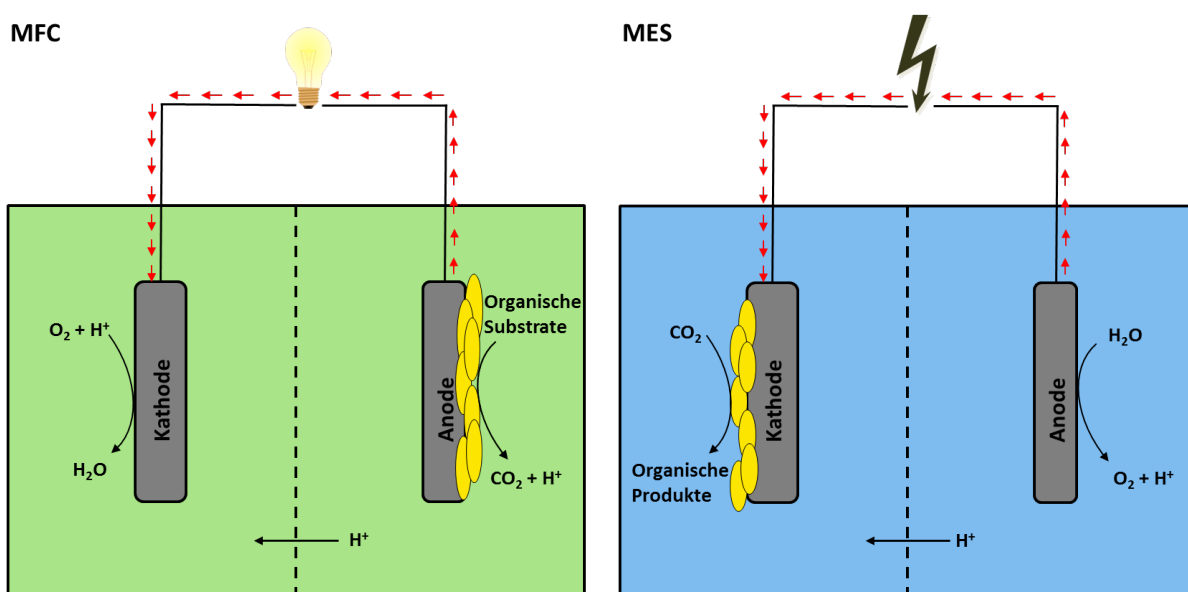


Abbildung 1: Schematische Darstellung der mikrobiellen Technologien: mikrobielle Brennstoffzelle (MFC) und mikrobielle Elektrosynthese (MES).

1.1.2.2 Mikrobielle Elektrosynthese

Ein weitaus jüngerer Forschungszweig, der zu den primären MET zählt, ist die sogenannte mikrobielle Elektrosynthese (MES). Unter mikrobieller Elektrosynthese versteht man die Produktion reduzierter Kohlenstoffverbindungen unter Stromverbrauch an einer Kathode. Die mikrobielle Elektrosynthese stellt dadurch quasi die Umkehrung der MFC-Technologie dar. In einem typischen MES-Aufbau, wie er in Abbildung 1 zu sehen ist, wandern die Elektronen, welche an der Anode durch Hydrolyse entstanden sind, zur Kathode, wo sie zur Reduktion eines Substrates durch Mikroorganismen genutzt werden. Das Potential der Elektronen wird dabei, wie auch bei einem MFC-Aufbau, über einen Potentiostaten

kontrolliert. Welcher terminale Elektronenakzeptor bei der MES verwendet wird, ist abhängig von der jeweiligen Anwendung. Zu Beginn wurde der Begriff mikrobielle Elektrosynthese ausschließlich benutzt, um die Reduktion von CO₂ mithilfe von elektrischem Strom zu beschreiben (Nevin *et al.* 2010; Rabaey and Rozendal 2010). Durch zahlreiche Studien, bei denen durch die Aufnahme von Elektronen mikrobielle Produktionen gesteigert wurden, die aber ein anderes Ausgangsmaterial als CO₂ hatten, wurde der Begriff jedoch bald schon erweitert. Die Elektrofermentation ist dabei eine Form der Elektrosynthese, bei der durch die zusätzlichen kathodischen Elektronen die Gärungsbilanz hin zur Produktion stärker reduzierter Verbindungen verschoben wird (Kracke and Krömer 2015; Rabaey and Rozendal 2010). Die Elektromethanogenese stellt eine weitere besondere Form der Elektrosynthese dar, bei der zwar auch CO₂ als Substrat dient, dieses wird jedoch durch methanogene Mikroorganismen mithilfe der kathodischen Elektronen zu Methan umgewandelt (Cheng *et al.* 2009; Villano *et al.* 2010; Kobayashi *et al.* 2013). In dieser Arbeit wird der Begriff Elektrosynthese in seiner ursprünglichen Bedeutung verwendet, also der Reduktion von CO₂ durch Mikroorganismen mithilfe von elektrischem Strom als alleinigem Elektronendonator. Die mikrobielle Elektrosynthese stellt eine erfolgversprechende Möglichkeit zur Fixierung des Treibhausgases CO₂ zu einem Wertstoff dar. Darüber hinaus ist die MES-Technologie vielseitig und energieeffizient. Wie bereits im Abschnitt zur mikrobiellen Elektrolyse beschrieben, kann die benötigte Energie aus erneuerbaren Ressourcen entnommen werden. Die MES ermöglicht es somit, überschüssige Energie in Form von einem chemischen Mehrwertprodukt zu speichern (Lovley and Nevin 2011). Etwa 80-90 % der bei der MES zugeführten Energie lassen sich in den Produkten wiederfinden (Nevin *et al.* 2010; Nie *et al.* 2013). Nutzpflanzen zeigen eine Effizienz von 3 %, die Sonnenenergie in Biomasse umzuwandeln (MacDonald 2003), während die Lichtausnutzung von Solarzellen sechs-fach höher liegt (Green *et al.* 2015). Es wäre somit um einiges sinnvoller, einen MES-Reaktor mit Solarenergie zu betreiben, um diese in chemischen Verbindungen zu speichern (Nevin *et al.* 2010; Lovley and Nevin 2011).

Damit Mikroorganismen in METs mit Elektroden interagieren können, müssen sie dazu befähigt sein, Elektronen an der Außenseite ihrer Zellmembran abgeben oder aufnehmen zu können. In diesem Sinn soll der folgende Abschnitt dazu dienen, die unterschiedlichen Mechanismen zu beleuchten, die eine Mikrogen-Elektroden-Interaktion ermöglichen.

1.2 Extrazellulärer Elektronentransport

Mikroorganismen benötigen wie alle Organismen Energie, um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten und um sich zu vermehren. Die Energie kann dabei über die Mechanismen der Atmung, der Gärung oder der Photosynthese bereitgestellt werden (Fuchs and Schlegel 2014; Kato 2015). In mikrobiellen Elektronentransportketten werden dabei Elektronen von einem Elektronendonator mit niedrigem Redoxpotential zu einem Elektronenakzeptor mit positiverem Redoxpotential über Redoxreaktionen übertragen. Über die Potentialdifferenz zwischen Elektronendonator und -akzeptor wird dabei ein Ionengradient aufgebaut, der letztendlich zur ATP-Synthese genutzt werden kann, es kommt somit zu einer Umwandlung des elektrischen Potentials in chemische Energie (Anraku 1988). Die Mehrheit der Mikroorganismen verwendet für diese energieliefernden Reaktionen membrangängige redoxaktive Komponenten, sodass die entsprechenden Reaktionen im Zellinneren ablaufen. Einige Mikroorganismen sind jedoch dazu in der Lage unlösliche Substanzen als Elektronendonator bzw. -akzeptor zu nutzen. Diese Mikroorganismen haben sich durch die Entwicklung unterschiedlicher Elektronentransportketten an die verschiedenen äußeren Begebenheiten angepasst (Hernandez 2001). Den Mechanismus, bei dem Elektronen in eine Zelle hinein (oder aus dieser heraus) übertragen werden, bezeichnet man als extrazellulären Elektronentransport. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei Formen des EET, dem direkten und dem indirekten EET (Gralnick and Newman 2007; Rabaey *et al.* 2007). In Abbildung 2 (I.-III.) sind die unterschiedlichen Möglichkeiten des EET auf eine Anode schematisch dargestellt.

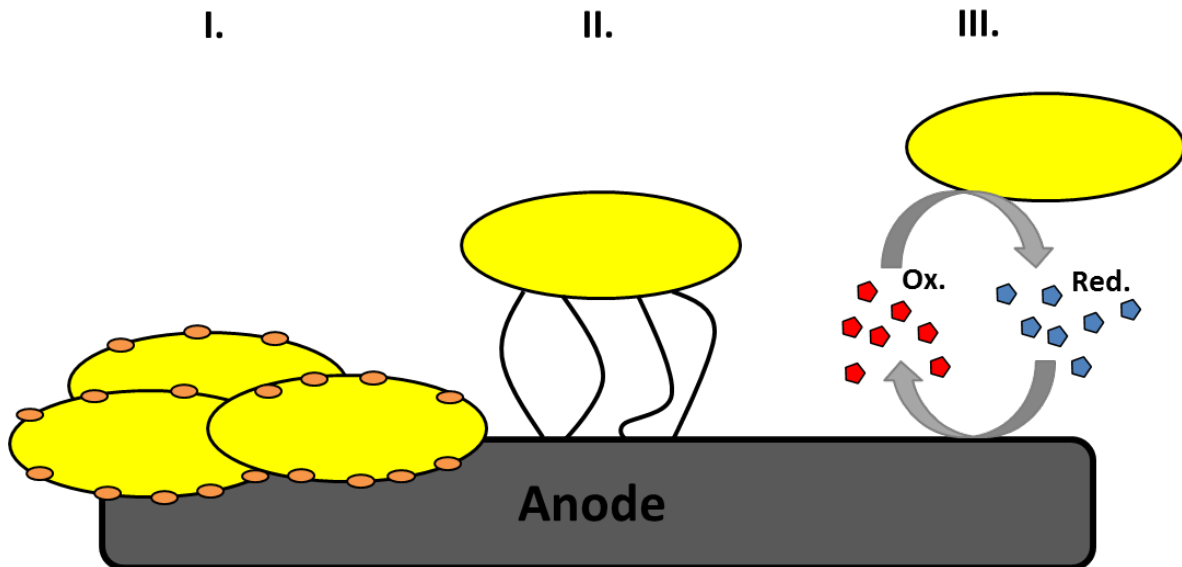


Abbildung 2: Schematische Darstellung des extrazellulären Elektronentransports auf eine Anode. I Direkter EET, vermittelt über Proteine in der Membran der Zellen. II Direkter EET, vermittelt über Zellofortsätze. III Indirekter Elektronentransfer, vermittelt über redoxaktive Elektronen-shuttles.

1.2.1 Direkter extrazellulärer Elektronentransport auf eine Anode

Eine relativ große Bandbreite an Mikroorganismen ist grundsätzlich zum EET auf unlösliche Materialien bzw. eine Anode befähigt (Weber *et al.* 2006). Zu den am besten verstandenen unter ihnen zählen die Modellorganismen für die Anodenatmung: *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens* (Thrash and Coates 2008; Ross *et al.* 2011; Bond and Lovley 2003). Beide Organismen sind zur sogenannten dissimilatorischen Eisenreduktion fähig, einer der ursprünglichsten Formen mikrobieller Atmung, bei der unlösliches Fe(III) zu Fe(II) reduziert wird (Weber *et al.* 2006). Um die Elektronen aus den intrazellulären Atmungsketten auf die Zelloberfläche zu transferieren, haben diese Organismen spezielle Mechanismen des direkten EET entwickelt (Kato 2015), die im Folgenden exemplarisch für *S. oneidensis* dargestellt werden sollen. Eine Übersicht ist Abbildung 3 zu entnehmen.

Im ersten Schritt der Atmungskette werden Elektronen durch die Oxidation von NADH, an einer membranständigen Oxidoreduktase, in den Menachinonpool in der cytoplasmatischen Membran übertragen (Myers and Myers 2000). Von dort aus werden die Elektronen über eine erweiterte Elektronentransportkette an die Zelloberfläche weitergeleitet. Eine zentrale Rolle spielt dabei ein komplexes Netzwerk aus mehreren Proteinen, welches neben der Aufgabe des Elektronentransportes auch als Elektronenspeicher dient (Schuetz *et al.* 2009).

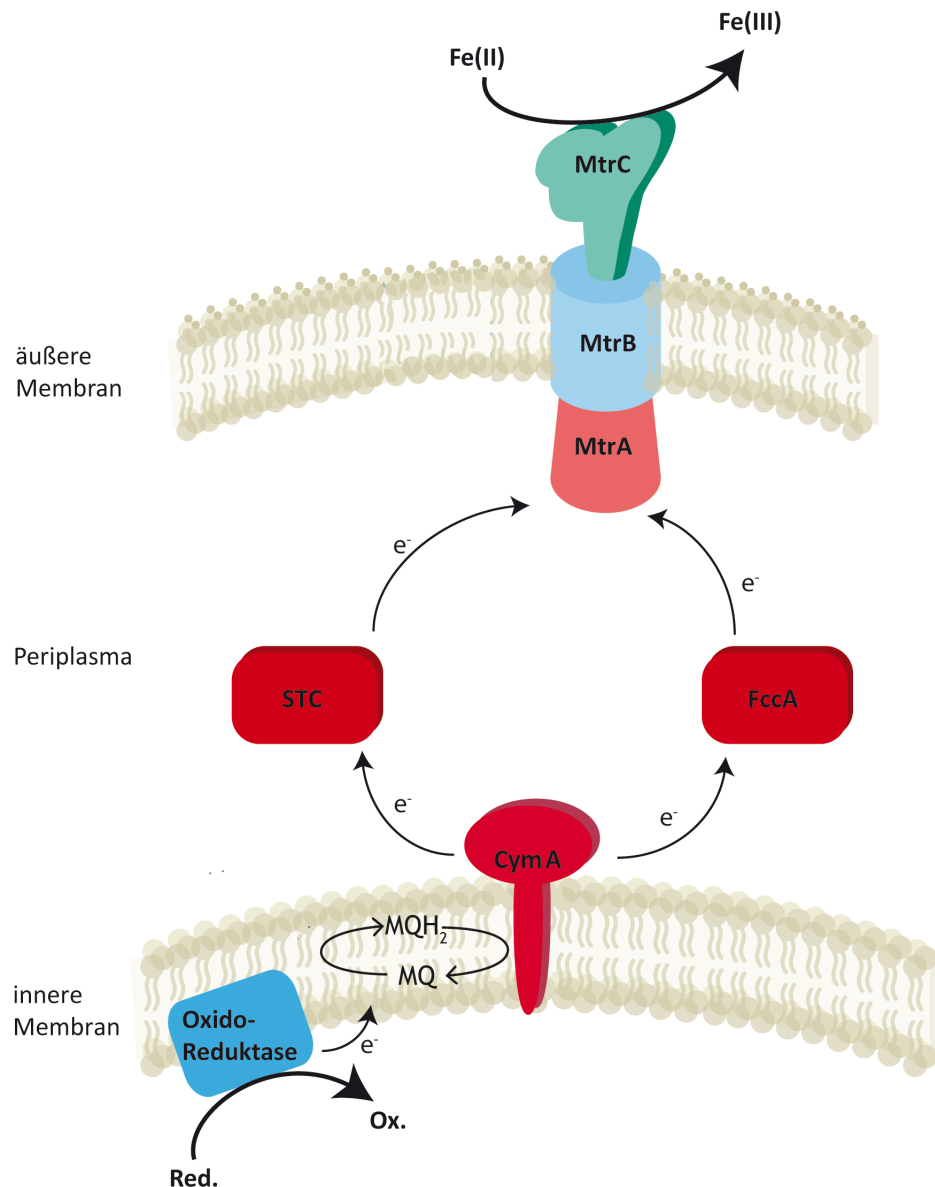


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der verlängerten Elektronentransportkette in *Shewanella oneidensis* (verändert aus Sturm (Sturm 2014)).

Viele Proteine, die an dem Transfer der Elektronen zur Zelloberfläche beteiligt sind, gehören zur Familie der *c*-Typ Cytochrome (Bücking *et al.* 2010; Clarke *et al.* 2008). Die Redox-Eigenschaften eines Cytochroms werden bestimmt über eine oder mehrere Häm-Gruppen, die als Cofaktoren kovalent mit dem Proteinerückgrat verbunden sind. CymA (**C**ytoplasmatisches **m**embraneprotein **A**) ist ein *c*-Typ Cytochrom mit vier Häm-Gruppen, welches in das Periplasma ausgerichtet und mit einer Transmembrandomäne in der cytoplasmatischen Membran verankert ist. CymA nimmt die Elektronen aus dem Menachinonpool auf und gibt diese an im Periplasma lokalisierte Reduktasen oder andere Cytochrome weiter. Die zentrale

Rolle dieses Proteins wird dadurch deutlich, dass eine *cymA* Deletionsmutante ein deutliches Defizit bezüglich der Reduktion vieler Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen zeigt (Myers and Myers 1997). Von CymA können die Elektronen im Periplasma an unterschiedliche Proteine abgegeben werden. Hier sind z.B. FccA (**f**lavoc**yc**hrome **c**), STC (**s**mall **t**etra**h**eme **cy**tochrome) und MtrA (**m**etal **r**educing **p**rotein **A**) zu nennen. FccA und STC sind dabei die mengenmäßig am häufigsten vertretenen Proteine im Periplasma und für die Verteilung der Elektronen in eben jenem zuständig (Maier *et al.* 2003; Sturm *et al.* 2015). Dem Decahämcytochrom MtrA wird besondere Bedeutung zugeschrieben, denn bei einer Deletion des Gens für MtrA können *S. oneidensis* Zellen Eisen(III)-Citrat und Mangan(IV)-oxid nicht mehr reduzieren, wohingegen die Reduktion von anderen Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Nitrit, DMSO, Thiosulfat und Sulfat nicht eingeschränkt zu sein scheint (Bretschger *et al.* 2007; Beliaev *et al.* 2001). Nachdem die Elektronen das Periplasma durchquert haben, werden sie über den MtrABC-Komplex an die Zelloberfläche geleitet (Hartshorne *et al.* 2009). Dieser stabile Komplex besitzt eine 1:1:1 Stöchiometrie und besteht aus dem β -barrel Protein MtrB, welches die äußere Membran durchspannt und dabei MtrA (im Periplasma) mit MtrC verbindet (Ross *et al.* 2011). Das Decahäm-c-Typ-Cytochrom MtrC hat innerhalb des Komplexes die Funktion der terminalen Reduktase (Myers and Myers 2003; Hartshorne *et al.* 2007).

Zusätzlich zu dem direkten Kontakt der Zellen über Proteinkomplexe in den äußeren Membranen der Bakterien bilden sowohl *S. oneidensis* wie auch *G. sulfurreducens* Zellen leitfähige Fortsätze (Abbildung 2-II) aus, die es den Zellen erlauben, Elektronen über gewisse Distanzen hinweg direkt auf einen externen Elektronenakzeptor zu übertragen. Trotz der Analogie dieser Fortsätze unterscheiden sie sich bezüglich ihres Aufbaus und der Funktionsweise. Bei den *S. oneidensis* Fortsätzen scheint es sich um Ausstülpungen der äußeren Membran zu handeln, welche mit periplasmatischer Flüssigkeit gefüllt sind und bei denen dieselben Multihäm-Cytochrome für den EET verantwortlich sind wie bei dem oben beschriebenen direkten Kontakt der ganzen Zelle (Pirbadian *et al.* 2014). Bei den Zellfortsätzen von *G. sulfurreducens* hingegen handelt es sich um Typ-IV Pili ähnliche Strukturen, die wahrscheinlich metallähnliche Leitungsmechanismen aufweisen. Die genaue Funktionsweise bedarf allerdings weiterer Nachforschung und wird derzeit intensiv geprüft (Malvankar *et al.*, 2015; Lovley and Malvankar 2015; Snider *et al.* 2012).

1.2.2 Indirekter extrazellulärer Elektronentransport auf eine Anode

Neben dem direkten Kontakt zwischen einem Mikroorganismus und einer Zelle können auch in Lösung befindliche Stoffe dazu dienen, Elektronen zwischen einer Elektrode und einem Organismus zu transportieren (Abbildung 2-III). Diese sogenannten Elektronenshuttles können an der Elektrode oxidiert werden, zu den Organismen diffundieren, von diesen reduziert werden, um dann wieder zur Elektrode zu wandern und dort reoxidiert zu werden. Dieser Vorgang kann dabei mehrmals wiederholt werden (Gralnick and Newman 2007). Als Elektronenshuttle können sowohl endogene, redoxaktive Sekundärmetabolite dienen, die von den jeweiligen Organismen selbst gebildet und sekretiert werden (z.B. Flavine, Phenazine), oder auch exogene Substanzen wie beispielsweise Huminstoffe (Velasquez-Orta *et al.* 2010; Shen *et al.* 2014). Der Vorteil eines Elektronenshuttles ist, dass auch weit entfernte Elektronenakzeptoren nutzbar werden. In METs kommen Elektronenshuttles häufig zum Einsatz (Kardi *et al.* 2016; TerAvest *et al.* 2014).

1.2.3 Direkter Elektronentransport von einer Kathode

Die mechanistischen Details, die der Aufnahme von Elektronen von einer Elektrode zugrunde liegen, sind zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt (Rosenbaum *et al.* 2011). Es wird jedoch angenommen, dass hierbei Mechanismen involviert sind, die analog zum EET auf eine Anode fungieren. Einige dieser Prozesse sollen im Folgenden aufgezählt werden. Abbildung 4 (I-IV) liefert eine Übersicht über die möglichen Mechanismen des EET von einer Kathode.

Eindeutige Nachweise zur direkten Aufnahme von Elektronen von einer Kathode stammen aus Versuchen mit den Modellorganismen für Anodenwachstum *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens*. Diese beiden Organismen sind in der Lage, Fumarat oder Nitrat zu reduzieren, wenn ihnen Elektronen von einer Kathode als einzige Energiequelle zur Verfügung stehen (Gregory *et al.* 2004; Summers *et al.* 2010; Ross *et al.* 2011). Darüber hinaus waren *S. oneidensis* Zellen, bei denen Komponenten der verlängerten Elektronentransportkette zur Zelloberfläche deletiert wurden, nicht mehr dazu befähigt, Elektronen von der Kathode aufzunehmen (Ross *et al.* 2011). Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer bidirektional fungierenden Elektronentransportkette, welche einen direkten Kontakt zu einer Anode oder Kathode ermöglicht (Ross *et al.* 2011). Die Aufnahme

von Elektronen von einer Kathode durch *G. sulfurreducens* scheint ebenfalls direkt abzulaufen, denn eine Deletion der Hydrogenasen führte zu keiner Veränderung in Bezug auf die Aufnahme von kathodischen Elektronen und die damit verbundene Reduktion von Fumarat (Gregory *et al.* 2004). Es macht allerdings den Anschein, dass *G. sulfurreducens* Zellen einen anderen Weg für die Aufnahme der Elektronen von der Kathode nutzen als für deren Abgabe an Anoden (Strycharz *et al.* 2011).

Eine weitere Klasse von Organismen, für die eine direkte Interaktion mit der Kathode angenommen wird, sind eisenoxidierende Mikroorganismen (*ferrous oxidizing* - FeOx). Obwohl Eisen(II) meist in löslicher Form vorkommt, ist in vielen FeOx Organismen eine erweiterte Elektronentransportkette etabliert, die ähnlich derjenigen in eisenreduzierenden Organismen ist und dem Import von Elektronen dient. Durch die Oxidation der Eisenspezies an der Zelloberfläche verhindern FeOx Mikroorganismen die Ablagerung des oxidierten Eisens im Zellinneren. Die Proteine PioA und PioB des phototrophen eisenoxidierenden Bakteriums *Rhodospseudomonas palustris* sind z.B. homolog zu MtrA und MtrB aus *S. oneidensis*. Die Deletion der Gene für diese Proteine in *Rh. palustris* TIE-1 resultiert in einer 30 % geringeren Aufnahme von kathodischen Elektronen verglichen mit Wildtyp-Zellen und unterstützt damit die These eines direkten Elektronentransfers (Bose *et al.* 2014). Weitere Organismen, für die eine direkte Interaktion mit der Kathode angenommen wird, sind *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Maripaludis ferrooxydans*, sowie die acetogenen Bakterien *Clostridium ljungdahlii*, *Sporomusa ovata* und *Moorella thermoacetica* (Nevin *et al.* 2010; Nevin *et al.* 2011; Ishii *et al.* 2015; Summers *et al.* 2010).

1.2.4 Indirekter Elektronentransport von einer Kathode

In vielen Arbeiten zur mikrobiellen Elektrosynthese kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass der Elektronentransfer nicht direkt abläuft, sondern stattdessen molekularer Wasserstoff, der an der Kathode entstanden ist, als Elektronendonator für die jeweiligen Organismen dient (Lovley and Nevin 2013; Lohner *et al.* 2014; Beese-Vasbender *et al.* 2015). Das chemische Redoxpotential für H^+/H_2 liegt bei -414 mV vs. SHE, des Weiteren konnten Yates *et al.* die Entwicklung von H_2 an Graphit-Block Elektroden beginnend ab einem Potential von -600 mV vs. SHE detektieren (Deutzmann *et al.* 2015; Ishii *et al.* 2015; Yates *et al.* 2014). Neben der beschriebenen abiotischen Wasserstoffentwicklung an Kathoden

konnten Deutzmann *et al.* weiterhin eine durch extrazelluläre Enzyme katalysierte Wasserstoffproduktion in einem MES-Reaktor nachweisen (Deutzmann *et al.* 2015). Ein Hydrogenase-defizienter *Methanococcus maripaludis* Stamm erbrachte bei einem Potential von -600 mV vs. SHE in einem Elektromethanogenese Aufbau nur noch 10 % der Methanausbeute verglichen mit dem Wildtyp (Lohner *et al.* 2014).

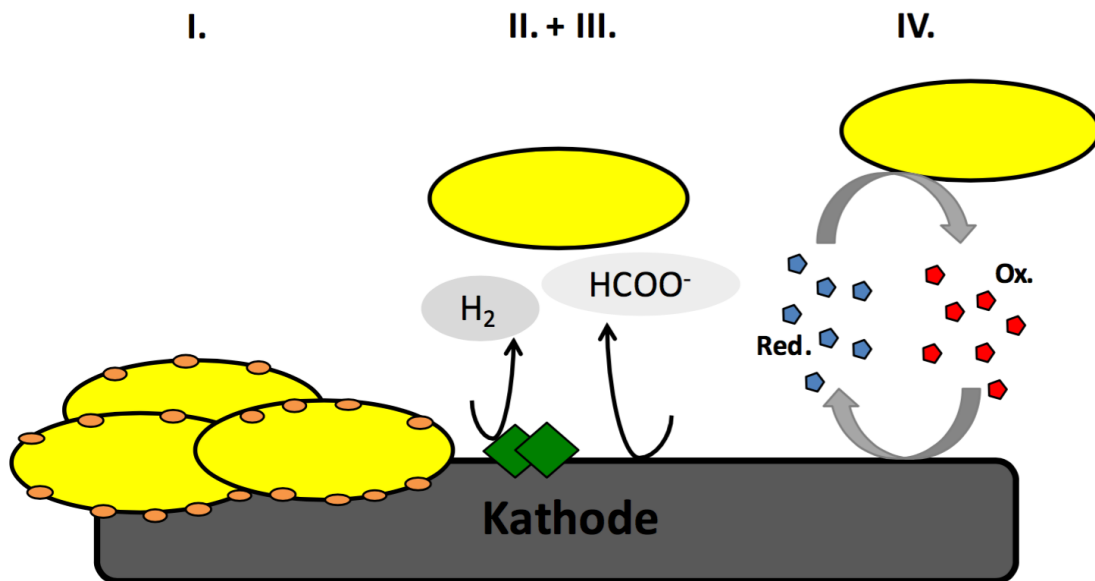


Abbildung 4: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen zum extrazellulären Elektronentransport von einer Kathode in die Zelle. I Direkter EET, vermittelt über Proteine in der Membran der Zelle. II Verwendung von Wasserstoff oder Formiat als Elektronendonor, produziert durch extrazelluläre Enzyme. III Verwendung von Wasserstoff oder Formiat als Elektronendonor, abiotisch an der Kathode entstanden. IV Indirekter Elektronentransfer, vermittelt über redoxaktive Elektronenshuttles.

In der nachfolgenden Studie wurde festgestellt, dass zellfreies, gebrauchtes Medium einer *M. maripaludis* Vorkultur ausreichte, um die zuvor beobachteten Stromraten zu erklären. Die Analyse des Mediums ergab, dass Hydrogenasen darin enthalten waren und dass, durch diese produzierter, Wasserstoff und nicht die Kathode selbst den Elektronendonor für die Zellen darstellte (Deutzmann *et al.* 2015). Neben Wasserstoff wurde durch das zellfreie Medium außerdem auch die Produktion von Formiat ermöglicht (Abbildung 4-II und-III). Dies dient als Hinweis darauf, dass auch Formiat als möglicher Elektronendonor, und darüber hinaus als Kohlenstoffquelle, für elektroautotrophe Mikroorganismen dienen kann

(Deutzmann *et al.* 2015). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in Experimenten mit *Sporomusa sphaeroides* gemacht, auch hier wurden die Produktionsraten durch zellfreies, gebrauchtes Medium gesteigert (Deutzmann *et al.* 2015). Weiterhin wurde für Fe(II) und Ammonium beschrieben, dass sie als Shuttle in MES dienen (Lovley and Nevin 2013).

Darüber hinaus können, wie auch beim indirekten EET in MFC-Aufbauten, weitere endogene oder exogene Stoffe als Elektronenshuttle für die MES dienen (Abbildung 4-IV). Zu diesem Themengebiet gibt es bisher allerdings kaum publizierte Ergebnisse. Als typische exogene Stoffe sind dabei Methylviolett, AQDS oder Neutralrot im Gespräch (Aulenta *et al.* 2007; Hatch and Finneran 2008; Park and Zeikus 1999). Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass auch endogene Stoffe (z.B. Phenazine, Riboflavin, Vitamin B12 oder DNA) am EET bei der mikrobiellen Elektrosynthese eine Rolle spielen (Freguia *et al.* 2010; Rosenbaum *et al.* 2011). Ein maßgeblicher Vorteil der Verwendung von Elektronenshuttles in der mikrobiellen Elektrosynthese ist, dass hiermit auch Organismen, die nicht zu direktem EET befähigt sind, Elektronen von einer Kathode beziehen können (Harrington *et al.* 2015).

1.3 CO₂-Fixierungswege in Mikroorganismen

Die CO₂-Fixierung ist einer der wichtigsten Syntheseprozesse auf der Erde, ihr haben wir letztendlich das Vorkommen aller reduzierten organischen Moleküle zu verdanken (Fuchs and Schlegel 2014). Die Fähigkeit CO₂ zu fixieren war ursprünglich auf das Reich der Prokaryoten beschränkt, unter welchen die Autotrophie noch heute eine weit verbreitete Lebensform darstellt. Erst durch die Endosymbiose von autotrophen photosynthetisch aktiven Cyanobakterien wurde es möglich, dass Pflanzen zur Assimilation von Kohlenstoff aus CO₂ befähigt wurden. Neben dem Calvin-Benson-Zyklus (grüne Pflanzen, Cyanobakterien) sind gegenwärtig fünf weitere Wege der autotrophen CO₂-Fixierung beschrieben und es ist durchaus möglich, dass in den nächsten Jahren noch weitere hinzukommen werden (Berg 2011). Eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Wege zur CO₂-Fixierung kann Tabelle 1 entnommen werden. Allen bisher beschriebenen elektroautotrophen Organismen ist gemein, dass sie den Wood-Ljungdahl-Weg (reduktiver Acetyl-CoA-Weg) zur Fixierung von CO₂ aufweisen. Dieser Stoffwechselweg ist besonders bei acetogenen Bakterien und methanogenen Archaeen vertreten, welche nahe der

thermodynamischen Grenze leben (aufgrund der geringen Energieausbeute) (Madigan *et al.* 2009). Diese Mikroorganismen nutzen den Wood-Ljungdahl-Weg neben der Fixierung von CO₂ auch zur Energiekonservierung durch die Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten in Form von H⁺- oder Na⁺-Ionen (Ragsdale and Pierce 2009; Thauer *et al.* 2008; Biegel and Müller 2010). Einige Enzyme, wie die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase, sind stark empfindlich gegenüber Sauerstoff, weswegen der Wood-Ljungdahl-Weg stets unter strikt anaeroben Bedingungen ablaufen müsste. Manche Organismen, die diesen Weg nutzen, wurden jedoch an Standorten isoliert, an denen geringe Mengen an Sauerstoff vorkommen. Diese Organismen haben Mechanismen entwickelt (Katalasen, Peroxidasen, Synergien mit O₂ konsumierenden Partnern), die es ihnen ermöglichen, auch unter microaeroben Bedingungen zu bestehen (Drake *et al.* 2008; Shima *et al.* 2001). Der Wood-Ljungdahl-Weg ist in Organismen aller Temperaturbereiche zu finden, bis hin zu extrem thermophilen Archaea (Takai *et al.* 2008). Obwohl der Wood-Ljungdahl-Weg aus energetischer Sicht den effektivsten Weg der CO₂-Fixierung darstellt, ist es wahrscheinlich, dass es auch elektroautotrophe Mikroorganismen mit anderen CO₂-Fixierungswegen gibt.

Tabelle 1: Zusammenstellung bekannter CO₂-Fixierungswege. Angabe der Schlüsselenzyme, der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und dem Vorkommen.

| CO ₂ -Fixierungsweg | Schlüsselenzyme | Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff | Vorkommen |
|---|---|--------------------------------------|--|
| Calvin-Zyklus (<i>Calvin-Benson-Bassham-Zyklus</i>) | Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, Phosphoribulokinase (nicht immer vorhanden) | aerob | Cyanobacteria, Mehrheit der aeroben und fakultativ aeroben Eubacteria |
| Reduktiver Citratzyklus (<i>Arnon-Buchanan-Zyklus</i>) | Citrat spaltende Enzyme, z.B. ATP-Citrat-Lyase, α-Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Fumarat-Reduktase | anaerob, microaerob | Nitrospirae, Aquificales, Chlorobiales, ε-Proteobacteria, wenige α- und δ-Proteobacteria |
| Reduktiver Acetyl-CoA-Weg (<i>Wood-Ljungdahl-Weg</i>) | CO-Dehydrogenase/ Acetyl-CoA-Synthase | strikt anaerob | methanogene und sulfatreduzierende Archaea, acetogene Firmicutes, einige Spirochaeta, viele δ-Proteobacteria |

| | | | |
|--|---|----------------|---|
| 3-Hydroxypropionat-Bizyklus | Malonyl-CoA-Reduktase, Propionyl-CoA-Synthase, Malyl-CoA-Lyase | microaerob | <i>Chloroflexaceae</i> |
| 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus | 4-OH-Butyryl-CoA-Dehydratase, viele multifunktionale Enzyme | aerob | aerobe Sulfolobales (Crenarchaeota), Thaumarchaeota |
| Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus | 4-OH-Butyryl-CoA-Dehydratase, Crotonyl-CoA-Hydratase/(S)-3-OH-butyryl-CoA-Dehydrogenase | strikt anaerob | anaerobe Thermoproteales, Desulfurococcales (Crenarchaeota) |

1.4 Elektroautotrophe Mikroorganismen

Wie bereits im Kapitel zu mikrobieller Elektrosynthese beschrieben, kann man grundsätzlich zwei Mechanismen unterscheiden über die Mikroorganismen, durch die Elektronen von einer Kathode in ihrer Produktsynthese beeinflusst werden. Bei der Elektrofermentation kommt es durch die zusätzlichen Elektronen zu einer Verschiebung der Gärungsbilanz hin zu stärker reduzierten Produkten. Auf der anderen Seite können die kathodischen Elektronen von einigen Mikroorganismen direkt als Elektronendonator genutzt werden, um damit in einer (an)aeroben Atmung Energie zu gewinnen. In diesem Abschnitt werden nur diejenigen Organismen behandelt, welche die Kathode als alleinigen Elektronendonator für ihren Stoffwechsel benutzen. Der Fokus liegt dabei auf Mikroorganismen, welche die kathodischen Elektronen für die Fixierung von CO₂ verwenden. Bei der Literaturrecherche zu diesem Thema wird deutlich, dass man zwischen zwei bedeutenden Arten mikrobiell katalysierter Elektrosynthese-Systeme unterscheiden muss. Zum einen der Arbeit mit definierten Organismen und zum anderen der Charakterisierung von Mischkulturen. Beide haben ihre Vor- und Nachteile. Aus Arbeiten mit einem definierten Organismus können leichter mechanistische Aussagen getroffen werden bezüglich des Elektronentransfers von der Kathode auf die Organismen und den damit verbundenen Stoffwechselwegen. Bei der Verwendung einer Mischkultur hingegen muss bei der Arbeit weniger auf Sterilität geachtet werden und es wird weiterhin die Möglichkeit eröffnet, neue Mikroorganismen ausfindig zu machen, die zu mikrobieller Elektrosynthese befähigt sind. Ein Nachteil des Arbeitens mit einer Mischkultur ist hingegen die Schwierigkeit, ein bestimmtes Produkt zu generieren, da

es durch die Anreicherung mixotropher Organismen zu einem sofortigen Abbau des gebildeten Produktes kommen kann.

Tabelle 2: Mikroorganismen in Elektrosynthese-Systemen. Angegeben sind, wenn möglich das Kathodenmaterial, das Potential gegen die SHE, die bisher postulierte Art des EET, sowie die Stromdichte (J).

| Organismus | Kathode | Elektronen-akzeptor | Kommentar | Referenz |
|---|---|----------------------------------|---|--------------------------------|
| <i>Sporomusa ovata</i> | Graphit Stab -400 mV vs. SHE | CO ₂ | direkter EET | (Nevin <i>et al.</i> 2010) |
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | Graphit-Vlies 244 mV vs. SHE | O ₂ | direkter EET J = 5 A/m ² | (Carbajosa <i>et al.</i> 2010) |
| <i>Clostridium ljungdahlii</i> <i>Clostridium aceticum</i> | Graphit-Stab -400 mV vs. SHE | CO ₂ | direkter EET | (Nevin <i>et al.</i> 2011) |
| <i>Moorella thermoacetica</i> | Graphit-Stab -400 mV vs. SHE | CO ₂ | direkter EET | (Nevin <i>et al.</i> 2011) |
| <i>Sporomusa silvacetica</i> <i>Sporomusa sphaeroides</i> | Graphit-Stab -400 mV vs. SHE | CO ₂ | direkter EET | (Nevin <i>et al.</i> 2011) |
| <i>Shewanella oneidensis</i> | Graphit-Vlies -360 mV vs. SHE | Fumarat | direkter EET J = 17 µA/cm ² | (Ross <i>et al.</i> 2011) |
| <i>Ralstonia eutropha</i> | Indium Folie -1401 mV vs. SHE | CO ₂ | indirekter EET über Formiat | (Li <i>et al.</i> 2012) |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i> | Edelstahl -401 mV vs. SHE | CO ₂ | direkter EET J = 30 A/m ² | (Soussan <i>et al.</i> 2013) |
| <i>Sporomusa ovata</i> | modifiziertes Kohlenstoff-Gewebe -401 mV vs. SHE | CO ₂ | direkter EET J = 475 mA/m ² | (Zhang <i>et al.</i> 2013) |
| <i>Mariprofundus ferrooxydans</i> | Graphit -76 mV vs. SHE | CO ₂ , O ₂ | direkter EET | (Summers <i>et al.</i> 2013) |
| <i>Rhodopseudomonas palustris</i> | Graphit-Stab 100 mV vs. SHE | CO ₂ | mit Licht J = 1.5 µA/cm ² | (Bose <i>et al.</i> 2014) |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | Graphit-Platte -401 mV vs. SHE | O ₂ | indirekter EET über AQDS | (Sasaki <i>et al.</i> 2014) |

| | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|---|
| <i>Methanococcus maripaludis</i> | Graphit-Stab -600 mV vs. SHE | CO ₂ | indirekter EET über H ₂ /Formiat | (Lohner <i>et al.</i> 2014; Deutzmann <i>et al.</i> 2015) |
| <i>Kyrpidia sp.</i> | Graphit-Vlies -500 mV vs. SHE | CO ₂ , O ₂ | direkter EET J = 0.438 A/m ² | (Reiner 2015) |

Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu den Organismen, die bisher in MES-Aufbauten getestet wurden. Aufgelistet sind die verwendeten Elektrodenmaterialien und das angelegte Potenzial gegen SHE, sowie wenn möglich die Art des EET und die erreichte Stromdichte (J). Die meisten bisher beschriebenen Organismen, die zu elektroautotrophem Wachstum befähigt sind, gehören zu den acetogenen Mikroorganismen. Die Gram-negativen Organismen *Sporomusa ovata*, *S. sphaeroides* und *S. silvatica*, sowie die Gram-positiven *Clostridium ljungdahlii*, *C. aceticum* und *Moorella thermoacetica*, sind alle in der Lage, CO₂ mithilfe von kathodischen Elektronen zu reduzieren (Nevin *et al.* 2011). Von allen bisher in MES-Systemen getesteten acetogenen Bakterien erbrachte *S. ovata* die beste Leistung mit einer Acetatproduktion von bis zu 282 mM/d*m² und einer Effizienz von mehr als 80 % bezüglich der Umwandlung der elektrischen Energie zu Acetat (Nevin *et al.* 2011; Nie *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; Gong *et al.* 2013). Allgemein zeigen acetogene Organismen eine vergleichsweise hohe Effizienz bei der Umwandlung der elektrischen Energie zu einem Produkt, gegenüber Organismen mit anderen CO₂-Fixierungswegen, da CO₂ für sie den einzigen Elektronenakzeptor darstellt; sie nutzen den Wood-Ljungdahl-Weg für die CO₂-Fixierung (Drake *et al.* 1997; Ragsdale and Pierce 2009).

Neben den acetogenen Bakterien wurde Elektroautotrophie auch für autotrophe Fe(II)-oxidierende Bakterien beschrieben. Unter ihnen wurde für das acidophile, aerobe Bakterium *A. ferrooxidans* und das neutrophile, aerobe Bakterium *M. ferrooxydans* gezeigt, dass sie mit Elektronen von einer Kathode und CO₂ als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können (Summers *et al.* 2013; Carbajosa *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde das anaerobe phototrophe Fe(II)-oxidierende Bakterium *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 als elektroautotropher Organismus beschrieben (Bose *et al.* 2014).

Tabelle 3: Mischkulturen in Elektrosynthese-Systemen. Angegeben sind, wenn möglich, das Kathodenmaterial, das Potential gegen die SHE, die postulierte Art des EET, sowie die Stromdichte (J).

| Organismus, Inokulum | Kathode | Elektronen-akzeptor | Kommentar | Referenz |
|---|---|---------------------|--|--------------------------------|
| Mischkultur, Sediment | Graphit-Platte -439 oder -539 mV vs. SHE | CO ₂ | J = 52 mA/m ² | (Pisciotta <i>et al.</i> 2012) |
| Mischkultur, Brauereiabwasser | Graphit-Granula -590 mV vs. SHE | CO ₂ | | (Marshall <i>et al.</i> 2012) |
| Mischkultur, Belebtschlamm aus Kläranlage | Karbon-Vlies -951 mV vs. SHE | CO ₂ | | (Jiang <i>et al.</i> 2013) |
| Mischkultur, Biofilm aus Marshall, 2012 | Graphit-Granula -590 mV vs. SHE | CO ₂ | | (Marshall <i>et al.</i> 2013) |
| Mischkultur, Sediment aus Moor | Graphit-Faserstab -400 mV vs. SHE | CO ₂ | direkter EET J = 34 mA/m ² | (Zaybak <i>et al.</i> 2013) |
| Mischkultur, Regenwasserteich | Graphit-Platte modifiziert mit Nano-Web RVC -850 mV vs. SHE | CO ₂ | J = 3,7 mA/cm ² | (Jourdin <i>et al.</i> 2015) |
| Mischkultur, Brauereiabwasser | Graphit-Granula -600- -800 mV vs. SHE | CO ₂ | | (LaBelle <i>et al.</i> 2014) |

Tabelle 3 zeigt die Zusammenstellung einiger Arbeiten zur Elektrosynthese mit Mischkulturen. Angegeben sind das Elektrodenmaterial, das jeweilige Potenzial gegen SHE und die Herkunft des Inokulums, sowie wenn möglich die Art des EET und die erreichte Stromdichte.

1.4.1 Thermophile Mikroorganismen in elektrochemischen Systemen

Extreme Bedingungen sind schädlich für die meisten Organismen auf der Erde. Zu solch extremen Bedingungen zählen sowohl physikalische (übermäßige Kälte oder Hitze, besonders saurer oder alkalischer pH, Trockenheit) wie auch geochemische (extreme Nährstoffarmut oder hohe Schwermetallkonzentrationen). Extreme Standorte zeichnen sich

meist durch geringe Artenvielfalt aus, dennoch wurden extremophile Mikroorganismen aus allen drei Reichen (Archaea, Bacteria, Eukaryota) bereits an Extremstandorten gefunden (Bott and Brock 1969; Pikuta, Hoover, and Tang 2007). Vielen dieser Organismen ist es unterdessen nicht möglich, unter nicht-extremen Bedingungen zu überleben. Einige extremophile Spezies sind in der Lage, zweiwertiges Eisen, Schwefel oder anorganische Schwefelverbindungen zu oxidieren, um daraus Energie zu gewinnen (Bonney and Holmes 2012; Dopson and Johnson 2012). Unter den thermophilen Mikroorganismen, die Standorte zwischen 45 °C und 122 °C (momentane Obergrenze für mikrobielles Wachstum) besiedeln, findet man besonders viele Archaea (Takai *et al.* 2008). In der Natur besiedeln diese Organismen Orte mit erhöhter vulkanischer Aktivität, wie beispielsweise hydrothermale Schlote, Geysire oder Fumarolen (Brock 1985; Dick *et al.* 2013). Um an diesen Standorten zu überleben, haben sich bei thermophilen Mikroorganismen viele Anpassungen entwickelt, wie z.B. ein erhöhter GC-Gehalt der DNA und ein höherer Prozentsatz an gesättigten Fettsäuren in der Membran (Lewin, Wentzel, and Valla 2013).

In einem erst kürzlich erschienenen Review von Dopson *et al.* werden die unterschiedlichen extremophilen Mikroorganismen und deren Verwendung in METs zusammengefasst (Dopson *et al.* 2015). Bezogen auf deren Relevanz für diese Arbeit beschränkt sich dieser Abschnitt auf die Verwendung thermophiler Organismen.

Vorteile von biochemischen Arbeiten bei erhöhten Temperaturen ergeben sich z.B. durch die teilweise höhere mikrobielle Aktivität, eine bessere Löslichkeit von Substraten und durch das geringere Risiko von Kontaminationen. Problematisch bei der Arbeit unter erhöhten Temperaturen hingegen ist die gesteigerte Verdunstung des Mediums. Mathis *et al.* konnten zeigen, dass in einer Sediment-MFC bei 60 °C mehr Strom generiert wurde (209-254 mA/m²), im Vergleich dazu lieferte derselbe Aufbau bei 22 °C nur 10-22 mA/m² (Mathis *et al.* 2008). Es gibt bereits mehrere Arbeiten zu Mischkulturen, die in mikrobiellen Brennstoffzellen eingesetzt und bei erhöhten Temperaturen ausgeführt wurden (Jong *et al.* 2006; Ha *et al.* 2012; Wrighton *et al.* 2008). Diese Arbeiten zeigen u.a., dass *Thermincola* Spezies in der Lage sind, Elektronen direkt auf eine Anode zu übertragen (Wrighton *et al.* 2008; Parameswaran *et al.* 2013). Darüber hinaus haben Fu *et al.* einen MEC-Aufbau zur Wasserstoffproduktion bei 55 °C inkubiert und erreichten dabei eine Rückgewinnung der kathodischen Elektronen von ca. 70 %. 16S rDNA Analysen zeigten, dass die Gemeinschaft auf der Biokathode von

Bakterien der Gruppe Firmicutes dominiert wird (Fu *et al.* 2013a). In derselben Arbeitsgruppe wurden auch Versuche zur Elektromethanogenese bei erhöhten Temperaturen durchgeführt (Fu *et al.* 2013b). Im Rahmen einer Masterarbeit an dieser Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass *Kyrpidia* sp. Zellen in der Lage sind, Elektronen mit einem Potential von -500 mV vs. SHE von einer Kathode zu beziehen, die Elektrosynthese-Reaktoren liefen bei 60 °C und erzielten Stromdichten von 0.438 A/m² (Reiner 2015).

Allgemein ist die Verwendung von thermophilen Organismen für die mikrobielle Elektrosynthese noch nicht nennenswert erforscht. Das Arbeiten bei erhöhten Temperaturen würde hier allerdings entscheidende Vorteile mit sich bringen. Eine denkbare biotechnologische Anwendung für die MES bei erhöhten Temperaturen wäre die Verringerung des CO₂-Gehalts aus Abgasströmen von beispielsweise Kohlekraftwerken. Der Einsatz thermophiler Mikroorganismen würde ein vorgezogenes Kühlen der CO₂-haltigen Gasströme unnötig machen.

1.5 Die mikrobielle Elektrosynthese - eine zukunftsweisende Technologie

Betrachtet man Kohlendioxid als Rohstoff und Kohlenstoffquelle, hat dieser eindeutige Vorteile wegen seiner nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit, seines allgegenwärtigen Vorkommens und seiner geringen Kosten. Ein zusätzlicher positiver Nebeneffekt der Nutzung von CO₂ als Ausgangsstoff für Synthesen ist, dass eine Verringerung des CO₂-Gehaltes in jeglicher Form als erstrebenswertes Ziel gilt, da sich eine Abnahme der Konzentration an CO₂ in der Atmosphäre positiv auf den Klimawandel auswirkt (Mikkelsen *et al.* 2010). Neben bereits bestehenden Technologien, bei denen Mikroorganismen genutzt werden, um zu einer Verringerung des CO₂-Gehaltes beizutragen, beispielsweise durch die Nutzung von Algen zur Bioethanolherstellung (Algenol, Sapphire Industries), ergibt sich durch die mikrobielle Elektrosynthese ein weiterer erfolgversprechender Ansatz. Darüber hinaus ergibt sich durch eine Kopplung dieser bioelektrochemischen Fixierung von CO₂ an Energie aus regenerativen Quellen, wie der Wind- oder Solarenergie, mit dem Einsatz der mikrobiellen Elektrosynthese eine interessante Technologie zur temporären Speicherung elektrischer Energie in Form von stabilen chemischen Verbindungen. Derartige Technologien

sind notwendig, da die Produktion von Strom aus regenerativen Energien umweltbedingten Schwankungen unterliegt und eine gänzliche Loslösung von fossilen Brennstoffen im Energiesektor nur durch eine Speicherung des elektrischen Stroms, in Zeiten von Stromspitzen, zu erreichen ist (Nevin *et al.* 2010). Die Technologie der mikrobiellen Elektrosynthese hat gegenüber beispielsweise Photoreaktoren mit Algen den Vorteil, dass ihr Einsatz nicht auf das Vorhandensein von Licht angewiesen ist woraus sich eine enorme Platzersparnis und viele Einsatzmöglichkeiten ergeben. Durch die Verwendung von Mikroorganismen als Katalysatoren einer elektrochemischen CO₂-Fixierung können zudem Nachteile der klassischen Elektrosynthese, wie der hohe Wasserstoffverbrauch, die Verwendung teurer Katalysatoren und ein hoher Energiebedarf, umgangen werden (Ganigué *et al.* 2015).

Trotz ihrer vielen Vorteile und des innovativen Aspekts handelt es sich bei der mikrobiellen Elektrosynthese um eine junge Technologie, deren Erforschung sich noch im Anfangsstadium befindet (Ganigué *et al.* 2015; Nevin *et al.* 2010; Lovley and Nevin 2013). Die Produktionsraten von derzeitigen Systemen sind noch viel zu gering, um einen ökonomisch sinnvollen Einsatz zu bewerkstelligen (Rosenbaum and Henrich 2014). Darüber hinaus ist auch das Produktspektrum mit Acetat und Methan als am häufigsten produzierten Stoffen derzeit begrenzt (Batlle-Vilanova *et al.* 2015). Um eine Optimierung des Systems zu ermöglichen, ist es umso wichtiger, sich mit den molekularen Grundlagen elektrosynthetisch aktiver Mikroorganismen zu beschäftigen. Dabei sind insbesondere ein detailliertes Verständnis der Mikroben-Elektroden Interaktion, sowie der CO₂-Fixierungswege von Nöten. Mit einem besseren Verständnis der dem EET von einer Kathode zugrundeliegenden Mechanismen könnte dann die Integration dieser Elemente in bekannte CO₂-fixierende Organismen erfolgen. Darüber hinaus kann eine gezielte Veränderung der Synthesewege in einem genetisch zugänglichen elektroautotrophen Organismus zur Produktion einer gewünschten Komponente genutzt werden. Eine wichtige Herangehensweise ist dabei die Isolierung und Charakterisierung neuartiger Modellorganismen, die zu elektroautotrophen Wachstum befähigt sind.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es thermophile Mikroorganismen zu finden, die zu elektroautotrophem Wachstum fähig sind. Zu diesem Zweck sollten Anreicherungen aus Umweltproben in Elektrosynthese-Reaktoren mithilfe eines Potentiostaten durchgeführt werden. Über 16S Amplikon-Sequenzanalyse sollten die angereicherten Mikroorganismen auf ihre phylogenetische Zusammensetzung hin untersucht werden. Die organismische Verteilung sollte über CARD-FISH Analysen bestätigt werden. Im Anschluss sollten mögliche StoffwechsellLeistungen der Gemeinschaft, der auf der Kathode befindlichen Organismen, untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte ein Metagenom erstellt werden, welches im Folgenden als Grundlage zur Analyse eines Metatranskriptoms genutzt werden sollte. Bei allen durchgeführten Analysen waren die zentralen Fragen, die es zu beantworten galt: Handelt es sich bei den angereicherten Spezies um autotrophe Mikroorganismen? Welche der bekannten CO₂-Fixierungswege operieren in dem etablierten System? Wie läuft der Elektronentransfer von der Kathode zu den Mikroorganismen ab? Handelt es sich dabei um einen direkten, oder einen durch lösliche Substanzen vermittelten Elektronentransfer? Was nutzen die angereicherten Organismen als terminalen Elektronenakzeptor ihrer Atmung? Die Fähigkeit der Mikroorganismen zur Fixierung von CO₂ mit der Energie aus kathodischen Elektronen sollte weiterhin bestätigt werden. Zu diesem Zweck sollten Versuche mit ¹³C markiertem Bicarbonat unternommen werden. Im Anschluss an die Charakterisierung der Gemeinschaft an elektroautotrophen Mikroorganismen, war es ein weiteres Ziel einzelne Organismen aus der Gemeinschaft zu isolieren und diese auf ihre Fähigkeit zur Elektroautotrophie hin zu untersuchen.

3 Material

3.1 Aufbau des Elektrosynthese-Reaktors

Der in dieser Arbeit verwendete Elektrosynthese-Reaktor wurde von Frederik Golitsch entworfen und ist wie in Abbildung 5 zu sehen aufgebaut. Er wurde erstmals in der Arbeit von Sturm-Richter *et al.* 2015 beschrieben (Sturm-Richter *et al.* 2015). Bei dem Aufbau handelt es sich um einen klassischen Einkammeraufbau, bei dem sich Arbeitselektrode (AE), Referenzelektrode (RE) und Gegenelektrode (GE) in ein und demselben Kompartiment befinden. Die GE befindet sich in einer porösen Glasfritte (Porengröße 1-1,6 μm , ROBUGlas, Hattert), was einerseits einen konstanten Austausch des Elektrolyten erlaubt, andererseits aber größtenteils verhindert, dass die Organismen zwischen den Kompartimenten hin- und herwechseln. Als Kathodenmaterial diente ein Graphitvlies (SIGRATHERM; SGL Group, Wiesbaden), welches eine Dicke von 1 mm und eine Fläche von 16 cm^2 aufwies. Die GE bestand aus einem Platinnetz (0,5 x 5 cm, 1024 Maschen/ cm^2), welches über einen Platinfaden (Durchmesser 0,06 mm) befestigt war. Als Referenzelektroden wurden Standard-Kalomel-Elektroden (*standard calomel electrode* = SCE) (Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) verwendet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Vereinfachung halber das Potential immer in Bezug auf die Standard-Wasserstoffelektrode (*standard hydrogen electrode* = SHE) angegeben. Ein Potential von 0 mV gegen SHE entspricht einem Potential von -244 mV gegen SCE.

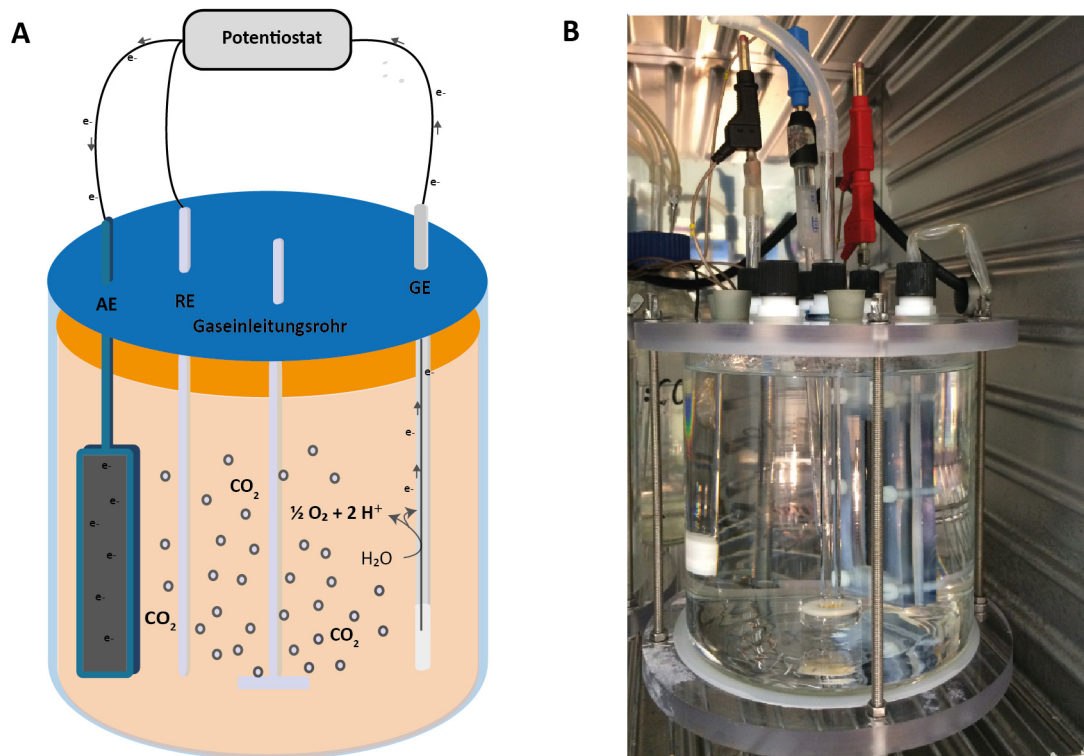


Abbildung 5: Aufbau des Elektrosynthese-Reaktors. A Schematische Darstellung des Reaktors mit Potentiostat, Arbeitselektrode (AE), Referenzelektrode (RE), Gegenelektrode (GE) und Gaseinleitungsrohr. B Bild des Aufbaus, angeschlossen an den Potentiostat im Inkubator.

3.2 Probenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen von der Azoreninsel São Miguel (Portugal). Aufgrund vulkanischer Aktivität sind auf dieser Insel neben vielen Kaltwasser- auch einige Heißwasser- und Thermalquellen zu finden. Die Quellen werden von Grundwasser führenden Schichten gespeist, welche entweder aus erstarrten Lavaströmen oder aus pyroklastischen Ablagerungen bestehen (Cruz and Franca 2006). Entlang der Nordflanke des Vulkans Fogo befinden sich drei Bereiche, in denen Heiß- und Thermalwasser austritt. Acht weitere Quellen findet man rund um die Caldera von Furnas und an deren südlicher Flanke. Alle diese Quellen führen Süßwasser, welches einen sauren pH-Wert und einen relativ hohen Anteil an Schwefelverbindungen aufweist. Die Temperaturen liegen zwischen 30 °C und >100 °C. An der westlichen Seite des Vulkankomplexes Sete Cidades befinden sich zwei weitere Thermalquellen, diese führen jedoch Salzwasser (Cruz and Franca 2006). Eine weitere Probe wurde im Taroko Nationalpark in Taiwan entnommen.

3.2.1 Standorte der Probenentnahme auf São Miguel

Die Probenentnahme erfolgte im Sommer 2012 an verschiedenen Heiß- und Thermalquellen im Westen (*Thermas das Ferraria*) im Zentrum (*Caldeira Velha* und *Caldeiras da Ribeira Grande*) und im südöstlichen Teil (*Caldeiras Lagoa das Furnas* und *Caldeiras das Furnas*) São Miguels. Neben der Probenentnahme an den Heiß- und Thermalquellen wurden auch an zwei Fumarolen in der unmittelbaren Umgebung des Geothermiekraftwerkes *Central Geothérmica Pico Vermelho* Proben genommen. In Abbildung 6 sind die genauen Standorte der Proben-entnahme markiert.



Abbildung 6: Schematische Darstellung von São Miguel. Die Quadrate zeigen die Orte der Probenentnahme an. ① *Thermas da Ferraria*; ② *Central Geothérmica Pico Vermelho*; ③ *Caldeira Velha*; ④ *Caldeiras da Ribeira Grande*; ⑤ *Caldeiras da Lagoa das Furnas*; ⑥ *Caldeiras das Furnas*.

3.2.1.1 Dokumentation der Probenentnahme auf São Miguel

Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet, wenn möglich den Eintrag von organischem Material zu vermeiden. An jeder Entnahmestelle wurde die Temperatur, der pH-Wert und eventuelle weitere Besonderheiten dokumentiert. Die Proben wurden vor Ort in anaerobe Gefäße gegeben und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. In Tabelle 4 sind die Proben und die jeweiligen erhobenen Daten zusammengefasst.

Tabelle 4: Auflistung der entnommenen Proben.

| Probe | Entnahmeort | Temperatur (°C) | pH-Wert | Besonderheiten |
|-------|--|-----------------|---------|--|
| #1 | <i>Caldeira Velha</i> | 75,5 | 1,96 | Wasserprobe, viel org. C |
| #2 | <i>Caldeira Velha</i> | 75,5 | 1,96 | Sediment, viel org. C |
| #3 | <i>Caldeira Velha</i> | n.n. | n.n. | Sediment aus ~5 cm Tiefe |
| #4 | <i>Caldeiras Ribeira Grande</i> | 62,9 | 1,87 | Sediment, org. C, stark schwefliger Geruch |
| #5 | <i>Central Geothérmica Pico Vermelho</i> | n.n. | n.n. | Sand von Fumarolendecke |
| #6 | <i>Central Geothérmica Pico Vermelho</i> | n.n. | n.n. | Sand von Fumarolenboden |
| #7 | <i>Central Geothérmica Pico Vermelho</i> | ~50 | 6 | Biofilm, rote Bereiche |
| #8 | <i>Central Geothérmica Pico Vermelho</i> | ~50 | 6 | Biofilm, rötliche und helle Bereiche |
| #9 | <i>Central Geothérmica Pico Vermelho</i> | ~50 | n.n. | Biofilm, komplett |
| #10 | <i>Caldeiras Lagoa das Furnas</i> | 64,2 | 2,37 | Wasserprobe, mäßig org. C, sehr starker Schwefelgeruch |
| #11 | <i>Caldeiras Lagoa das Furnas</i> | 64,2 | 2,3 | Sediment von Abfluss, mäßig org. C, sehr starker Schwefelgeruch aus siedender Quelle |
| #12 | <i>Caldeiras Lagoa das Furnas</i> | n.n. | 3 | |
| #13 | <i>Caldeiras Lagoa das Furnas</i> | 62,2 | 2,37 | Wasserprobe ankonzentriert, mäßig org. C, sehr starker Schwefelgeruch |
| #14 | <i>Caldeiras Lagoa das Furnas</i> | n.n. | 2,5 | Fumarole nahe Seeufer, sehr heißer Dampf |
| #15 | <i>Caldeiras Furnas</i> | 51,3 | 3,54 | Sediment aus grauer Zone, mäßig org. C |
| #16 | <i>Caldeiras Furnas</i> | 51,3 | 3,54 | Sediment aus roter Zone, mäßig org. C |
| #17 | <i>Caldeiras Furnas</i> | 51,3 | 3,54 | Sediment aus dkl. roter Zone, mäßig org. C |
| #18 | <i>Caldeiras Furnas</i> | 61,9 | 5 | Sediment, wenig org. C |
| #19 | <i>Caldeiras Furnas</i> | 72 | 6 | Sediment, wenig org. C, weiße Filamente |

| Probe | Entnahmeort | Temperatur (°C) | pH-Wert | Besonderheiten |
|-------|---|-----------------|---------|---|
| #20 | Central <i>Geothérmica Pico Vermelho</i> | 52 | 6 | nahe Fumarole, viele Cyanobakterien |
| #21 | Central <i>Geothérmica Pico Vermelho</i> | 60 | 6 | nahe Fumarole, weiß-fleischfarbener Bereich |
| #22 | <i>Caldeiras da Ribeira Grande</i> | 62,9 | 1,87 | Wasserprobe |
| #23 | <i>Caldeiras da Ribeira Grande</i> | 43,8 | 3,44 | Sediment, kein org. C |
| #24 | <i>Caldeira Velha</i> | ~30 | 6,5 | Rostroter Biofilm, kein org. C |
| #25 | <i>Thermas da Ferraria</i> | 60 | n.n. | Salzwasser |

3.2.2 Beschreibung der Probe aus dem Taroko Nationalpark (Taiwan)

Eine weitere Probe stammt aus einer Thermalquelle im Taroko Nationalpark in Taiwan. Diese Probe wurde im Sommer 2013 mit einer Anaerobenflasche entnommen und unter Sauerstoff Ausschluss transportiert. Die Temperatur der Thermalquelle lag zwischen 45 °C und 55 °C und hatte einen pH-Wert von 6,7. Es war kein Eintrag von organischem Material zu vermerken.

3.2.3 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet. Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Primer.

| Nummer | Bezeichnung | Sequenz (5'→3') | Referenz |
|--------|-------------|----------------------|---------------------------------|
| #661 | Bac27F | GAGTTTGATCCTGGCTCA | (Lee <i>et al.</i> 2010) |
| #662 | Uni1525R | AGAAAGGAGGTGATCCAGCC | (Lane <i>et al.</i> 1992) |
| #506 | Uni1492R | GGTTACCTTGTTACGACTT | (McAllister <i>et al.</i> 2011) |
| #1540 | Bac27F_deg | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG | (Lee <i>et al.</i> 2010) |
| #1541 | Uni1525_deg | AGAAAGGAGGTGWTCCARCC | (Lane <i>et al.</i> 1992) |
| #963 | Arch915F | AGGAATTGGCGGGGGAG | (Stahl and Amann 1991) |

| Nummer | Bezeichnung | Sequenz (5'→3') | Referenz |
|--------|-----------------------|---|----------------------------|
| #105 | Arch21F | TTCCGGTTGATCCYGCCGGA | (Kvist <i>et al.</i> 2007) |
| #106 | Arch958R | YCCGGCGTTGAMTCCAATT | (DeLong 1992) |
| #1610 | Bac341F | CCTACGGGNGGCWGCAG | (Stahl and Amann 1991) |
| #1611 | Bac805R | GACTACHVGGGTATCTAATCC | (Stahl and Amann 1991) |
| #1651 | IMGM_Pr1_MID1_A_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_ACGAGTGCCTTGGCAGTC_TCA | Diese Arbeit |
| #1652 | IMGM_Pr1-6_A_rev | CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC_TCA G_GACGGGCRGTGTGTRCAA | Diese Arbeit |
| #1653 | IMGM_Pr2_MID2_A_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_ACGCTCGACA_AGGAATTGGCGGGGGAG | Diese Arbeit |
| #1654 | IMGM_Pr3_MID3_A_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_AGACGCACTC_AGGAATTGGCGGGGGAG | Diese Arbeit |
| #1655 | IMGM_Pr4_MID4_A_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_AGCACTGTAG_AGGAATTGGCGGGGGAG | Diese Arbeit |
| #1656 | IMGM_Pr5_MID5_A_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_ATCAGACACG_AGGAATTGGCGGGGGAG | Diese Arbeit |
| #1657 | IMGM_Pr6_MID6_A_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_ATATCGCGAG_AGGAATTGGCGGGGGAG | Diese Arbeit |
| #1658 | IMGM_Pr7_MID7_B_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_CGTGTCTCTA_CCTACGGGNGGCWGCAG | Diese Arbeit |
| #1659 | IMGM_Pr7-12_B_rev | CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC_TCA G_GACTACHVGGGTATCTAATCC | Diese Arbeit |
| #1660 | IMGM_Pr8_MID8_B_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_CTCGCGTGTCT_CCTACGGGNGGCWGCAG | Diese Arbeit |
| #1661 | IMGM_Pr9_MID9_B_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_TAGTATCAGC_CCTACGGGNGGCWGCAG | Diese Arbeit |
| #1662 | IMGM_Pr10_MID10_B_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_TCTCTATGCG_CCTACGGGNGGCWGCAG | Diese Arbeit |
| #1663 | IMGM_Pr11_MID11_B_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_TGATACGTCT_CCTACGGGNGGCWGCAG | Diese Arbeit |
| #1664 | IMGM_Pr12_MID12_B_for | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_TACTGAGCTA_CCTACGGGNGGCWGCAG | Diese Arbeit |
| #992 | Uni1406R | GACGGGCRGTGTGTRCAA | (Lane <i>et al.</i> 1992) |
| #1914 | Bac530F | GTGCCAGCMGCNGCGG | (Dowd <i>et al.</i> 2008) |
| #1915 | Bac1061R | CRRACGAGCTGACGAC | (Degnan and Ochman 2012) |

3.3 Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten CARD-FISH (catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization) Sonden wurden bei biomers (Ulm), die FISH Sonden bei mwg (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bestellt, eine Auflistung ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die Sonden hatten jeweils am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff oder ein HRP (*horse radish peroxidase*) -Konjugat und wurden über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gereinigt.

Tabelle 6: Verwendete Sonden.

| Name | Sequenz (5'→3') | Spezifität | % FA* | Referenz |
|----------|----------------------------|------------|-------|-----------------------|
| EUB338-I | [CY3] GCTGCCTCCCGTAGGAGT | Bacteria | 0-50 | Amann, 1990 |
| Arch915 | [FITC] GTGCTCCCCGCCAATTCCT | Archaea | 20 | Stahl und amann, 1992 |
| EUB338-I | [HRP] GCTGCCTCCCGTAGGAGT | Bacteria | 0-50 | Amann, 1990 |
| Arch915 | [HRP] GTGCTCCCCGCCAATTCCT | Archaea | 20 | Stahl und amann, 1992 |

* FA = Formamid

3.4 Chemikalien, Enzyme und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Life Technologies (Darmstadt), Roche (Mannheim), AppliChem (Darmstadt) oder VWR (Darmstadt) bestellt. Die Chemikalien wurden in einer Reinheit $\geq 98\%$ oder p.a.-Qualität von den Firmen bezogen. Die verwendeten Kits, Enzyme und Farbstoffe sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Kits, Enzyme und Farbstoffe.

| Produkt | Hersteller |
|---|------------------------------|
| InnuSPEED Soil DNA Kit | Analytic Jena (Jena) |
| RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit | MO BIO (Carlsbad, USA) |
| DNA-free™ Kit | ambion (Thermo Fischer, USA) |
| MessageAmp™-II Bacteria Kit | ambion (Thermo Fischer, USA) |
| MICROBExpress™ Kit | ambion (Thermo Fischer, USA) |
| SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kit | invitrogen (Carlsbad, USA) |
| REPLI-g® Single Cell Kit | QIAGEN (Hilden) |
| LifeGuard™ Soil Preservation Solution | MO BIO (Carlsbad, USA) |
| Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System | Promega (Mannheim) |
| pT7 perfectly blunt cloning Kit | Novagen (Merck, UK) |

| Produkt | Hersteller |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Nitrat-Test (LCK 339) | Hach-Lange (Düsseldorf) |
| Nitrit-Test (LCK 341) | Hach-Lange (Düsseldorf) |
| Ammonium-Test (LCK 304) | Hach-Lange (Düsseldorf) |
| MangoMix™ | Bioline (Luckenwalde) |
| iProof High-Fidelity Polymerase | Biorad (München) |
| GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| 6x DNA Loading Dye Solution | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Midori Green | Biozym (Hessisch Oldendorf) |
| Alexa488-succimidylester | Life Technologies (Darmstadt) |
| Alexa546-succimidylester | Life Technologies (Darmstadt) |
| Thyramine HCl | Sigma (Steinheim) |
| 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Appllichem (Darmstadt) |

4 Methoden

4.1 Anreicherung im Elektrosynthese-Reaktor

Der abnehmbare Deckel, des in Materialien 3.1 beschriebenen Reaktors, wurde mit der Arbeitselektrode, der Gegenelektrode und dem Gaseinleitungsrohr bestückt und dann auf dem Reaktor befestigt. Das als Kathodenmaterial dienende Graphitvlies wurde zunächst mit Isopropanol benetzt, mit Wasser gewaschen und dann in den Deckel eingebaut. Der Reaktor wurde mit dH₂O aufgefüllt, der Deckel aufgebracht und autoklaviert. Die Referenzelektrode wurde erst nach dem Autoklavieren des Reaktors eingesetzt. Für die Anreicherung wurde ein Minimalsalzmedium nach den vorherrschenden Bedingungen in den Quellen, aus denen die Proben stammen, entworfen (Cruz and Franca 2006; Cruz and Amaral 2004). Die Medienzusammensetzung ist Tabelle 9 zu entnehmen. Das Medium wurde unter der Sterilbank in den bereits autoklavierten Reaktor gefüllt, die RE wurde eingebaut und im Inkubator wurde der Gasschlauch über einen 0,2 µm Sterilfilter (Filtropur, Sarstedt) angeschlossen. Das Medium wurde mit N₂/CO₂ (80:20) begast, um die Bedingungen für die anschließende Anreicherung herzustellen.

Tabelle 8: Zusammensetzung Elektrosynthesemedium.

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [g/L] |
|---|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| Elektrosynthese- medium pH 4 mit H ₂ SO ₄ | NH ₄ Cl | 10 | 0,53 |
| | NaCl | 8,7 | 0,15 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,3 | 0,04 |
| | HEPES | 5 | 1,19 |
| Wolfe's Mineralexier | Spurenelemente | 2 % | 1 ml von Stock |
| CaCl ₂ (1 M Stock) | CaCl ₂ | 0,1 | 1 ml von Stock |
| MgSO ₄ (1 M Stock) | MgSO ₄ | 0,012 | 120 µL von Stock |

Alle Medienkomponenten wurden in ddH₂O gelöst und autoklaviert.

Als Spurenelemente wurden das Wolfe's Mineralexier aus dem DSMZ Medium 792 verwendet. Die Zusammensetzung ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Zusammensetzung Wolfe's Mineralexier (DSMZ Medium 792).

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [g/L] |
|---|--|--------------------|----------------|
| Wolfe's Mineral- elixier (1000x) pH 1,0 mit 2,5 N H ₂ SO ₄ | MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 121,0 | 30,0 |
| | MnSO ₄ * H ₂ O | 29,6 | 5,0 |
| | NaCl | 172,0 | 10,0 |
| | FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 3,5 | 1,0 |
| | CoCl ₂ * 6 H ₂ O | 7,6 | 1,8 |
| | CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 6,8 | 1,0 |
| | ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 6,3 | 1,8 |
| | CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 0,4 | 0,1 |
| | KAl(SO ₄) ₂ * 12 H ₂ O | 0,4 | 0,18 |
| | H ₃ BO ₃ | 1,6 | 0,1 |
| | Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O | 0,4 | 0,1 |
| | (NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ * 6 H ₂ O | 7,1 | 2,8 |
| | Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O | 0,3 | 0,1 |
| | NaSeO ₄ | 0,5 | 0,1 |

Zunächst wurde ein pH-Wert von 1 mit verdünnter H₂SO₄ in ddH₂O eingestellt, dann wurden alle Salze zugegeben, gelöst und anschließend autoklaviert.

Über einen AUTOLAB Potentiostat (Metrohm, Utrecht, NL) wurde mithilfe der RE an der Kathode ein konstantes Potential von -350 mV gegen SHE angelegt. Die Anreicherungen wurden im Dunkeln bei 60 °C inkubiert und konstant begast. Als Inokulum dienten ~40 ml einer Mischung aller in Tabelle 4 aufgeführten Proben. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde in einem der Ansätze der HEPES Puffer weggelassen.

4.2 Anreicherung, Isolierung und Zellzucht von Anreicherungen aus dem Reaktor

Nach ca. 24-monatiger Inkubation im Elektrosynthese-Reaktor wurden von den Organismen auf der Kathode Anreicherungen angesetzt, die unabhängig von der Kathode als Elektronendonoren leben sollten. Als Elektronendonator wurde stattdessen H₂ eingesetzt. Als Grundmedium diente eine Abwandlung des DSMZ Mediums 182 für *Sulfolobus* (Tabelle 10), da aus ersten Ergebnissen hervorging, dass Vertreter der *Sulfolobales* eine der vorherrschenden Organismengruppen auf der Kathode darstellen.

Tabelle 10: Zusammensetzung Anreicherungsmedium (nach DSMZ Medium 182).

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [g/L] |
|---|---|--------------------|----------------|
| DSMZ Medium 182 | Hefeextrakt | 0,1 % | 1,0 |
| pH 4.0 - 4,2 mit H ₂ SO ₄ | KH ₂ PO ₄ | 22,04 | 3,0 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 18,92 | 2,5 |
| | MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,81 | 0,2 |
| | CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 1,7 | 0,25 |
| Wolfe's Mineralexier (1000x) | | 0,1 % | 1 ml von Stock |

Ausgehend von dem Grundmedium wurden drei unterschiedliche Anreicherungsstrategien verfolgt. In allen Ansätzen diente H₂ als Elektronendonator und das im Medium enthaltene Sulfat (SO₄²⁻) stellte einen möglichen Elektronenakzeptor dar. In weiteren Ansätzen wurden entweder 2 mM Nitrat (NO₃⁻) oder Sauerstoff (O₂) als weitere Elektronenakzeptoren zugegeben. Um das Fehlen einer unbekanntes essentiellen Komponente zu vermeiden, wurde allen Ansätzen zusätzlich 0,1 % Hefeextrakt zugegeben. Es konnte deswegen nicht ausgeschlossen werden, dass der Hefeextrakt als möglicher Elektronendonator oder als mögliche Kohlenstoffquelle genutzt wurde. Für die initiale Anreicherung wurden ca. 30 ml Medium in 150 ml Schottflaschen gegeben, anaerobisiert, wobei unter Schütteln abwechselnd mit N₂ begast und Vakuum gezogen wurde, und anschließend autoklaviert. Unter der Sterilbank wurde ein Stück der Kathode mit einem Skalpell abgetrennt und direkt in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit Medium (Flüssigphase aus dem Reaktor) gegeben. Das Stück Kathode wurde anschließend in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratories, USA) in das vorbereitete Medium überführt. Schlussendlich wurde die Gasphase gegen H₂/CO₂ (80:20) ausgetauscht und ein leichter Überdruck auf die Flaschen gegeben. Im Verlauf der Kultivierung wurde immer wieder H₂/CO₂ Überdruck auf die Flaschen gegeben. Um eine bessere Verteilung des Wasserstoffs im Medium zu ermöglichen, wurden alle Ansätze schüttelnd bei 60 °C inkubiert.

4.2.1 Kryo-Konservierung

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde von den jeweiligen Anreicherungskulturen 1 ml steril abgenommen und mit 30 % Glycerin oder mit 5 % DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt.

Die so behandelten Kulturen wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und in selbigem gelagert.

4.3 Anreicherung in FeCO₃-Gradientenröhrchen

Bei der Suche nach elektroautotrophen Organismen gibt es mehrere Herangehensweisen. Die wohl innovativste, effektivste und schönste stellt die oben beschriebene (Abschnitt 4.1) dar, bei der direkt im System an einer Kathode auf Mikroorganismen selektiert wird, die Elektronen mit einem bestimmten, über den Potentiostaten vorgegebenen Potential nutzen können. Aufgrund einer eingeschränkten Anzahl an Potentiostatenkanälen wurde als weiterer Ansatz eine klassische Anreicherung gewählt. Es sollte auf Eisen-oxidierende Organismen, die bei neutralem pH wachsen und Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor nutzen können, selektiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Anreicherung in FeCO₃-Gradientenröhrchen gewählt, wie sie in Emerson und Moyer 1997 beschrieben wurde (Emerson and Moyer 1997). Die Zusammensetzung des Mediums ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Zusammensetzung modifiziertes Wolfe's Mineralmedium.

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [g/L] |
|--|--|--------------------|----------------|
| Modifiziertes Wolfe's Mineralmedium (MWMM) | NH ₄ Cl | 18,7 | 1,0 |
| | MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,81 | 0,2 |
| | CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 0,68 | 0,1 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,37 | 0,05 |
| Wolfe's Mineralexier (1000x) | | 0,1 % | 1 ml von Stock |

Alles außer KH₂PO₄ in 1000 ml ddH₂O lösen, dann KH₂PO₄ zugeben und erneut mischen.

Zu dem fertigen Medium wurden 0,15 % Agarose (0,75 g auf 500 ml) gegeben und danach autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit steriler Vitaminlösung (DSMZ 1116, Tabelle 12) und 5 mM NaHCO₃ komplementiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung Vitaminlösung (DSMZ 1116).

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [mg/L] |
|--|----------------------------------|--------------------|-----------------|
| Vitaminlösung (DSMZ 1116) (1000x) | Vitamin B12 | 0,04 | 50 |
| | Pantothensäure | 0,23 | 50 |
| | Riboflavin | 0,13 | 50 |
| | Pyridoxamin-HCl | 0,05 | 10 |
| | Biotin | 0,08 | 20 |
| | Folsäure | 0,05 | 20 |
| | Nicotinsäure | 0,2 | 25 |
| | Nicotinamid | 0,2 | 25 |
| | α -Liponsäure | 0,24 | 50 |
| | p-Aminobenzoesäure | 0,36 | 50 |
| | Thiamin-HCl * 2 H ₂ O | 0,12 | 50 |

Alle Komponenten in 1000 ml ddH₂O lösen und anschließend sterilfiltrieren (0,2 μ m Sterilfilter Filtropur, Sarstedt).

4.3.1 Kultivierung der isolierten Organismen in R2A-Medium

Einige der Isolate wurden nach deren Vereinzelung der Einfachheit halber in dem Komplexmedium R2A angezogen (Tabelle 13). Der pH-Wert wurde entsprechend dem Organismus mit H₂SO₄ eingestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung R2A-Medium (nach Reasoner und Geldreich).

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [g/L] |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|----------------|
| R2A-Medium | Hefeextrakt | 0,5 % | 0,5 |
| | Pepton | 0,5 % | 0,5 |
| | Caseinhydrolysat | 0,5 % | 0,5 |
| | Dextrose | 2,78 | 0,5 |
| | Stärke | 3 | 0,5 |
| | Na-Pyruvat | 2,73 | 0,3 |
| | K ₂ HPO ₄ | 1,72 | 0,3 |
| | MgSO ₄ | 0,42 | 0,05 |

Alle Komponenten in 1000 ml dH₂O lösen und das Medium autoklavieren. Nach Bedarf 1,5 % Agar zugeben, um feste Nähragar-Platten zu erhalten. Nach Reasoner und Geldreich (Reasoner and Geldreich 1985).

4.4 Bestimmung stoffwechselphysiologischer Parameter

4.4.1 Nitrat-Nitrit-Reduktion

Eine Veränderung der Stickstoffverbindungen wurde mithilfe von Küvettentests der Firma Hach Lange (Düsseldorf) überwacht. Bei der Anwendung wurde dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren.

4.4.2 Sulfat-Reduktion

Für die Bestimmung der Sulfat-Konzentration wird die Fällung von Sulfat mit Bariumchlorid zu Bariumsulfat genutzt, welches photometrisch bestimmt werden kann. Zu diesem Zweck wurde nach dem Protokoll von Kolmert *et al.* 2000 wie folgt verfahren (Kolmert *et al.* 2000).

Tabelle 14: Zusammensetzung der Konditionierungs-Lösung.

| Name | Komponente | Konzentration [M] | Einwaage [g/L] |
|--------------------------------|--------------|-------------------|----------------|
| Konditionierungs-Lösung | NaCl | 2,586 | 150 |
| | Glycerin | 10 % | 100 ml/L |
| | Konz. HCl | 6 % | 60 ml/L |
| | 96 % Ethanol | 20 % | 200 ml/L |

Für eine Eichkurve wurde K_2SO_4 in den Konzentrationen von 0 bis 5 mM benutzt. Zu 500 μ l der Konditionierungs-Lösung (Tabelle 14) wurden jeweils 500 μ l der Probe gegeben und gründlich auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Anschließend wurde 1 ml des Gemischs zu 30 mg BaCl gegeben und für 1 min gut gevortext, wobei sich ein weißer Niederschlag von $BaSO_4$ -Kristallen bildete. Das Gemisch wurde in eine 1 ml Küvette gegeben und die Absorption der $BaSO_4$ -Kristalle konnte bei 420 nm in einem Photometer gemessen werden. Für die Messung war es wichtig, das präzipitierte $BaSO_4$ direkt vor der Messung nochmals zu vortexen, um es in Suspension zu halten.

4.4.3 Gesamtkohlenstoffanalyse

Die Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (*total organic carbon* = TOC) einer Lösung wurde in einem multi N/C® 2100 S von Analytic Jena (Jena) durchgeführt. Dabei wird CO_2 mithilfe von nichtdispersiver Infrarot (NDIR) Photometrie detektiert. Zunächst wird der CO_2 -Gehalt einer Lösung bestimmt, also der Anteil an anorganischem Kohlenstoff (*total*

inorganic carbon = TIC), indem dieser durch Ansäuerung mit 10 %iger ortho- H_3PO_4 aus der Lösung ausgetrieben und anschließend mit dem NDIR Detektor gemessen wird. Im zweiten Schritt wird der gesamte Kohlenstoffgehalt (*total carbon* = TC) der Probe bestimmt. Hierfür wird zunächst aller Kohlenstoff bei $800\text{ }^\circ\text{C}$ komplett zu CO_2 oxidiert, welches dann anschließend ebenso mit dem NDIR-Detektor detektiert wird. Der TOC-Gehalt der Probe wird letztlich über eine Differenzmethode aus TC und TIC berechnet ($\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC}$).

4.5 Inkorporation von ^{13}C markiertem Bicarbonat

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Mikroorganismen auf der Kathode dazu in der Lage waren, mit den bereitgestellten Elektronen anorganischen Kohlenstoff zu fixieren oder nicht, wurde ein Experiment mit ^{13}C -markiertem NaHCO_3 (99 % ^{13}C ; 97 % chem. pur.) von Cambridge Isotope Laboratories (USA) durchgeführt. Das Experiment wurde in dem Elektrosynthese-Reaktor inkubiert, aus welchem auch die Proben entnommen wurden, die für die Erstellung der Phylogenie, des Metagenoms und des Metatranskriptoms herangezogen wurden. Zu diesem Zweck wurde zunächst der verbliebene Teil des Kathodenvlieses in zwei Teile halbiert, von denen anschließend einer an den Potentiostat angeschlossen wurde und der andere nicht. Um konstante Bedingungen zu generieren, wurde an die eine Hälfte der Kathode ein Potential von -350 mV angelegt und der Reaktor für zwei Tage erneut mit N_2/CO_2 begast. Anschließend wurde das Gas abgedreht und $1\text{ g NaH}^{13}\text{CO}_3$ in Wasser gelöst zugegeben und der Deckel fest verschlossen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde dann jeweils ein Stück der an den Potentiostaten angeschlossenen bzw. nicht-angeschlossenen Kathode mit einem Skalpell abgetrennt, in ein Kryo-Gefäß gegeben und in flüssigem N_2 schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Graphitvlies Stücke bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zum Herauslösen der Zellen aus dem Vlies wurde eine $10\text{ mM H}_2\text{SO}_4$ -Lösung ($\sim\text{pH } 2$) hergestellt. Zu jedem Stück Kathode wurde 1 ml der H_2SO_4 -Lösung zugegeben und die Zellen durch Schütteln für 40 min bei 11 Hz mit einer Zelmühle (Retsch, Haan) abgelöst. Anschließend wurde die Flüssigphase in $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäße überführt und mit der in Abschnitt 4.4.3 behandelten Methode der TOC-Gehalt der Proben bestimmt. Jeweils $500\text{ }\mu\text{l}$ der Proben wurden anschließend in zuvor ausgewogene Zinnkartuschen ($10 \times 10\text{ mm}$, IVA Analysetechnik, Meerbusch) gegeben, auf Trockeneis gefroren und danach lyophilisiert.

Die so vorbereiteten Proben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Wilcke (Institut für Geographie und Geoökologie) mittels Kernspinresonanzspektroskopie auf Unterschiede im ^{13}C -Gehalt hin untersucht.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der gesamten genomischen DNA aller in dieser Arbeit behandelten Proben wurde das InnuSPEED Soil DNA Kit von Analytic Jena (Jena) verwendet. Es wurde dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren. Als Ausgangsmaterial diente entweder ein kleingeschnittenes Stück der Kathode oder 1-2 ml der Flüssigkulturen. Im Fall der Flüssigkulturen wurden diese abzentrifugiert und das Pellet direkt im Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurde mit allen Proben gleich verfahren. Das Prinzip des Zellaufschlusses basiert bei der angewandten Methode auf einer Kombination aus mechanischer und chemischer Zelllyse. Für den mechanischen Aufschluss wurde eine Zelmühle (Retsch, Haan) verwendet. Die Zellen wurden für 7 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Anschließend wurde die DNA über zwei Filtermembranen gewaschen und in ddH₂O eluiert. Die erhaltene DNA wurde in unterschiedlichen PCR Reaktionen eingesetzt.

4.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden DNA Fragmente amplifiziert. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Polymerasen zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt. Für eine einfache Kontroll-PCR wurde beispielsweise der MangoMix (Bioline) verwendet. Es handelt sich dabei um eine 2x konzentrierte Mischung, die bis auf die Primer bereits alle für eine PCR notwendigen Komponenten enthält (MangoTaqTM DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Puffer). Ein 50 µl Reaktionsansatz für die MangoTaqTM setzte sich wie folgt zusammen:

| <u>Ansatz</u> | <u>Standard MangoTaq™ PCR Programm</u> | |
|------------------------------|--|------------------------|
| 25 µl 2x MangoMix | 95 °C – 3 min | Initiale Denaturierung |
| 12 µl Primer A (2 pmol/µl) | 95 °C – 30 sec | Denaturierung |
| 12 µl Primer B (2 pmol/µl) | 55 °C – 30 sec | Primer-Bindung |
| 1 µl Template (50-250 ng/µl) | 72 °C – 1 kb/min | Elongation |
| | 72 °C – 10 min | finale Elongation |
| | | } 35 Zyklen |

Wenn es um die Amplifizierung schwieriger Fragmente ging oder eine hohe Genauigkeit der Amplifikate erwünscht war, war die Polymerase der Wahl die iProof Polymerase (Biorad, München). Diese sogenannte „high fidelity“ Polymerase ist 52-fach exakter und zudem schneller als die *Taq*-Polymerase. Bei einem Reaktionsansatz mit der iProof mussten alle Komponenten extra nach dem unten aufgeführten Schema für 50 µl pipettiert werden.

| <u>Ansatz</u> | <u>Standard iProof PCR Programm</u> | |
|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 10 µl iProof GC Puffer | 98 °C – 3 min | Initiale Denaturierung |
| 1 µl iProof (2U/µl) | 98 °C – 10 sec | Denaturierung |
| 1 µl dNTP Mix | 55 °C – 30 sec | Primer-Bindung |
| 1-10 % DMSO | 72 °C – 2 kb/min | Elongation |
| 12,5 µl Primer A (2 pmol/µl) | 72 °C – 10 min | finale Elongation |
| 12,5 µl Primer B (2 pmol/µl) | | |
| 1 µl Template (50-250 ng/µl) | | |
| ad ddH ₂ O | | |
| | | } 35 Zyklen |

4.6.3 Reinigung von DNA

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten nach einer PCR wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega (Mannheim) verwendet. Die DNA wird an eine Silicasäule gebunden und Verunreinigungen können durch Ethanol-haltige Puffer ausgewaschen werden. Im Anschluss wird die DNA mit ddH₂O von der Säule eluiert.

Die DNA wurde entweder direkt nach einer PCR auf die Säule gegeben und gereinigt oder aus Gelstücken aufgereinigt.

4.6.4 Gesamt-DNA-Amplifizierung

Mittels Illumina-Sequenzierung wurde die Gesamt-DNA der Zellen auf der Kathode für die Erstellung eines Metagenoms sequenziert. Da nur wenig Material für dieses Vorhaben zur Verfügung stand, musste die gesamte genomische DNA der Zellen amplifiziert werden. Die in dem Kit verwendete ϕ 29 Polymerase ist hierfür besonders gut geeignet, da sie sehr lange Amplifikate herstellt, typischerweise 2-100 kb, ohne von der template DNA zu dissoziieren. Des Weiteren hat die ϕ 29 Polymerase eine 3'→5' Exonuklease-*proofreading* Aktivität und ist somit mehr als 1000x genauer als die Taq-Polymerase. In einer Reaktion können mit diesem Kit DNA-Mengen von bis zu 40 μ g erreicht werden. Da die Amplifizierung mit der ϕ 29 Polymerase unspezifisch geschieht, ist ein Eintrag von Fremd-DNA bestmöglich auszuschließen. Die Amplifizierung der genomischen DNA wurde mit dem REPLI-g Single Cell Kit (QIAGEN, Hilden) nach dem Protokoll für ganze Zellen durchgeführt. Vor der Amplifizierung wurde ein Teil des bewachsenen Kathodenvlieses in ein 15 ml Reaktionsgefäß in LifeGuard Soil Preservation Solution (MO BIO, Carlsbad, USA) gegeben und die Zellen durch sanftes Schütteln mit der Retsch Zelmühle (Haan) für 30 min bei 8 Hz herausgelöst. Anschließend wurde bei 2500 x g zentrifugiert und das Pellet in einem geringen Volumen derselben Lösung resuspendiert. Ein Teil wurde für eine DNA Isolierung mit dem InnuSPEED Soil DNA Kit benutzt, ein weiterer Teil für die RNA Isolierung. Für die Amplifizierung der gesamten genomischen DNA wurden 500 μ l entnommen, über Zentrifugation bei 10.000 x g zweimal mit PBS versetzt mit DEPC gewaschen und wieder in 500 μ l aufgenommen. Für die Reaktion wurden jeweils 4 μ l eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen im MJ Mini Cyclyer (Biorad, München) durchgeführt.

4.6.5 RNA-Isolierung und Amplifizierung

Um ein genaueres Bild der physiologischen Vorgänge zu erhalten, die sich innerhalb der Zellen auf der Kathode abspielen, sollte die gesamte RNA dieser Zellen isoliert und anschließend mittels Illumina sequenziert werden. Für diesen Zweck wurde das RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, USA) gewählt. Die Zellen werden hier, wie auch bei dem für die DNA Isolierung verwendeten Kit, sowohl mechanisch wie auch durch chemische Lyse aufgeschlossen. Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgt über Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol. Die bereits beschriebenen, aus dem Kathodenvlies

herausgelösten Zellen (siehe Abschnitt 4.6.4) wurden zum Teil in die RNA Isolierung eingesetzt. Im Weiteren wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren und dabei immer darauf geachtet, Kontaminationen durch fremde Nukleinsäuren zu vermeiden. Im Anschluss an die RNA Isolierung wurde die teilweise mit isolierte DNA über das DNA-free Kit (ambion) abgereinigt. Es wurde dabei nach den Herstellerangaben verfahren, die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. In einer Test-PCR (27 Zyklen) mit 16S Primern für Bacteria (#1610 und #1611) wurde anschließend überprüft, dass keine DNA mehr vorhanden war. Die für physiologische Stoffwechsellösungen aussagerelevante mRNA stellt nur einen sehr geringen Anteil an den gesamten RNAs einer Zelle dar, der Hauptteil sind 16S und 23S rRNA und tRNAs (~90 %). Aus diesem Grund folgt auf die Abreinigung der DNA normalerweise eine Anreicherung der mRNA. In unserem Fall war die Konzentration an gesamter RNA jedoch so gering, dass eine Anreicherung der mRNA nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde nach den Angaben des Herstellers mit Komponenten des MICROBExpress™ Kit (ambion) die gesamte RNA gefällt. Die somit ankonzentrierte gesamte RNA wurde anschließend mit dem MessageAmp™-II Bacteria Kit (ambion) amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgt nach einer linearen *in vitro* transkriptionsbasierenden Methode (Van Gelder *et al.* 1990). Da die prokaryotische mRNA im Gegensatz zu eukaryotischer mRNA keine Poly-A Schwänze hat, werden diese im ersten Schritt über eine Poly-A-Polymerase aus *E. coli* angefügt. Anschließend wird die RNA mithilfe von Oligo-dT-Primern und einem T7-Promotor durch die ArrayScript Reverse Transkriptase (RT) revers transkribiert, man erhält eine komplementäre cDNA. Über die T7-Promotor-Primer und die DNA-Polymerase wird die Einzelstrang cDNA (ss cDNA) nun in doppelsträngige DNA (ds DNA) umgeschrieben, gleichzeitig baut eine RNaseH die noch vorhandene RNA ab. Ausgehend von der ds DNA werden im letzten Schritt mit der T7-RNA-Polymerase 100 bis mehrere 1000 Kopien an antisense RNA Transkripten erstellt. Der Hersteller empfiehlt, als minimale Menge an Gesamt-RNA 100 ng in die Reaktion einzusetzen. Dies war in unserem Fall nicht möglich, es wurde daher die größtmögliche Menge eingesetzt. Es wurden alle Schritte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die amplifizierte RNA wurde schlussendlich in ddH₂O gelöst.

4.6.6 Umschreiben von aRNA in cDNA

Die amplifizierte RNA konnte nicht direkt sequenziert werden, daher wurde sie nochmals in cDNA umgeschrieben und dann zu einer Illumina Sequenzierung gegeben. Das Umschreiben erfolgte mit dem SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Im ersten Schritt wird die aRNA mit der SuperScript®II RT in ss cDNA umgeschrieben, anschließend wird in einer isothermalen Reaktion gleichzeitig die RNA über eine RNaseH abgebaut und ds DNA über die DNA-Polymerase I synthetisiert. Es wurden zwei Ansätze verfolgt, einer mit Oligo-dT-Primern (Thermo Scientific) sowie einer mit Random Hexamer-Primern (Thermo Scientific). Vor der Sequenzierung wurden beide Ansätze 1:1 gemischt.

4.7 Sequenzierungsmethoden

4.7.1 Sequenzierung nach Sanger

Sequenzanalysen von einzelnen PCR Fragmenten oder Plasmiden wurden bei den Firmen GATC Biotech (Konstanz) und mwg (Bühl) durchgeführt. Die Sequenzierung beruht dabei grundsätzlich auf der von Sanger eingeführten Kettenabbruch-Synthese mithilfe von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP). Der Vergleich der 16S rDNA Sequenzen erfolgte über das online-Programm „*Ribosomal Database Project*“ (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu>) und über die Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Für Alignments und die anschließende Erstellung von Stammbäumen wurde das Programm geneious (Biomatters, Auckland, New Zealand) verwendet.

4.7.2 454-Sequenzierung

Die 454-Sequenzierung ist im Gegensatz zur oben beschriebenen Sanger-Sequenzierung eine der sogenannten „*next generation sequencing*“ (NGS) Methoden. Der enorme Vorteil dieser NGS-Technologien besteht in ihrer extrem hohen Durchsatzleistung. Bei dieser Technologie werden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente (maximal 500 bp) über Adaptoren an *beads* gekoppelt, und je eines dieser *beads* kommt in eine Vertiefung einer Pico-Titer-Platte. Vor der eigentlichen Sequenzierung wird jedes einzelne DNA-Fragment in einer sogenannten

Emulsions-PCR innerhalb dieser Mikroreaktionsräume klonal amplifiziert, sodass am Ende viele ss DNA-Fragmente an einem bead gekoppelt sind. Sequenziert wird anschließend über eine Pyrosequenzierung. Dafür wird zu jedem bead ein Enzym-Mix aus Pufferlösung mit DNA-Polymerase, Sulfurylase und Luziferase gegeben. Während des Sequenzierungslaufes werden in definierter Abfolge dNTPs zugegeben. Kommt es durch die DNA-Polymerase zum Einbau eines passenden dNTPs, wird das Pyrophosphat freigesetzt, welches dann durch die ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt wird. Das ATP wiederum bewirkt, dass Luziferin durch die Luziferase zu Oxyluziferin umgesetzt wird und es zu einem Lichtsignal kommt, welches durch eine hoch sensible CCD Kamera detektiert werden kann. Das detektierte Signal ist dabei abhängig von der Menge an eingebauten Nukleotiden. Durch eine definierte Zugabe der dNTPs kann direkt auf die Sequenzabfolge der DNA rückgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde die 454-Sequenzierung genutzt, um Aussagen über die phylogenetische Zusammensetzung unterschiedlicher Proben zu erlangen. Dafür wurde zunächst die genomische DNA der jeweiligen Proben mit dem InnuSPEED Soil DNA Kit (Analytic Jena) wie in 4.6.1 beschrieben isoliert. Im Anschluss daran wurde eine iProof-PCR unter folgenden Bedingungen mit speziellen 16S Primern für Bacteria oder Archaea durchgeführt.

| <u>Ansatz (30 µl)</u> | <u>iProof PCR Programm</u> | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------|
| 6 µl iProof GC Puffer | 98 °C – 2,5 min | Initiale Denaturierung | |
| 1 µl iProof (2U/µl) | 98 °C – 10 sec | Denaturierung | } 35 Zyklen |
| 1 µl dNTP Mix | 52/56 °C – 30 sec | Primer-Bindung* | |
| 1 µl DMSO | 72 °C – 45 sec | Elongation | |
| 7,5 µl Primer A (2 pmol/µl) | 72 °C – 10 min | finale Elongation | |
| 7,5 µl Primer B (2 pmol/µl) | | | |
| ~1 µl Template (50-250 ng/µl) | * 52 °C: Archaea, 56 °C: Bacteria | | |
| ad ddH ₂ O | | | |

Die Primer (Tabelle 5) enthielten zusätzlich zu den bindenden Bereichen für die 16S auch Sequenzen für die Adaptern zur Kopplung an die *beads*, und auch 10 bp lange Sequenzen, die als Wiedererkennungscode dienten und jeweils spezifisch für eine bestimmte Probe waren. Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt und in einer Konzentration von ~10 ng/µl auf Trockeneis zu IMG^M Laboratories (Martinsried) versendet, wo sie auf einem FLX-Junior (Roche) sequenziert wurden.

4.7.3 Illumina-Sequenzierung

Wie die 454- gehört auch die Illumina-Sequenzierung zu den NGS Technologien. Gestartet wird hierbei über eine sogenannte Brückensynthese. Dafür werden zunächst DNA- oder RNA-Fragmente von 50 oder 100 bp erstellt und diese mit zwei unterschiedlichen Adaptoren versehen. Die so präparierten Nukleinsäuren werden dann denaturiert, als Einzelstränge auf eine Trägerplatte aufgebracht und anschließend per Brückenamplifikation vervielfältigt. Es entstehen dadurch Bereiche mit vervielfältigter DNA/RNA, die dieselbe Sequenz aufweisen. Bei der eigentlichen Sequenzierung werden wie bei der Sanger Methode Nukleotide verwendet, die zu einem Kettenabbruch führen. Die Nukleotide sind bei der Illumina-Sequenzierung mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Im ersten Schritt wird von der DNA-Polymerase ein Nukleotid eingebaut und anschließend werden die nicht inkorporierten Nukleotide gewaschen. Mit einer speziellen Kamera wird das Fluoreszenzsignal detektiert und nachfolgend die zum Kettenabbruch führende Gruppe und der Fluoreszenzfarbstoff abgespalten. Danach wird mit erneuter Zugabe fluoreszenz-markierter dNTPs ein neuer Zyklus eingeleitet. Man spricht hierbei von einer sogenannten zyklischen reversiblen Kettenabbruchreaktion. Im Gegensatz zur 454-Sequenzierung werden dabei immer alle 4 Nukleotide zugegeben, die jeweils mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind.

In dieser Arbeit wurden mithilfe der Illumina-Sequenzierung ein Metagenom und ein Metatranskriptom erstellt. Zu diesem Zweck wurde die gesamte DNA wie in Abschnitt 4.6.4 beschrieben amplifiziert bzw. die RNA erst isoliert und dann amplifiziert (Abschnitt 4.6.5). Die Sequenzierungen wurden am KIT Campus Nord am Institut für Toxikologie und Genetik durchgeführt.

4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren anhand ihrer Größe aufgetrennt. Durch ihre negative Ladung können DNA- und RNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Geschwindigkeit, mit der die Moleküle sich bewegen, hängt dabei vom Salzgehalt des Puffers sowie der Porengröße in der Gelmatrix ab. Zur Auftrennung der Nukleinsäuren wurden in dieser Arbeit hauptsächlich 1 %ige Agarosegele verwendet. Hierzu

wurde die entsprechende Menge an Agarose (Invitrogen, Darmstadt) in 1x TAE-Puffer (Tabelle 15) aufgekocht, mit 1 µl/ml Midori Green (0,2 %ige Lösung) versetzt und anschließend in einen Gelschlitten mit den gewünschten Kämmen gegeben.

Tabelle 15: Zusammensetzung TAE-Puffer.

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [g/L] |
|--|--------------|--------------------|----------------|
| TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) pH 8 | Tris | 37 | 4,48 |
| | Eisessig | 0,114 % | 1,14 |
| | EDTA (0,5 M) | 1 | 2 ml/L |

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Wurden mit dem MangoMix amplifizierte Proben untersucht, konnten diese direkt in die Taschen geladen werden, andernfalls wurden die zu untersuchenden Proben vor dem Beladen der Taschen mit 6x DNA Loading Dye Solution (Fermentas) versetzt. Als Größenstandard diente der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Die Nukleinsäuren wurden in der Regel bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt und die DNA anschließend mithilfe einer UV-Lampe (IL 200M; Bachhofer, Reutlingen) detektiert.

4.9 Catalyzed reporter deposition Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (CARD-FISH)

Mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) können Mikroorganismen quasi in nativem Zustand, was ihre Aktivität angeht, analysiert werden. Die zu untersuchenden Organismen können zu einem beliebigen Zeitpunkt fixiert werden. Anschließend kann mithilfe von DNA-Sonden, welche an die rRNA der Zellen binden, die Anwesenheit und die Verteilung der Organismen im jeweiligen Kontext untersucht werden. Im Gegensatz zu der Standard-FISH, bei der an die Sonden direkt ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, verwendet man bei der catalyzed reporter deposition Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (CARD-FISH) Sonden, die ein Enzym gekoppelt haben. Das Enzym ist eine HRP (*horse radish peroxidase*) Peroxidase, die farbstoffgekoppelte Tyramide zu einem Radikal umwandeln kann. Diese kurzlebigen Radikale binden wiederum vorzugsweise an Phenolreste in Tyrosin, welche sich in direkter Umgebung der HRP befinden, und geben dadurch ein

Fluoreszenzsignal ab. Da eine HRP mehr als ein Tyramid umsetzen kann, kommt es zu einer Signalverstärkung. Die CARD-FISH Methode wird daher hauptsächlich bei Proben eingesetzt, die eine geringe Aktivität aufweisen oder bei denen eine hohe Hintergrundfluoreszenz erwartet wird. Pernthaler *et al.* 2004 geben einen sehr guten Überblick über die Methode (Pernthaler and Pernthaler 2004).

4.9.1 Probenfixierung

Bei der Fixierung biologischer Proben ist darauf zu achten, ein entsprechendes Grundmedium oder einen entsprechenden Puffer zu verwenden, um den pH-Wert und die Osmolarität der Zellen aufrecht zu erhalten. In dieser Arbeit wurde stets das entsprechende Medium, aus dem die Probe stammte, mit 4 % Formaldehyd versetzt und für die Fixierung verwendet. Als Faustregel für die Fixierung kann angenommen werden, dass Formaldehyd ca. 1 mm/h diffundiert, in Abhängigkeit von der Dichte der Probe. Für die Fixierung soll stets das 20-fache Volumen an Fixierlösung eingesetzt werden.

Fixierung von Flüssigkulturen:

Für die Fixierung wurden 1-5 ml einer aktiven Kultur schrittweise bei 10.000 x g für 2 min abzentrifugiert, das Pellet in dem jeweiligen Medium mit 4 % Formaldehyd resuspendiert und die Zellsuspension dann für ca. 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde das Formaldehyd aus der Lösung entfernt, indem die Suspension bei 10.000 x g für 2 min zentrifugiert wurde, der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde in 1x PBS (Tabelle 16) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieses Waschen mit PBS wurde zweimal wiederholt und nach dem letzten Schritt wurde das Pellet in einem 1:1 Gemisch aus 1x PBS und 96 % Ethanol aufgenommen. Das Volumen an PBS:Ethanol, in dem die Zellen aufgenommen wurden, hing dabei von der jeweiligen Zelldichte ab. Die so fixierten Zellen konnten anschließend bei -20 °C bis zu einer Hybridisierung gelagert werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung PBS.

| Name | Komponente | Konzentration [mM] | Einwaage [g/L] |
|-------------------------|----------------------------------|--------------------|----------------|
| PBS (10-fach) pH 7,5 | NaCl | 1380 | 80 |
| | KCl | 27 | 2 |
| | Na ₂ HPO ₄ | 100 | 14,4 |
| | KH ₂ PO ₄ | 17 | 2,4 |

Für die Hybridisierung wurden je 15 µl der Zellsuspension auf spezielle Objektträger (VWR, USA) aufgebracht. Diese Objektträger besitzen 8 Vertiefungen, die ein Verlaufen der Proben verhindern, und sind weiter mit PTFE-beschichtet, was ein Anheften der Zellen ermöglicht. Nach dem Aufbringen der Zellen wurden die Objektträger bei 30-46 °C getrocknet. Anschließend wurde auf die getrockneten Zellen 0,1 %ige Low Melt Agarose (Roth) aufgebracht und diese wiederum bei 30-46 °C getrocknet.

Fixierung von Kathoden:

Für die Fixierung wurde ein Stück der Kathode mit dem Skalpell abgetrennt und direkt in Medium mit 4 % Formaldehyd gegeben. Die Kathoden wurden zum Fixieren für ca. 4 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgenommen, 1 x PBS auf die Kathode gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Das PBS wurde danach abgenommen und die Kathode konnte bis zu einer Hybridisierung in PBS bei 4 °C gelagert werden.

4.9.2 Verwendete Puffer

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die CARD-FISH benötigt.

Tabelle 17: Zusammensetzung Hybridisierungspuffer für CARD-FISH, bei -20 °C lagern.

| Substanz | Formamid [c] | 20 % FA [ml] | 30 % FA [ml] |
|--------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 5 M NaCl | | 3,6 | 3,6 |
| 1 M Tris/HCl, pH 8 | | 0,4 | 0,4 |
| ddH ₂ O | | 10 | 8 |
| Dextran-Sulfat [g] | | 2 | 2 |
| 20 % SDS | | 0,02 | 0,02 |
| 10 % Blocking Reagent* (Roche) | | 2 | 2 |
| Formamid (FA) | | 4 | 6 |

* Das Blocking Reagent wird in Maleinsäure-Puffer gelöst (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5).

Tabelle 18: Zusammensetzung des Waschpuffers, CARD-FISH.

| Substanz | Formamid [c] | 20 % FA [ml] | 30 % FA [ml] |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 5 M NaCl | | 4,3 | 2,04 |
| 1 M Tris/HCl, pH 8 | | 2 | 2 |
| 0,5 M EDTA, pH 8 | | 1 | 1 |
| 20 % SDS* | | 0,05 | 0,05 |
| ddH ₂ O | | 93 | 95 |

* SDS wurde am Ende zugegeben.

Tabelle 19: Zusammensetzung CARD-FISH Lösungen.

| Lösung | Komponente | Konzentration | Zusammensetzung |
|--|--|---------------|-----------------|
| Amplifikationspuffer | 1 x PBS | - | 450 ml/L |
| | 5 M NaCl | - | 400 ml/L |
| | Dextransulfat | - | 10 ml/L |
| | 10 % Blocking Reagent (Roche) | 10 % | 100 g/L |
| Einbettpuffer | Citifluor AF1 (Citifluor Lt. London) | - | 11 ml |
| | Vectashield H1000 (Linaris, Wertheim) | - | 2 ml |
| | 1 x PBS | - | 1 ml |
| SSC (20-fach) pH 6 mit 7 NHCl | NaCl | 3 M | 175,3 g/L |
| | Tri-Na-Citrat Dihydrat | 0,3 M | 88,2 g/L |

Für die Herstellung des Hybridisierungs- bzw. Amplifikationspuffers wurden die jeweiligen Lösungen auf 60 °C erhitzt, um das Dextransulfat zu lösen. Danach wurden sie auf Eis wieder abgekühlt. Der Hybridisierungspuffer konnte für mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Der Amplifikationspuffer konnte für mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Der Waschpuffer wurde immer frisch hergestellt. Der Einbettpuffer wurde im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

4.9.3 Sonden

In Tabelle 6 sind die in der Arbeit verwendeten Sonden aufgelistet. Alle Sonden wurden in einer Konzentration von 50 ng/µl eingesetzt. Zunächst wurden sie entsprechend der OD Angabe des Herstellers 1:100 mit ddH₂O verdünnt (OD1 = 100 µl) und über Nacht bei 4 °C

gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung der HRP-Sonden wurde eine Formel aus Pernthaler et al. angewandt (Pernthaler and Pernthaler 2004).

$$(\text{Absorption}_{260 \text{ nm}} - (\text{Absorption}_{404 \text{ nm}} \times 0,276)) \times 20 \text{ ng}/\mu\text{l} \times V$$

Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, ein Absorptionswert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 20 ng/ μl . Die HRP selbst hat ein Absorptionsmaximum bei 404 nm. Da auch die Absorption der HRP mit zu dem Absorptionswert bei 260 nm beiträgt, sollte ein Korrekturfaktor von 0,276 von der Konzentration abgezogen werden. Weiter sollte das Verhältnis von der Absorption der DNA zur HRP um den Faktor 3 liegen, damit sei eine optimale Kopplung gewährleistet.

Die bei der Amplifizierung verwendeten Tyramide waren bereits als Tyramid-Konjugate vorhanden. Diese wurden nach einem Protokoll von Pernthaler 2004 hergestellt, aliquotiert, in der SpeedVac getrocknet und dann bei -20°C gelagert. Zur Aktivierung der Farbstoffe wurden jeweils 25 μl ddH₂O zugegeben (Pernthaler and Pernthaler 2004).

4.9.4 CARD-FISH Protokoll

Die Objektträger mit Flüssigkulturen (Abschnitt 4.9.1) wurden zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Dafür wurden die Objektträger jeweils für 3 min bei RT erst in 50 %, dann 80 % und zuletzt in 100 % Ethanol gegeben. Dieser Schritt entfiel bei den fixierten Kathoden. Da Zellen endogene Peroxidasen besitzen, die unspezifische Signale hervorrufen können, wurden diese nach dem Dehydrieren durch Inkubation für 10 min bei RT in 0,1 M HCl inhibiert. Danach wurde der Objektträger kurz in ddH₂O eingetaucht und anschließend bei RT oder $38-46^\circ\text{C}$ getrocknet. Meist wurden die Proben am Vortag entwacht und konnten dann im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Neben der Inhibition von Peroxidasen ist eine weitere Funktion der HCl die Zellen porös zu machen, sodass die Sonden eindringen können. Reichte die Behandlung mit HCl nicht aus, um ausreichend gefärbte Zellen zu erhalten, konnten weitere Schritte angefügt werden, wie beispielsweise eine Inkubation der Objektträger für 10 min in 0,5 % SDS in PBS und anschließendem kurzen Eintauchen in ddH₂O oder einer Behandlung mit 10 mg/ml Lysozym und/oder 10 mg/ml Proteinase K in 100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA (pH 7,4) für 1 h bei 37°C .

Im Anschluss an die Behandlung mit Lysozym oder Proteinase K muss das Dehydrieren in der aufsteigenden Ethanolreihe wiederholt werden. All diese Schritte wurden bei der CARD-FISH mit den Kathoden genauso durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden die Sonden in den entsprechenden Hybridisierungspuffer (Tabelle 17) gegeben und dann das Ganze auf die Zellen pipettiert (Objektträger: 74,5 µl Puffer + 0,5 µl Sonde (50 ng/µl), Kathoden: 1490 µl Puffer + 10 µl Sonde). Um das Austrocknen der Proben während der Inkubation für ca. 2 h bei 46 °C zu verhindern, wurden sogenannte feuchte Kammern in 50 ml Schraubdeckelröhrchen vorbereitet. Dazu wurde ein Kimtech-Tuch (Roth, Karlsruhe) in das Röhrchen gebracht und 2 ml der entsprechenden Formamid-Konzentration in ddH₂O zugegeben.

Nach der Hybridisierung wurden die Proben kurz in auf 48 °C vorgewärmten Waschpuffer für die entsprechende FA-Konzentration (Tabelle 18) gegeben und in einem zweiten Waschpuffer bei 48 °C für 15 min gewaschen. Anschließend wurde die Probe für 15 min in 1 x SSC gewaschen.

Nach dem Waschen wurde der Objektträger aus der Flüssigkeit genommen und außerhalb der Probenvertiefungen trocken getupft, bei den Kathoden wurde soviel der Flüssigkeit wie möglich abgezogen. Die Probe durfte auf keinen Fall komplett austrocknen. Als nächstes wurde die Amplifizierungslösung aus 500 µl Amplifikationspuffer, 0,5 µl Alexa-Tyramid und 5 µl verdünntem H₂O₂ (1 µl H₂O₂ + 199 µl 1 x PBS) vorbereitet und auf die Proben gegeben (für die Kathoden wurde entsprechend die 3-4-fache Menge angesetzt). Das H₂O₂ wurde dabei immer erst kurz vor dessen Zugabe zu der Mischung frisch verdünnt. Eine dunkle Box mit Deckel wurde wieder mit einem Kimtech-Tuch mit 2 ml ddH₂O versehen, die Proben hineingelegt und für 20 min bis 1 h bei 37 °C amplifiziert.

Die Proben wurden anschließend zweimal mit 1 x SSC gewaschen und danach zweimal kurz in ddH₂O getaucht.

Bei einer Einfach-Hybridisierung wurde direkt im Anschluss mit der DAPI (4',6'-Diamidin-2-Phenylindol) Färbung fortgefahren. Bei einer Doppelhybridisierung musste zunächst die HRP der ersten Sonde durch erneute Inkubation mit 0,1 M HCl inaktiviert werden, bevor mit der zweiten Hybridisierung weitergemacht werden konnte.

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet und somit alle Zellen anfärben sollte, daher wurde er bei jeder CARD-FISH zum Gegenfärben benutzt. Für die Färbung wurde DAPI in einer Konzentration von 1 µg/ml auf die Proben gegeben und 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die restliche Lösung wurde abgeklopft, die Proben im Anschluss zweimal je eine Minute mit ddH₂O gewaschen und zuletzt kurz in 96 % Ethanol getaucht. Nach dem Trocknen der Proben wurde auf jede Vertiefung ein Tropfen Einbettpuffer (Tabelle 19) gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt und kurz angedrückt. Die Objektträger konnten so bei -20 °C gelagert werden. Die Kathoden wurden im Anschluss an die DAPI-Färbung in einer dunklen Box bei 4 °C aufbewahrt.

4.9.5 Klassische Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Da bei der klassischen FISH Sonden benutzt werden, die den Fluoreszenzfarbstoff direkt gebunden haben, fällt der bei der CARD-FISH notwendige Amplifizierungsschritt weg. Die Inkubation mit der 0,1 M HCl ist in diesem Fall nur dazu notwendig, die Zellen für die Sonden durchlässig zu machen. Dadurch, dass die Sonden den Fluoreszenzfarbstoff direkt gebunden haben, ist es möglich, mit zwei Sonden, die unterschiedliche Farbstoffe gekoppelt haben und die dieselbe FA-Konzentration benötigen, zeitgleich zu färben. Da es zu keiner Signalverstärkung bei der Amplifizierung kommt, muss stärker als bei der CARD-FISH darauf geachtet werden, den Einfall von Licht zu vermeiden.

4.10 Mikroskopie

4.10.1 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine Abwandlung der Lichtmikroskopie, bei der ein fluoreszierender Stoff, ein Fluorophor, mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Der Fluorophor wird durch die Anregung in einen energetisch höheren Zustand versetzt. Die Energie, die abgegeben wird, um den Grundzustand wieder zu erlangen, wird dabei in Form von langwelligerem Licht sichtbar.

In dieser Arbeit wurde ein Leica Mikroskop vom Typ DM5500B verwendet (Kamera: Leica DFC360FX, 100x Objektiv mit Öl Immersion und Dip-In-Objektiv 63x HCX APO L63/090W mit

Wasserimmersion). Die Bilder wurden mit der Leica Software LAS-AF erstellt und teilweise auch mit dieser bearbeitet. Dreidimensionale Aufnahmen der Kathode wurden nachträglich mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ bearbeitet (Schneider *et al.* 2012).

4.10.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe von Volker Zibat am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des KIT durchgeführt.

Die untersuchte Kathode wurde zunächst wie bei der Probenvorbereitung für die CARD-FISH (Abschnitt 4.9.1) beschrieben fixiert. Da Proben für das REM komplett wasserfrei sein müssen, wurde die Probe anschließend über Nacht bei RT getrocknet. Die trockene Probe wurde auf einen Probenträger geklebt und Platin beschichtet.

4.11 Bioinformatische Methoden

4.11.1 16S Community-Analyse mit QIIME

Die bioinformatische Analyse der 16S-Sequenz Rohdaten aus den 454-Sequenzierungen wurde mithilfe des Linux-basierten, frei verfügbaren Programmpakets QIIME (**q**uantitative insight into **m**icrobial **e**cology) durchgeführt (Caporaso *et al.* 2010). In QIIME sind mehrere Pythonskripte zur Datenanalyse inbegriffen. Im ersten Schritt erfolgte über den Befehl *split_libraries.py* die Auswahl bestimmter Sequenzen über den jeweiligen probenspezifischen Barcode, gleichzeitig wurden dabei *reads* verworfen, die unterhalb einer Sequenzlänge von 200 bp oder einem quality score von 25 lagen. Die übrigen Sequenzen wurden weiterhin zu *operational taxonomic units* (OTUs) gebündelt, wobei die Zuordnung zu einem OTU eine Sequenzübereinstimmung von 97 % voraussetzte (*pick_de_novo_otu.py*). Für jedes OTU wurde anschließend repräsentativ eine Sequenz über den, in QIIME implementierten, RDP classifier taxonomisch abgeglichen, wobei die neueste Version der Greengenes Datenbank gg_12_10 (http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/12_10) und voreingestellte Optionen verwendet wurden (Caporaso *et al.* 2010; DeSantis *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007). Für die graphische Darstellung wurden die Ergebnisse zuletzt in OriginPro (OriginLab) importiert.

Um eine weitere Größe für die Diversität einer Probe zu erhalten wurde mithilfe des Skripts *alpha_diversity.py* der Shannon Index einiger Proben bestimmt.

Formel Shannon Index: $H' = - \sum_i p_i * \ln p_i$ mit $p_i = \frac{n_i}{N}$

H' = Shannon Index einer Population aus N Individuen unterschiedlicher Spezies, von denen n_i zu einer Spezies gehören

p_i = Anteil der Spezies i an der Gesamtzahl N

4.11.2 KEGG, KAAS

Die *Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes* (KEGG) ist eine umfangreiche, frei zugängliche Datenbank, die strukturierte Informationen zu organismenspezifischen Stoffwechselwegen, Biomolekülen, Genen und Genomen beinhaltet (Ogata *et al.* 1999). Mithilfe des *KEGG Automated Annotation Servers* (KAAS) ist es möglich computergestützte Vorhersagen anhand der KEGG Datenbank zu machen. Die Bearbeitung von großen Datensätzen, wie beispielsweise eines Metagenoms, erfolgt dabei mittels GHOSTX Suche nach der SBH (*single directional best hit*) Methode. Dabei werden Sequenzdatensätze mit bereits charakterisierten Genomen abgeglichen. Das Ergebnis enthält KO (KEGG ontology) Zuweisungen und automatisch generierte KEGG Stoffwechselwege. Für diese Arbeit wurde eine in Protein FASTA übersetzte Datei des Metagenoms (erstellt durch die bioinformatische Arbeit von Andreas Dötsch, IFG) mittels KAAS aufgearbeitet. Zum Abgleich wurden die Referenzgenome von 40 Organismen gewählt, zu denen nahe verwandte bei der 16S Analyse auffindig gemacht wurden und solche von bekannten Eisenoxidierern.

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden thermophile elektroautotrophe Mikroorganismen aus Umweltproben angereichert und anschließend charakterisiert. Die Arbeit kann in drei Teile gegliedert werden: Zunächst soll auf die Anreicherung und Beschreibung thermophiler Mikroorganismen in Elektrosynthese-Reaktoren bei 60 °C eingegangen werden. In dem darauffolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse gezielter Anreicherungen aus den im ersten Teil beschriebenen Reaktoren dargestellt. Im letzten Abschnitt werden kurz die Ergebnisse der Isolierung zweier thermophiler Bakterien über einen klassischen Ansatz bei 45 °C vorgestellt.

5.1 Thermophile Elektrosynthese

Die mikrobielle Elektrosynthese stellt einen relativ jungen Forschungszweig innerhalb der Bioelektrochemie dar. Um die mechanistischen Details, die dieser Lebensweise zugrunde liegen, besser zu verstehen, ist es daher besonders erstrebenswert, neue Mikroorganismen zu finden und zu beschreiben, die zu elektroautotrophen Wachstum fähig sind. Da es sich bei Elektroautotrophie nicht um eine natürlich vorkommende Lebensweise von Organismen handelt, müssen weiterhin einige Überlegungen zur Wahl einer geeigneten Umweltprobe, die als Inokulum für einen erfolgversprechenden Elektrosynthese-Anreicherungsansatz dienen kann, vorangestellt werden. Alle Umweltproben, die für die Anreicherung in Elektrosynthese-Reaktoren verwendet wurden, stammen aus Heißwasser- und Thermalquellen auf der Azoreninsel São Miguel. Eine genauere Beschreibung der Probenentnahme ist den Materialien in Abschnitt 3.2.1 zu entnehmen. Die beprobten Quellen sind in Abbildung 6 gekennzeichnet und Tabelle 4 umfasst eine detaillierte Aufstellung der 24 entnommenen Proben. Da das Ziel dieser Arbeit die Anreicherung thermophiler elektroautotropher Organismen war, wurden ausschließlich Proben aus heißen

Quellen verwendet. Weiterhin wurde darauf geachtet, den Eintrag von organischem Material möglichst gering zu halten, da der Schwerpunkt auf autotroph lebende Mikroorganismen gelegt wurde.

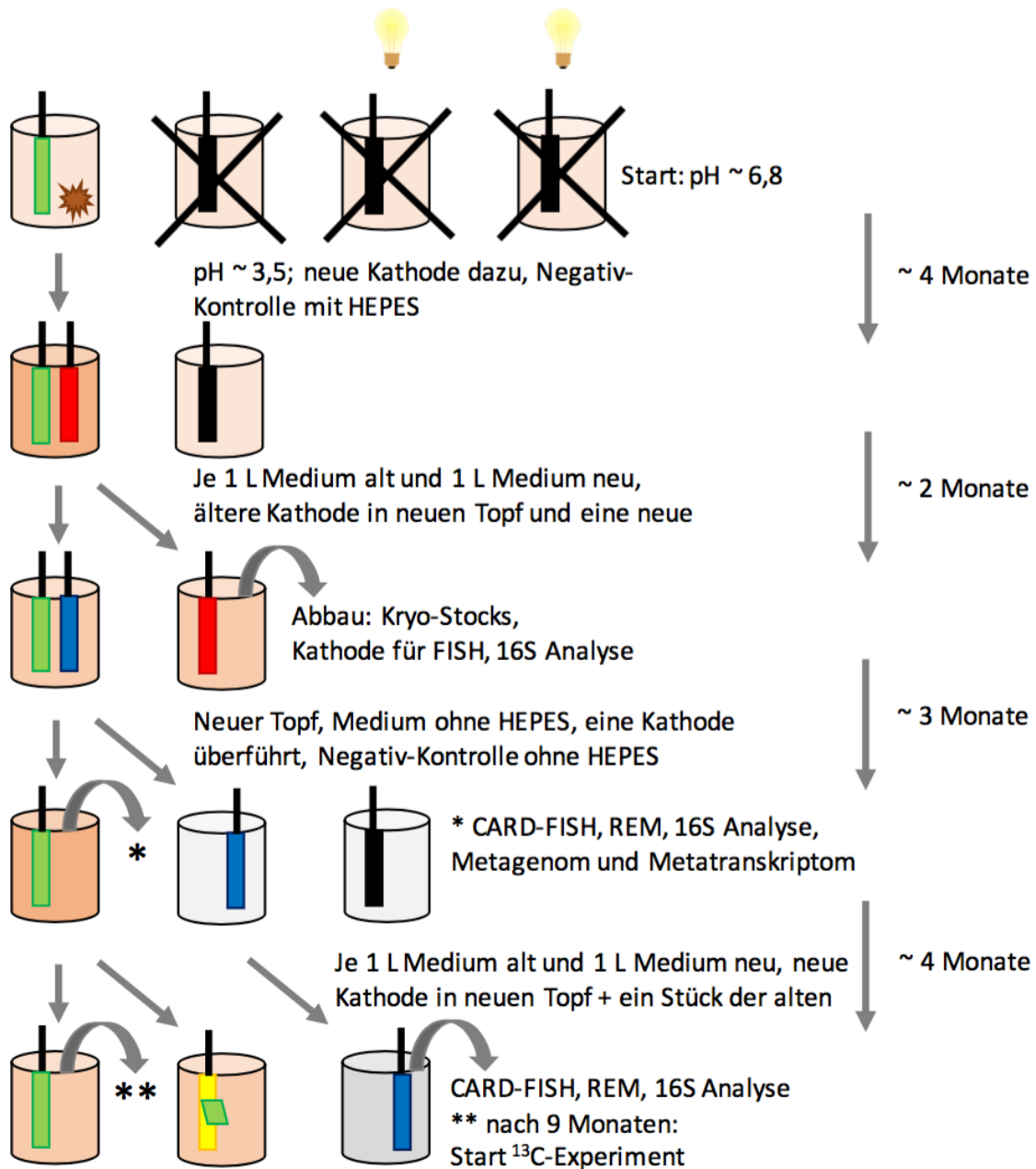


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Elektrosynthese-Reaktoren mit Überführungen und Analysen im zeitlichen Verlauf. Bräunliche Reaktoren enthalten Medium mit HEPES, graue Reaktoren enthalten Medium ohne HEPES. Die Farben der Kathoden spiegeln deren weitere Überführung wider. Alle schwarzen Kathoden sind in Kontrollreaktoren. Der Reaktor oben links enthält etwas Sedimentprobe (braun). Auf der Kathode im Reaktor unten in der Mitte (Transplant-Reaktor) wurde ein Stück Kathode (vom Spender-Reaktor) aufgebracht (grün auf gelb).

Abbildung 7 zeigt schematisch den zeitlichen Verlauf der Anreicherungen in den Elektrosynthese-Reaktoren mit den jeweiligen Überführungen. Zu Beginn wurden vier Elektrosynthese-Reaktoren mit jeweils 20 ml derselben Mischung aus den 24 unterschiedlichen Umweltproben (Tabelle 4) beimpft. Einem der Reaktoren wurde zusätzlich etwas Sedimentprobe derselben Mischung beigegeben. Alle Ansätze wurden unter denselben Bedingungen (60 °C, -350 mV vs. SHE, neutraler pH, Begasung mit N₂/CO₂) gestartet, wobei zwei der Ansätze zusätzlich mit Tageslichtlampen ausgeleuchtet wurden (in Abbildung 7 dargestellt mit Glühlampen), um das Wachstum von phototrophen Organismen zu begünstigen. Der einzige Ansatz, der nach einer Inkubation von ca. vier Wochen eine Veränderung der Stromstärke zeigte, war der Reaktor, dem zu Beginn etwas Sedimentprobe zugegeben wurde. Alle anderen Versuchsansätze wurden daraufhin verworfen und es wurde nur mit dem einen Ansatz weitergearbeitet. Bedeutende Eingriffe in das System können Abbildung 7 entnommen werden. Zusätzlich zu den Überführungen dieses Elektrosynthese-Reaktors sind hier auch die Analysen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, gekennzeichnet.

5.1.1 Initiale Anreicherung

Nach nur kurzer Zeit sank der anfangs eingestellte neutrale pH-Wert, wahrscheinlich durch die nicht unerheblichen Mengen an Schwefelsäure, die durch das Inokulum mit eingetragen wurden, auf 3,5 und blieb konstant bei diesem Wert. Aus diesem Grund wurde der pH im Weiteren auf diesen Wert eingestellt und teilweise auf die Zugabe von HEPES als neutrales Puffersystem verzichtet (in grau markierte Elektrosynthese-Reaktoren in Abbildung 7). Durch die konstante Begasung mit N₂/CO₂ lag die Konzentration an gelöstem CO₂ in den Elektrosynthese-Reaktoren, bei 60 °C und pH 3,5, stets bei ungefähr 15 mg/L. Um organische Rückstände aus dem Reaktor zu entfernen und somit auf autotrophe Mikroorganismen zu selektionieren, wurde der Deckel des Reaktors mit der Kathode und die Hälfte des Mediums in einen neuen, sterilen Reaktor überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. Ab diesem Zeitpunkt wurde weiterhin ein nicht beimpfter Kontroll-Reaktor unter denselben Bedingungen gestartet.

Chronoamperometrie

In Abbildung 8 ist die Änderung der Stromstärke, bei einem konstant angelegten Potential von -350 mV vs. SHE , in der initialen Anreicherung und der nicht beimpften Kontrolle über ca. 80 Tage dargestellt. In rot ist der Verlauf der Stromstärke in der initialen Anreicherung und in schwarz der Verlauf für die nicht beimpfte Kontrolle in demselben Medium dargestellt. Die Datensätze wurden zunächst geglättet (Savitzky-Golay Filter, 160 Punkte für die Berechnung der lokalen quadratischen Regression), um das Rauschen zu vermindern, und dann als Punktdiagramm nach der Zeit aufgetragen. Während die nicht beimpfte Kontrolle innerhalb von 60 Tagen nie über eine Stromdichte von $0,063\text{ A/m}^2$ kam, wurden im Elektrosynthese-Reaktor der initialen Anreicherung Stromdichten von bis zu $0,75\text{ A/m}^2$ detektiert. Die Schwankungen im Kurvenverlauf für die Anreicherung sind auf Unterschiede in der Begasung, sowie auf Verdunstung des Mediums aufgrund der hohen Temperaturen und anschließendes Auffüllen mit ddH_2O zurückzuführen.

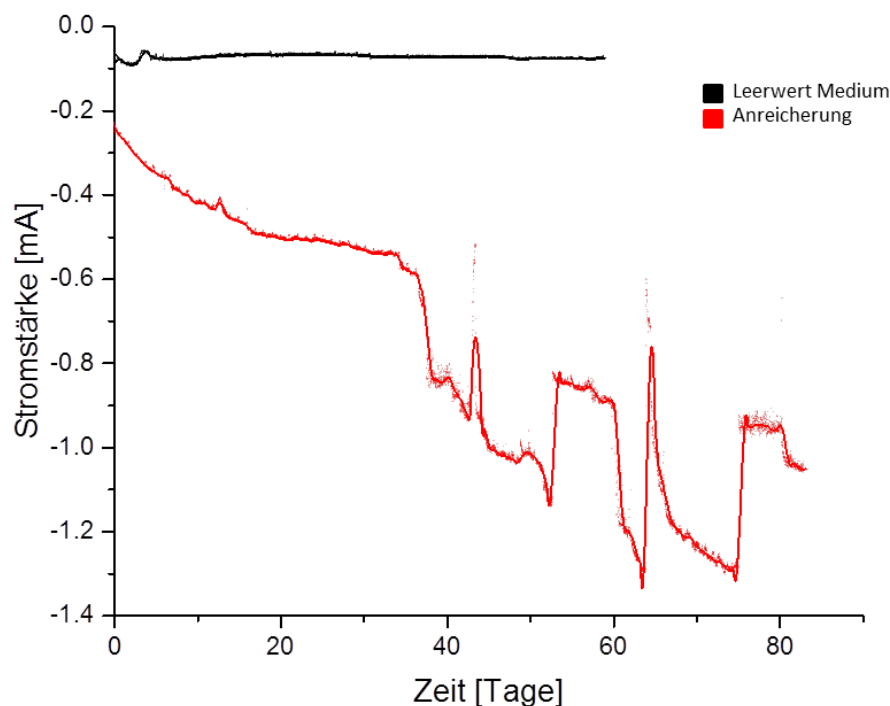


Abbildung 8: Änderung der Stromstärke in der initialen Anreicherung. Angelegt waren -350 mV vs. SHE . Aufgetragen ist die Stromstärke über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen. In rot ist die Stromstärke für die Anreicherung und in schwarz die Stromstärke für das nicht beimpfte Medium dargestellt.

Mikroskopische Analysen

Um zu bestätigen, dass die gemessene Stromstärke auf die Aktivität von Mikroorganismen zurückzuführen ist, wurde ein Teil des Kathodenvlieses mittels CARD-FISH analysiert. Die dabei verwendeten DNA-Sonden binden spezifisch an die ribosomale 16S RNA der Organismen. Die ribosomale RNA ist ein relativ kurzlebiges Molekül, welches in aktiven Zellen in verhältnismäßig großen Mengen vorhanden ist, in inaktiven Zellen jedoch sehr schnell abgebaut wird. Es ist mit dieser Methode daher möglich, direkt das Vorhandensein aktiver Zellen nachzuweisen. Zusätzlich wurden am Zentrum für Elektronenmikroskopie des KIT REM-Aufnahmen der Kathoden angefertigt.

CARD-FISH

Für die CARD-FISH Analysen wurden Sonden verwendet, die spezifisch sind für Archaea (Arch915, grün) und Bacteria (EUB338-I, rot) (Tabelle 6). Das angewendete Protokoll ist im Methodenteil 4.9 genauer beschrieben.

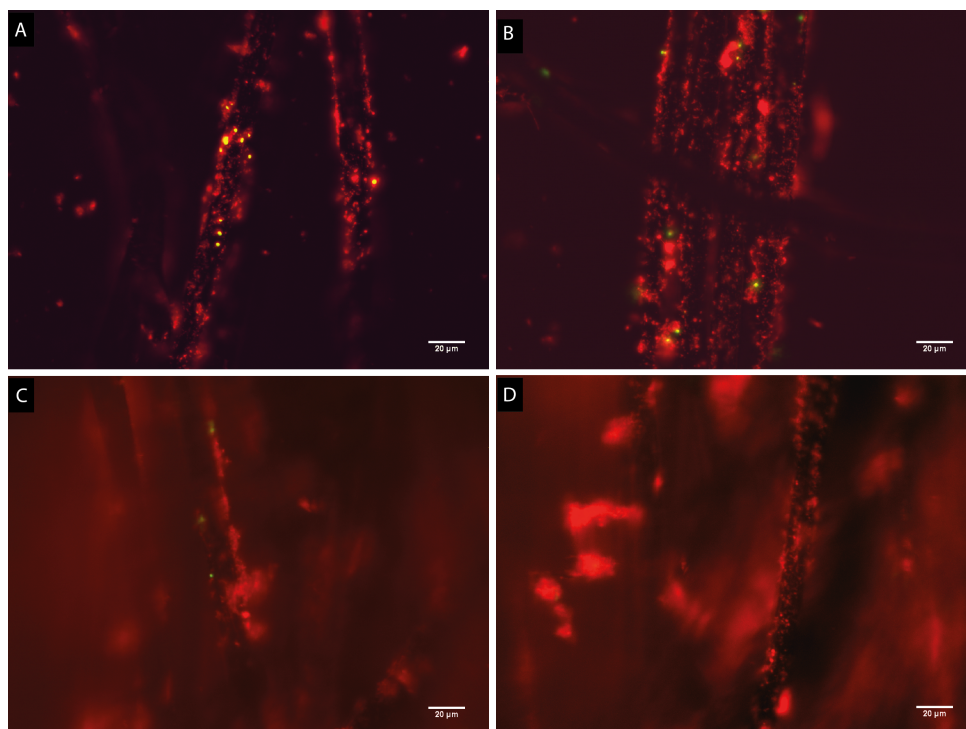


Abbildung 9: CARD-FISH Analyse der Kathode aus der initialen Anreicherung. Die Mikroorganismen wurden mit Sonden für Bacteria (EUB338-I, Alexa546, rot) und Archaea (ARCH915, Alexa488, grün) inkubiert. Der Größenbalken entspricht in jedem Bild 20 µm. **A + B** zeigen hauptsächlich Signale für Bacteria. **C + D** zeigen Zellagglomerationen zwischen den Graphitvlies-Fasern.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Mehrheit der Organismen zum Reich der Bacteria gehören, während Archaea zwar vorhanden, jedoch stark unterrepräsentiert sind (Abbildung 9 A, B und C). Abbildung 9 C und D zeigen weiterhin Zellagglomerate.

REM

Abbildung 10 zeigt REM-Aufnahmen der Kathode in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen. In Abbildung 10 A sieht man die ungeordnete Struktur der Graphit-Fasern in einer Übersicht. Die Abbildungen B und C zeigen Zellagglomerate zwischen den einzelnen Fasersträngen, die auch in den CARD-FISH Aufnahmen (Abbildung 9 C und D) beobachtet werden konnten. In Abbildung 10 D ist die Nahaufnahme einer Graphitfaser dargestellt. Hier kann man sowohl stäbchenförmige wie auch kokkoide Zellformen erkennen, die direkt an der Graphit-Faser anhaften.

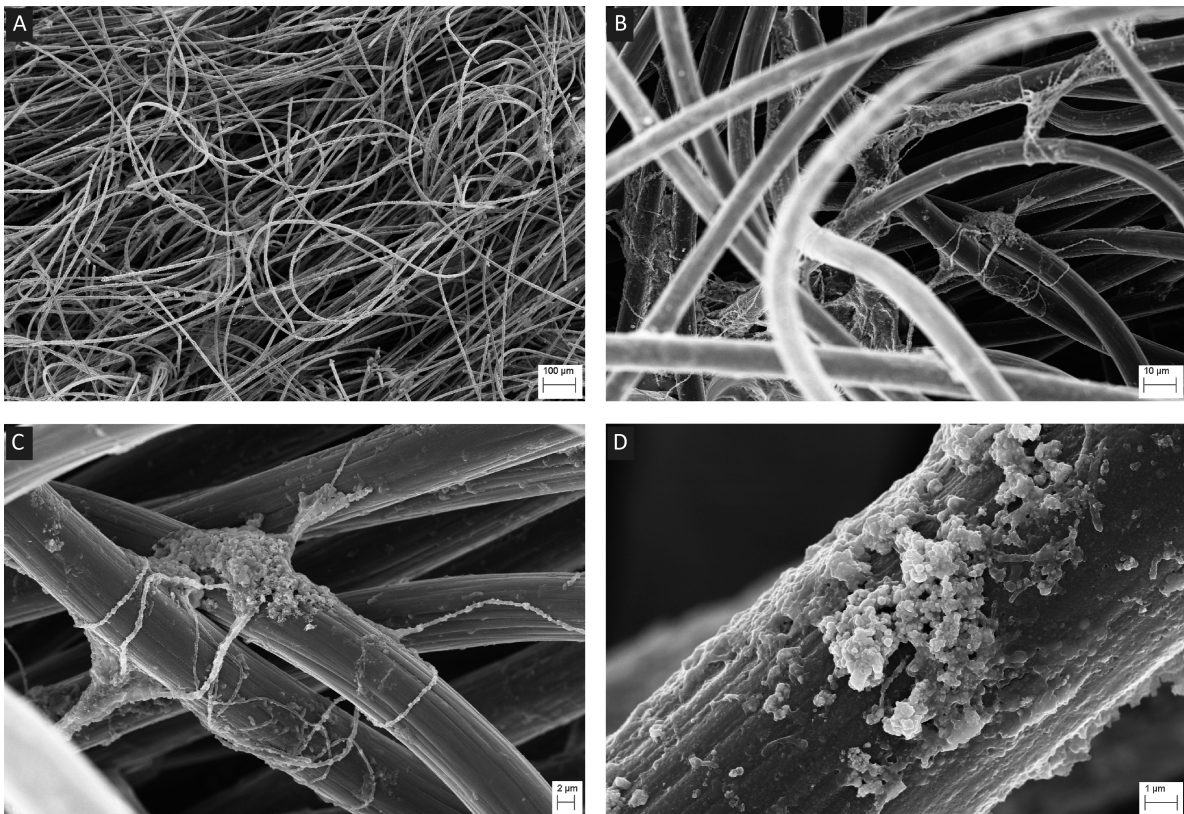


Abbildung 10: REM-Aufnahmen der Kathode aus der initialen Anreicherung. A Übersichtsaufnahme der Graphitvlies-Fasern (Vergrößerung: 150x). **B** Zellaggregate zwischen den Fasersträngen (Vergrößerung: 15000x). **C** Nahaufnahme eines Zellaggregates (Vergrößerung: 4000x). **D** Nahaufnahme einer Graphitvlies-Faser mit anhaftenden Zellen (Vergrößerung: 15000x).

16S rRNA Diversitäts-Analysen

Nachdem mittels mikroskopischer Analysen bestätigt werden konnte, dass sich auf der Kathode ein Biofilm aus aktiven Mikroorganismen angesiedelt hatte, sollten diese weiter charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde die gesamte DNA der Zellen direkt von einem Stück der Kathode isoliert (Methoden 4.6.1) und anschließend spezifisch die 16S rRNA-Gene der Mikroorganismen über eine iProof PCR (Methoden 4.6.2) mit Primern für Archaea bzw. Bacteria (Tabelle 5, #1651 - #1664) amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden bei IMG/M Laboratories auf einem GS-Junior (Roche) über eine 454-Sequenzierung (Methoden 4.7.2) analysiert und die Sequenzierungsrohdaten anschließend mithilfe des Linux-basierten Programms QIIME bioinformatisch ausgewertet (Methoden 4.11.1). Mittels der QIIME-Analyse erhält man eine quantitative und qualitative Aussage zur Taxonomie der vorhandenen Mikroorganismen. Nachdem die einzelnen *reads* einer Probe zu sogenannten OTUs zusammengefügt wurden, konnte repräsentativ je eine Sequenz eines jeden OTUs mittels BLAST Suche taxonomisch eingeordnet werden. Die erste Analyse dieser Art wurde durchgeführt, um eine Aussage darüber machen zu können, was für Mikroorganismen, im Vergleich mit dem ursprünglichen Inokulum, in dem Elektrosynthese-Reaktor angereichert wurden. In einer zweiten Analyse sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied gibt zwischen der organismischen Verteilung der Zellen in dem Biofilm auf der Kathode und den Zellen der planktonischen Phase. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen die prozentuale Verteilung der OTUs für die erhaltenen Sequenzen für Archaea und Bacteria, dargestellt als Kuchendiagramm. Den Tabellen 20 und 21 (zu Abbildung 11) bzw. 22 und 23 (zu Abbildung 12) kann die taxonomische Verteilung auf Familienebene entnommen werden. Die Anzahl erhaltener *reads* je Probe variierte stark, besonders innerhalb der Sequenzen für Archaea. So wurden in der ersten Sequenzierung auf der Kathode 7365 *reads* für Bacteria und 4088 *reads* für Archaea gefunden, während für das Inokulum nur 2745 *reads* für Bacteria und 336 *reads* für Archaea sequenziert wurden. Die Ergebnisse der ersten Analyse zeigen deutlich, dass sowohl die Zusammensetzung an Bacteria, wie auch an Archaea deutlich verschieden war, verglichen mit der Verteilung der Organismen im ursprünglichen Inokulum. Innerhalb der Archaea war die Diversität in beiden Proben nicht groß, änderte sich während der Inkubation im Elektrosynthese-Reaktor jedoch vollständig. Im Inokulum konnten 83,9 % der *reads*, die mit dem Archaea-spezifischen

Primerpaar amplifiziert wurden, nicht zugeordnet werden, 14,9 % der OTUs konnten der Familie *Picrophilaceae* zugeteilt werden. Auf der Kathode hingegen sind nur 9,8 % der reads nicht zuzuordnen, 81,3 % der gefundenen OTUs wurden der Familie *Sulfolobaceae* zugeschrieben und 8,9 % der Familie *Picrophilaceae* (Abbildung 11 unten und Tabelle 20).

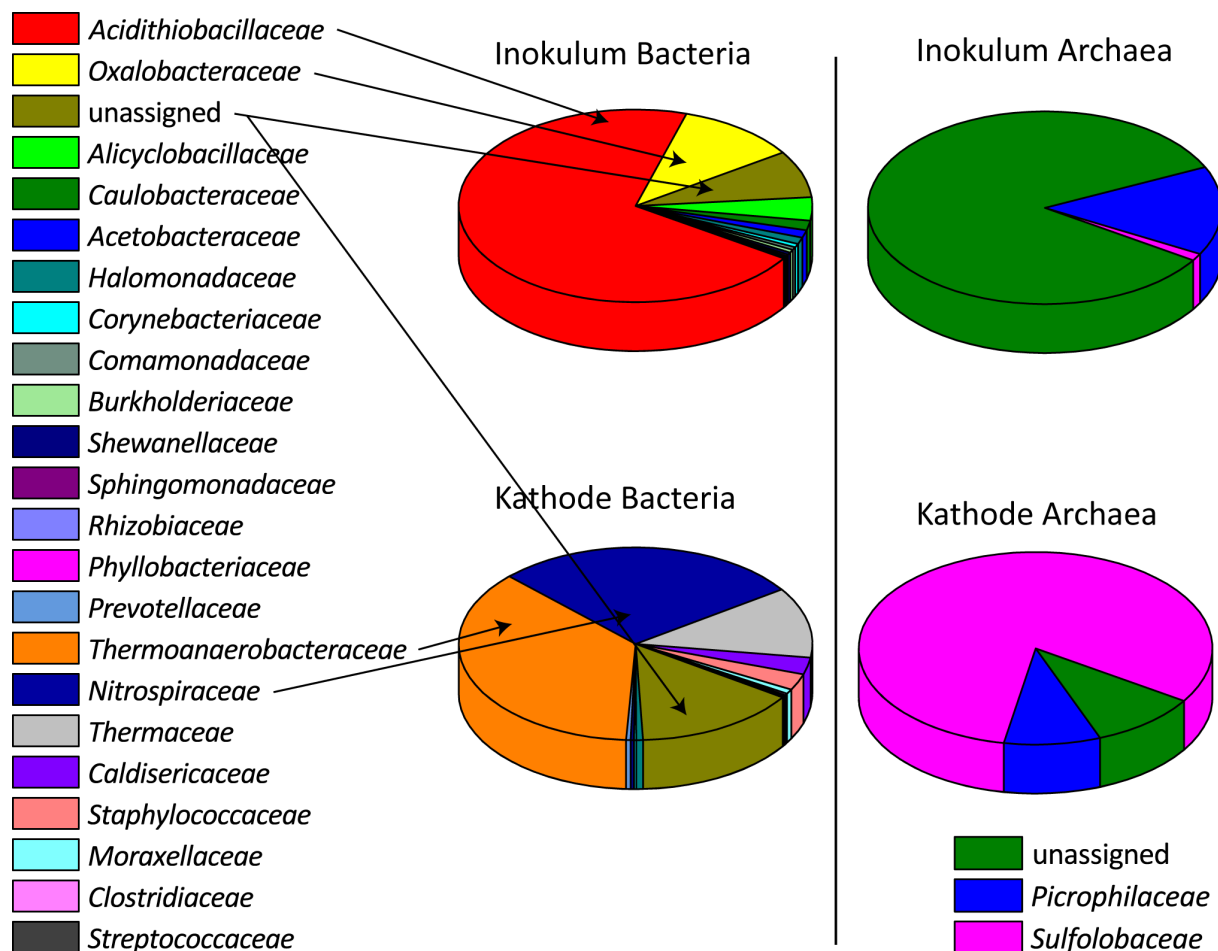


Abbildung 11: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität des Biofilms im Inokulum und auf der Kathode. Für die Bacteria sind die am häufigsten vertretenen Familien mit Pfeilen gekennzeichnet.

Tabelle 20: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea im Inokulum und auf der Kathode (zu Abbildung 11).

| Taxonomie | Inokulum (%) | Kathode (%) |
|-----------------------|--------------|-------------|
| <i>Sulfolobaceae</i> | 1,2 | 81,3 |
| <i>Picrophilaceae</i> | 14,9 | 8,9 |
| unassigned | 83,9 | 9,8 |

Bei der Sequenzanalyse des Inokulums wurden 70,5 % aller bakteriellen OTUs den *Acidithiobacillaceae* zugeordnet, nachfolgend waren die häufigsten Vertreter innerhalb der *Oxalobacteraceae* (11 %) und *Alicyclobacillaceae* (3,6 %) angesiedelt. Eine weitaus größere Diversität innerhalb der Bacteria zeigte sich nach der elektroautotrophen Inkubation im Elektrosynthese-Reaktor. Hier wurden die am häufigsten vertretenen OTUs den Familien *Thermoanaerobacteraceae* (36,1 %), *Nitrospiraceae* (27,8 %), *Thermaceae* (11,7 %) und *Caldiseriaceae* (2,8 %) zugeschrieben (Abbildung 11 oberer Teil und Tabelle 21). Während im Inokulum nur 7,9 % der *reads* für Bacteria nicht zugeordnet werden konnten, waren es nach erfolgter Anreicherung 14,8 %.

Tabelle 21: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria im Inokulum und auf der Kathode (zu Abbildung 11).

| Taxonomie | Inokulum (%) | Kathode (%) |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Acidithiobacillaceae</i> | 70,5 | 0 |
| <i>Oxalobacteraceae</i> | 11 | 0,2 |
| <i>Alicyclobacillaceae</i> | 3,9 | 0 |
| <i>Caulobacteraceae</i> | 1,6 | 0 |
| <i>Acetobacteraceae</i> | 1,3 | 0 |
| <i>Halomonadaceae</i> | 1,1 | 0,6 |
| <i>Corynebacteriaceae</i> | 0,6 | 0,2 |
| <i>Comamonadaceae</i> | 0,5 | 0 |
| <i>Burkholderiaceae</i> | 0,5 | 0 |
| <i>Shewanellaceae</i> | 0,4 | 0,3 |
| <i>Sphingomonadaceae</i> | 0,3 | 0 |
| <i>Phyllobacteriaceae</i> | 0,2 | 0 |
| <i>Rhizobiaceae</i> | 0,2 | 0 |
| <i>Prevotellaceae</i> | 0 | 0,4 |
| <i>Thermoanaerobacteraceae</i> | 0 | 36,1 |
| <i>Nitrospiraceae</i> | 0 | 27,8 |
| <i>Thermaceae</i> | 0 | 11,7 |
| <i>Caldiseriaceae</i> | 0 | 2,8 |
| <i>Staphylococcaceae</i> | 0 | 2,7 |
| <i>Moraxellaceae</i> | 0 | 0,8 |
| <i>Aquificaceae</i> | 0 | 0,4 |
| <i>Clostridiaceae</i> | 0 | 0,3 |
| <i>Sulfobacillus</i> | 0 | 0,2 |
| <i>Micrococcaceae</i> | 0 | 0,2 |
| <i>Streptococcaceae</i> | 0 | 0,2 |
| <i>Enterobacteraceae</i> | 0 | 0,2 |
| unassigned | 7,9 | 14,8 |

In der zweiten Sequenzierung wurde der Schwerpunkt auf einen möglichen Unterschied in der taxonomischen Verteilung der Organismen zwischen der sessilen und der planktonischen Phase gelegt. Es wurden dieselben Primer für Archaea und Bacteria und auch dasselbe PCR-Programm wie bei der ersten Sequenzierung verwendet. Diese Sequenzierung lieferte 6495 *reads* für Archaea auf der Kathode und 7702 *reads* für Archaea in der Flüssigphase. Für Bacteria wurden 8369 *reads* auf der Kathode und 5774 *reads* in der Flüssigphase detektiert. Die Ergebnisse dieser Sequenzierung sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt und die Tabellen 22 und 23 zeigen die prozentuale Verteilung der einzelnen OTUs und deren taxonomische Zuordnung.

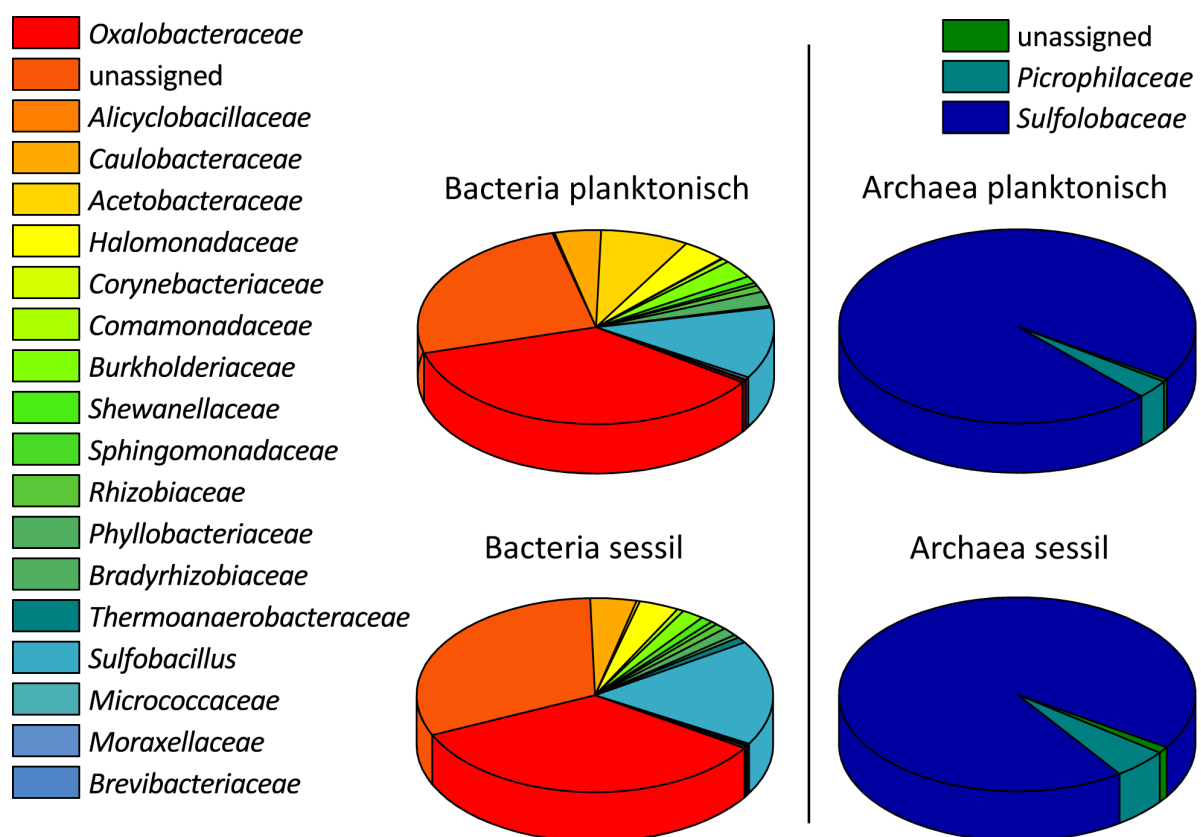


Abbildung 12: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität im Biofilm auf der Kathode und der planktonischen Phase im Reaktor.

Tabelle 22: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea auf der Kathode und in der planktonischen Phase (zu Abbildung 12).

| Taxonomie | Kathode (%) | Planktonisch (%) |
|-------------------------|-------------|------------------|
| <i>Sulfobacillaceae</i> | 93,9 | 96,4 |
| <i>Picrophilaceae</i> | 5 | 3,1 |
| unassigned | 1,1 | 0,5 |

Diese Analyse zeigte keinen deutlichen Unterschied bezüglich der Verteilung der Organismen auf der Kathode und der planktonischen Phase. Nahezu alle OTUs für Archaea wurden zur Familie *Sulfolobaceae* zugeteilt, einige wenige der Familie *Picrophilaceae*. Die genaue Auflistung ist Tabelle 22 zu entnehmen. Ein ähnliches Bild zeigt die Einteilung der OTUs für Bacteria. Die am häufigsten vertretene Familie waren die *Oxalobacteraceae* (ca. 35%), gefolgt von *Sulfobacillus* sp. (17,4% auf der Kathode und 11,9% in der planktonischen Phase) und *Caulobacteraceae* (4,2%). In beiden Proben konnte mehr als ein Viertel der *reads* nicht taxonomisch zugeordnet werden (31,4% der *reads* auf der Kathode und 25,5% der *reads* aus der planktonischen Phase). Deutliche Unterschiede zwischen der planktonischen und der sessilen Phase sind nur unter den *Sulfobacillus* sp. und den *Acetobacteraceae* (0,3% auf der Kathode und 8% in der planktonischen Phase) zu vermerken. Eine detaillierte Zusammenstellung ist Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria auf der Kathode und in der planktonischen Phase (zu Abbildung 12).

| Taxonomie | Kathode (%) | Planktonisch (%) |
|--------------------------------|-------------|------------------|
| <i>Acidithiobacillaceae</i> | 0 | 0,5 |
| <i>Oxalobacteraceae</i> | 34,1 | 35,9 |
| <i>Alicyclobacillaceae</i> | 0 | 0,2 |
| <i>Caulobacteraceae</i> | 4,2 | 4,2 |
| <i>Acetobacteraceae</i> | 0,3 | 8 |
| <i>Halomonadaceae</i> | 3,6 | 4 |
| <i>Corynebacteriaceae</i> | 0 | 0,1 |
| <i>Comamonadaceae</i> | 0,6 | 0,7 |
| <i>Burkholderiaceae</i> | 2 | 3 |
| <i>Shewanellaceae</i> | 1,1 | 1,2 |
| <i>Phyllobacteriaceae</i> | 1,4 | 2,4 |
| <i>Rhizobiaceae</i> | 1 | 1,1 |
| <i>Sphingomonadaceae</i> | 0,6 | 0,5 |
| <i>Bradyrhizobiaceae</i> | 0,5 | 0,3 |
| <i>Thermoanaerobacteraceae</i> | 1 | 0 |
| <i>Sulfobacillus</i> | 17,4 | 11,9 |
| <i>Micrococcaceae</i> | 0,3 | 0 |
| <i>Moraxellaceae</i> | 0,2 | 0,4 |
| <i>Brevibacteriaceae</i> | 0,3 | 0,1 |
| unassigned | 31,4 | 25,5 |

Metagenom-Analyse

Um Auskunft über mögliche StoffwechsellLeistungen der Gemeinschaft an Mikroorganismen auf der Kathode zu erhalten und darüber hinaus eine Vergleichsdatenbank zur Analyse des Metatranskriptoms zu generieren, wurde die gesamte genomische DNA aller Zellen auf der Kathode sequenziert und analysiert. Da nur eine begrenzte Menge an Material zur Verfügung stand, musste die DNA vor der Sequenzierung zunächst amplifiziert werden. Dies erfolgte mithilfe der ϕ 29 Polymerase nach der in Abschnitt 4.6.4 beschriebenen Methode. Die amplifizierte DNA wurde am Institut für Toxikologie und Genetik (KIT, Campus Nord) weiter für die Illumina-Sequenzierung vorbereitet, sequenziert und anschließend von Dr. Andreas Dötsch am Institut für funktionale Grenzflächen (KIT, Campus Nord) bioinformatisch aufgearbeitet. Die Sequenzierung erfolgte mittels PE100 (also mit je 2 x 100 bp). Als Ergebnis der Sequenzierung wurden 112,6 Millionen Readpaare erhalten. Das Assembly der Rohdaten erfolgte mit der Software idba-ud (Peng *et al.* 2012). Das Metagenom konnte zu 34523 *contigs* mit einer Gesamtlänge von 78,30 Mbp zusammengefügt werden. Die Länge eines mittleren *contigs* betrug 10884 bp. Eine Genvorhersage über MetaGeneMark ergab, dass 99303 kodierende Sequenzen (CDS = *coding sequences*) im Metagenom enthalten waren.

Da es nicht möglich war, direkt über die Sequenzen taxonomische Informationen, in Form von 16S *reads*, zu erlangen, wurden die korrespondierenden Proteinsequenzen des assemblierten Metagenoms zur Erstellung einer Phylogenie verwendet. Dabei wurden jeweils die besten und häufigsten Treffer einer BLAST-Suche für die Gene eines *contigs/scaffolds* einer bestimmten Spezies zugeordnet. Die daraus resultierende Taxonomie, auf Familienebene, ist in Abbildung 13 und der zugehörigen Tabelle 24 dargestellt. Die beiden hauptsächlich vertretenen Familien machen demnach mehr als 50 % aller Proteinsequenzen des Metagenoms aus und gehören beide zu den Firmicutes (*Thermoanaerobacteraceae* und *Peptococcaceae*). 18,8 % aller im Metagenom gefundenen Proteine können insgesamt 5 Familien innerhalb der Archaea zugeschrieben werden (grün markiert in Tabelle 24). Diese umfassen: *Sulfolobaceae*, *Thermoplasmataceae*, *Archaeoglobaceae*, *Nitrosopumilaceae* und *Picrophilaceae*.

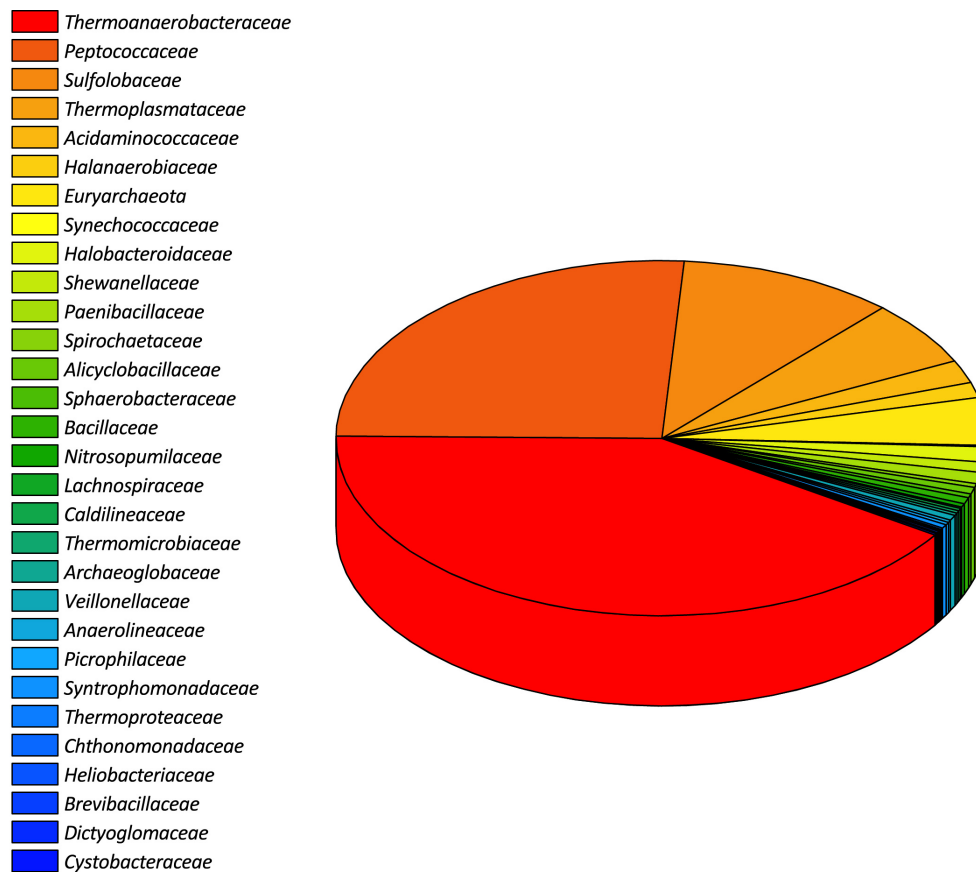


Abbildung 13: Graphische Darstellung der phylogenetischen Zuordnung (auf Familienebene) der im Metagenom gefundenen Gene.

Tabelle 24: Auflistung der prozentualen Verteilung der Gene und deren taxonomischer Zuordnung (zu Abbildung 13). Archaea sind grün hinterlegt.

| Taxonomie (Phylum) | Taxonomie (Familie) | Gene (%) |
|--------------------|--------------------------------|----------|
| Firmicutes | <i>Thermoanaerobacteraceae</i> | 35,1 |
| Firmicutes | <i>Peptococcaceae</i> | 22,2 |
| Crenarchaeota | <i>Sulfolobaceae</i> | 9,2 |
| Euryarchaeota | <i>Thermoplasmataceae</i> | 5,1 |
| Euryarchaeota | <i>Euryarchaeota</i> | 3,7 |
| Firmicutes | <i>Acidaminococcaceae</i> | 1,8 |
| Firmicutes | <i>Halanaerobiaceae</i> | 1,2 |
| Firmicutes | <i>Halobacteroidaceae</i> | 1,2 |
| Firmicutes | <i>Paenibacillaceae</i> | 0,9 |
| Proteobacteria | <i>Shewanellaceae</i> | 0,8 |
| Firmicutes | <i>Alicyclobacillaceae</i> | 0,5 |
| Firmicutes | <i>Bacillaceae</i> | 0,5 |
| Firmicutes | <i>Veillonellaceae</i> | 0,4 |
| Spirochaetes | <i>Spirochaetaceae</i> | 0,3 |
| Chloroflexi | <i>Sphaerobacteraceae</i> | 0,3 |
| Thaumarchaeota | <i>Nitrosopumilaceae</i> | 0,3 |

| | | |
|-----------------|----------------------------|-----|
| Firmicutes | <i>Syntrophomonadaceae</i> | 0,3 |
| Chloroflexi | <i>Caldilineaceae</i> | 0,2 |
| Chloroflexi | <i>Thermomicrobiaceae</i> | 0,2 |
| Euryarchaeota | <i>Archaeoglobaceae</i> | 0,2 |
| Chloroflexi | <i>Anaerolineaceae</i> | 0,2 |
| Euryarchaeota | <i>Picrophilaceae</i> | 0,2 |
| Cyanobacteria | <i>Synechococcus</i> | 0,1 |
| Firmicutes | <i>Lachnospiraceae</i> | 0,1 |
| Crenarchaeota | <i>Thermoproteaceae</i> | 0,1 |
| Armatimonadetes | <i>Chthonomonadaceae</i> | 0,1 |
| Firmicutes | <i>Heliobacteriaceae</i> | 0,1 |
| Firmicutes | <i>Brevibacillaceae</i> | 0,1 |
| Dictyoglomi | <i>Dictyoglomaceae</i> | 0,1 |
| Proteobacteria | <i>Cystobacteraceae</i> | 0,1 |

Bei der Untersuchung des Metagenoms stand die Suche nach CO₂-Fixierungswegen sowie möglichen Mechanismen zur Elektronenaufnahme von der Kathode im Vordergrund. Weiterhin sollte nach potentiellen terminalen Reduktasen gesucht werden. Zu diesem Zweck wurde das Metagenom neben dem Abgleich mit der nicht redundanten Datenbank von NCBI und einer Analyse über KEGG zusätzlich noch mit zwei extra hierfür erstellten Datenbanken abgeglichen. Eine der dabei verwendeten Datenbanken, die Schlüsselenzyme der bekannten CO₂-Fixierungswege enthält, wurde von Michael Hügler (Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe) erstellt. Die zweite Datenbank wurde im Rahmen dieser Arbeit angefertigt. Sie umfasst Proteinsequenzen bekannter Eisenoxidationswege (z.B. Mto-Cluster aus *Sideroxydans lithotrophicus*, Fox-Cluster aus *Rhodobacter ferrooxidans*, Rusticyanin und Cyc2 aus *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Pio-Cluster aus *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1, Eisenoxidationscluster aus *Gallionella capsiferriformans* und Fox-Cluster sowie Sulfocyanine aus Archaeen). Weiterhin enthält diese Datenbank Proteinsequenzen von eisen-reduzierenden Mikroorganismen, für die gezeigt werden konnte, dass die Wege der Elektronen umkehrbar sind (MtrABC-Cluster aus *S. oneidensis*, PccH aus *G. sulfurreducens*), sowie Homologe zu diesen Proteinen. Die Analyse des Metagenoms ergab, dass eine Fixierung von CO₂ prinzipiell über den Wood-Ljungdahl Weg, den 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Weg, den 3-Hydroxypropionat-Bizyklus, den reduktiven Citratzyklus und den Calvin-Zyklus möglich ist. Bezüglich der Mechanismen zur Aufnahme der Elektronen von der Kathode konnten homologe Sequenzen zu PioAB, MtrAB, Rusticyanin, den Fox-Proteinen und Sulfocyaninen ausfindig gemacht werden. Weiterhin wurden auch Homologe zu

periplasmatischen Elektronenüberträgern wie PccH und andere Cytochrome gefunden. Außerdem sind Sequenzen für Hydrogenasen und Formiat-Dehydrogenasen im Metagenom enthalten. Was die Verwendung möglicher Elektronenakzeptoren angeht, sind in dem Metagenom die Informationen für CO₂-Atmung, Nitratammonifizierung sowie für die Reduktion von Sulfat und Sauerstoff enthalten.

Metatranskriptom-Analyse

Um weiter Auskunft darüber zu bekommen, welche Stoffwechselwege von zentraler Bedeutung in den Zellen des Biofilms auf der Kathode sind, sollte ein Metatranskriptom erstellt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die gesamte RNA der Zellen isoliert und anschließend amplifiziert (Methoden 4.6.5). Da es bei einem ersten Versuch nicht möglich war, die RNA direkt zu sequenzieren, wurde diese in einem erneuten Ansatz zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend, wie auch die genomische DNA, über Illumina-Sequenzierung analysiert. Die bioinformatische Analyse erfolgte wie auch bei der Erstellung des Metagenoms in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Dötsch. Auch diese Sequenzierung erfolgte, wie bei der Sequenzierung des Metagenoms, über PE100. Das Ergebnis lieferte 20,54 Millionen Readpaare in den Rohdaten, nach der Vorfilterung waren es noch 2 Millionen Paare.

Zunächst erfolgte ein Abgleich der RNA-Rohdaten und der vorgefilterten RNA *reads* mit dem zuvor erstellten Metagenom als Referenz. Anschließend wurden dieselben spezifischen Datenbanken, die schon zur Analyse des Metagenoms herangezogen worden waren, verwendet, um Antworten auf die für diese Arbeit zentralen Fragen zu erhalten. Die Identifikation einzelner Enzymgruppen erfolgte durch Indexierung nach Stichworten. Tabelle 25 und Abbildung 14 enthalten eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu den im Metatranskriptom enthaltenen CO₂-Fixierungswegen. Eine detaillierte Aufstellung aller gefundenen Enzyme kann Tabelle 26 entnommen werden. Um taxonomische Informationen zu den einzelnen Wegen zu bekommen wurden die zur CO₂-Datenbank gemappten Sequenzen weiter mit dem Metagenom abgeglichen. Das Ergebnis dieser Auswertung ist, soweit möglich, Tabelle 26 zu entnehmen. Bei manchen *reads* gab es Diskrepanzen zwischen den beiden verwendeten Datenbanken, hier sind beide möglichen CO₂-Fixierungswege angegeben. Die 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase kommt zum Beispiel sowohl im

3-Hydroxypropionat/ 4-Hydroxybutyrat-, wie auch beim Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Weg vor. Die *reads* wurden deswegen zu beiden Wegen gerechnet. Es konnten jedoch auch 175 *reads* für die Acetyl-CoA-Carboxylase im Metatranskriptom gefunden werden. Dieses Enzym kommt nur im 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Weg vor.

Tabelle 25: Zusammenfassung der Transkriptom-Ergebnisse zu CO₂-Fixierung.

| CO ₂ -Fixierungsweg | Anzahl <i>reads</i> gesamt | Kommentar |
|--|----------------------------|--|
| Wood-Ljungdahl-Weg (WL) | 190 | Manchmal Diskrepanz zwischen Abgleich mit CO ₂ -Datenbank und Metagenom (auch als 3HP/4HB). |
| 3-Hydroxypropionat/ 4-Hydroxybutyrat-Weg (3HP/4HB) | 103 | Manchmal Diskrepanz zwischen Abgleich mit CO ₂ -Datenbank und Metagenom (auch als WL). Enzym auch beteiligt im Dicarboxylat/ 4-Hydroxybutyrat-Weg. Über Metagenom Abgleich 175 Acetyl-CoA-carboxylase <i>reads</i> (hauptsächlich zu <i>Acidianus</i>). |
| Dicarboxylat/ 4-Hydroxybutyrat-Weg (Dicarb/4HB) | 85 | Enzym auch beteiligt im 3-Hydroxypropionat/ 4-Hydroxybutyrat-Weg. |
| Reduktiver Citratzyklus (rTCA) | 140 | Davon 21 x ATP Citrat-Lyase |
| Calvin-Zyklus | 6 | Nur 1 x Rubisco |

Tabelle 26: Detaillierte Auflistung der im Metatranskriptom gefundenen Schlüsselenzyme zu den CO₂-Fixierungswegen. Angegeben ist das Protein aus der CO₂-Datenbank, der zugehörige CO₂-Fixierungsweg, die Anzahl an gemappten RNA *reads*, sowie wenn möglich die taxonomische Information aus dem Metagenom.

| Protein (GI) | Anzahl RNA reads (raw) | CO ₂ -Fixierungsweg | Taxonomie aus Metagenom |
|--|------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| succinyl-CoA synthetase subsunit alpha (570725076) | 93 | rTCA | |
| acetyl-CoA synthetase (500595987) | 68 | WL | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (499288428) | 33 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | <i>Acidianus/ Acidianus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (495570718) | 31 | WL | <i>Thermoplasma/ Thermoplasma</i> |
| acetyl-CoA synthetase (497101926) | 21 | WL,3HP/4HB | <i>Sulfolobus/ Sulfolobus</i> |
| MULTISPECIES: CoA-binding domain protein (505232740) | 18 | rTCA | |
| ATP-citrate lyase/succinyl-CoA ligase (503303113) | 16 | rTCA | |

| | | | |
|---|----|---------------------|---|
| Vinylacetyl-CoA delta-isomerase (356641489) | 14 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | <i>Vulcanisaeta/ Acidianus</i> |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (496360681) | 13 | 3HP/4HB, dicarb/4HB | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (850926382) | 13 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | |
| NAD-dependent epimerase/dehydratase:Short-chain dehydrogenase/reductase SDR (494285597) | 12 | WL | |
| acetyl-CoA synthetase (648552728) | 11 | WL | <i>Desulfotomaculum/ Desulfotomaculum</i> |
| acetyl-CoA synthetase (655968805) | 11 | WL | <i>Acetonema/ Thermococcus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (660653233) | 9 | WL, 3HP/4HB | <i>Sulfolobus/ Sulfolobus</i> |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (851188487) | 8 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | |
| acetyl-CoA synthetase (493609584) | 8 | WL | <i>Haliangium/ Desulfatibacillum</i> |
| acetyl-CoA synthetase (652837222) | 6 | WL, 3HP/4HB | <i>Acidianus/ Acidianus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (648400260) | 5 | WL | <i>Acidianus/ Sulfolobus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (501491146) | 5 | WL | |
| phosphoribulokinase (488796584) | 5 | Calvin-Zyklus | |
| ATPase (657724843) | 4 | rTCA | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (503792817) | 3 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | <i>Carboxydotherrmus/ Thermosinus</i> |
| ATP citrate synthase (674769257) | 3 | rTCA | |
| acetyl-CoA synthetase (646256595) | 2 | WL, 3HP/4HB | <i>Acidianus/ Acidianus</i> |
| AMP-binding enzyme (545377718) | 2 | WL | <i>Caldisphaera/ Thermococcus</i> |
| ATP citrate synthase (655805784) | 2 | rTCA | |
| ATP citrate synthase (675588977) | 2 | rTCA | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (568210153) | 1 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | |
| acetyl-CoA decarboxylase (493570188) | 1 | WL | |
| acetyl-CoA decarboxylase (506237093) | 1 | WL | |
| acetyl-CoA synthetase (506422366) | 1 | WL | <i>Metallosphaera/ Sulfolobus</i> |
| acyl-CoA synthetase/AMP-acid ligase (505135753) | 1 | 3HPBicyc | <i>Thermoanaerobacterium/ Carboxydotherrmus</i> |
| acetyl-CoA decarboxylase (503040644) | 1 | WL | |
| ATP citrate lyase (501499910) | 1 | rTCA | |
| ATP citrate synthase (503404062) | 1 | WL | |

| | | |
|---|---|---------------|
| ribulose bisphosphate carboxylase (518331021) | 1 | Calvin-Zyklus |
| ATP citrate lyase (499677062) | 1 | rTCA |

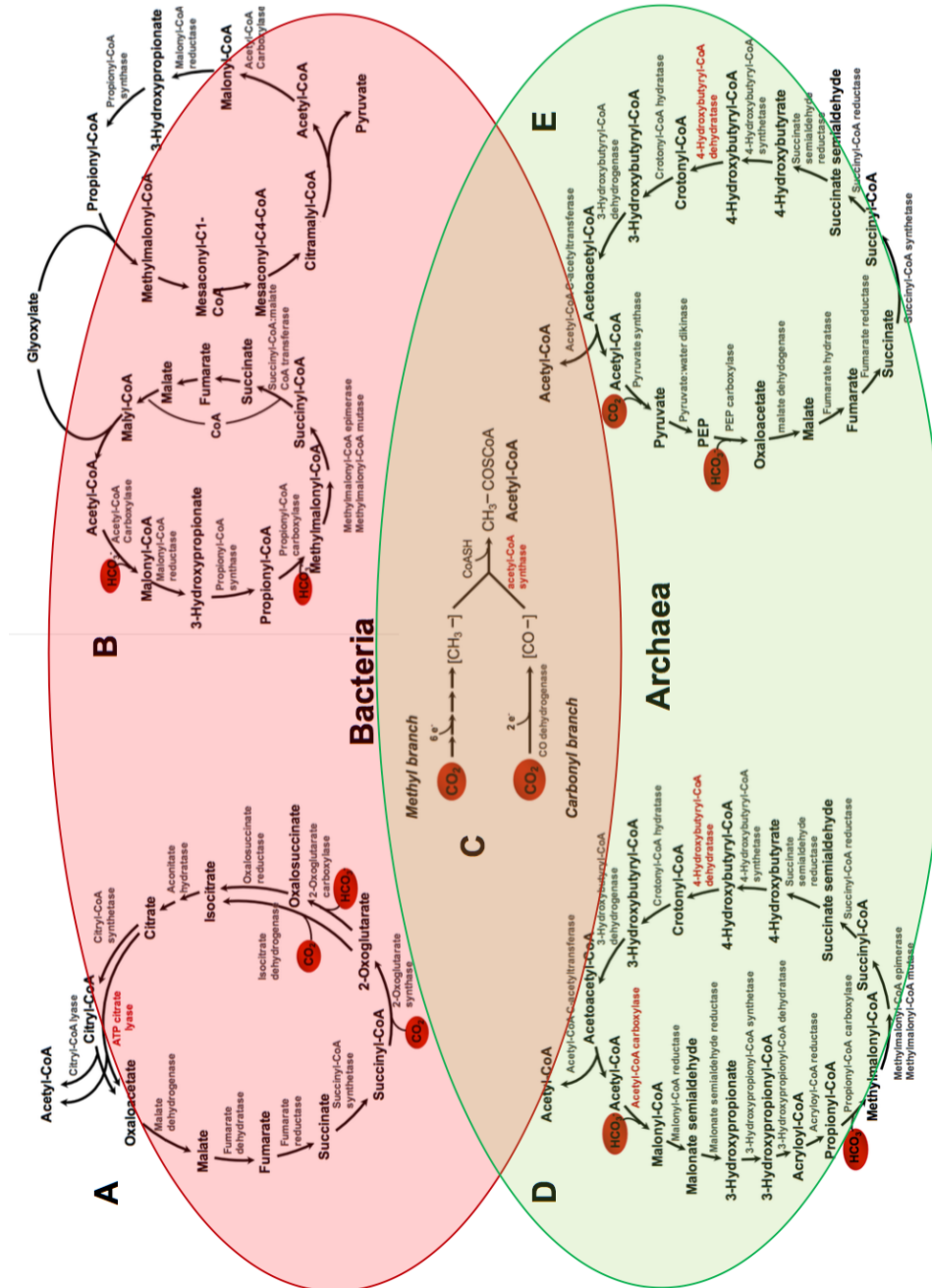


Abbildung 14: Schematische Darstellung der CO₂-Fixierungswege. Die Schlüsselenzyme, zu denen reads im Metatranskriptom gefunden wurden sind rot markiert. **A** Reduktiver Citratzyklus. **B** 3-Hydroxypropionat-Bicyclus. **C** Wood-Ljungdahl-Weg. **D** 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus. **E** Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus. (verändert nach Hügler (Hügler and Sievert 2011)).

Bezüglich des extrazellulären Elektronentransfers von der Kathode in die Zellen konnten über einen Abgleich der RNA Rohdaten Proteine, welche für die Eisenoxidation zuständig sind, detektiert werden. Es konnten 39 der 52 in der Datenbank enthaltenen Proteine identifiziert werden. Unter den identifizierten Proteinen waren unter anderem Sequenzen, die Ähnlichkeit zu FoxA, B, C aus *Sulfolobus metallicus* und MtrA, B, C aus *S. oneidensis* hatten. Weiter wurden *reads* passend zum Eisenoxidations-Cluster aus *Gallionella capsiferiformans*, sowie Rusticyanin und Iro aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* gefunden. In Abbildung 15 sind einige bekannte Mechanismen zur Oxidation von FeII, und damit denkbare Mechanismen zur Aufnahme von Elektronen von der Kathode, schematisch dargestellt. Diejenigen Elemente der einzelnen Eisenoxidations-Wege, die über korrespondierende RNA *reads* im Metatranskriptom vorhanden waren, sind rot markiert. Tabelle 27 zeigt eine Auflistung aller gefundenen RNA *reads* zu möglichen Mechanismen des Elektronentransfers von der Kathode in die Zellen. Diese beinhalten auch Transkripte für Hydrogenasen und Formiat-Dehydrogenasen.

Tabelle 27: Auflistung möglicher Mechanismen des Elektronentransfers von der Kathode in die Zellen mit Schlüsselenzymen und der Anzahl jeweils gefundener RNA reads.

| Mechanismus zur Elektronenaufnahme | Schlüsselenzym | Anzahl an RNA reads |
|---|------------------------------------|---------------------|
| Formiat | Formiat Dehydrogenase, alpha Kette | 44 |
| Wasserstoff | Membrane-bound NiFe- hydrogenases | 211 |
| | coenzyme F420-reducing hydrogenase | 59 |
| Direkter Elektronentransfer | FoxA (<i>S. metallicus</i>) | 162 |
| | FoxB (<i>S. metallicus</i>) | 1 |
| | FoxC (<i>S. metallicus</i>) | 77 |
| | Iro (<i>A. ferrooxidans</i>) | 3 |
| | Rusticyanin | 67 |
| | Sulfocyanin | 38 |
| | MtrA/PioA/DmsE | 53 |
| | MtrB/PioB | 224 |
| | MtrC | 8 |
| | Cytochrome c | 140 |
| PccH (<i>G. sulfurreducens</i>) | 5 | |
| Cytochrome c oxidase (<i>S. solfataricus</i>) | 38 | |

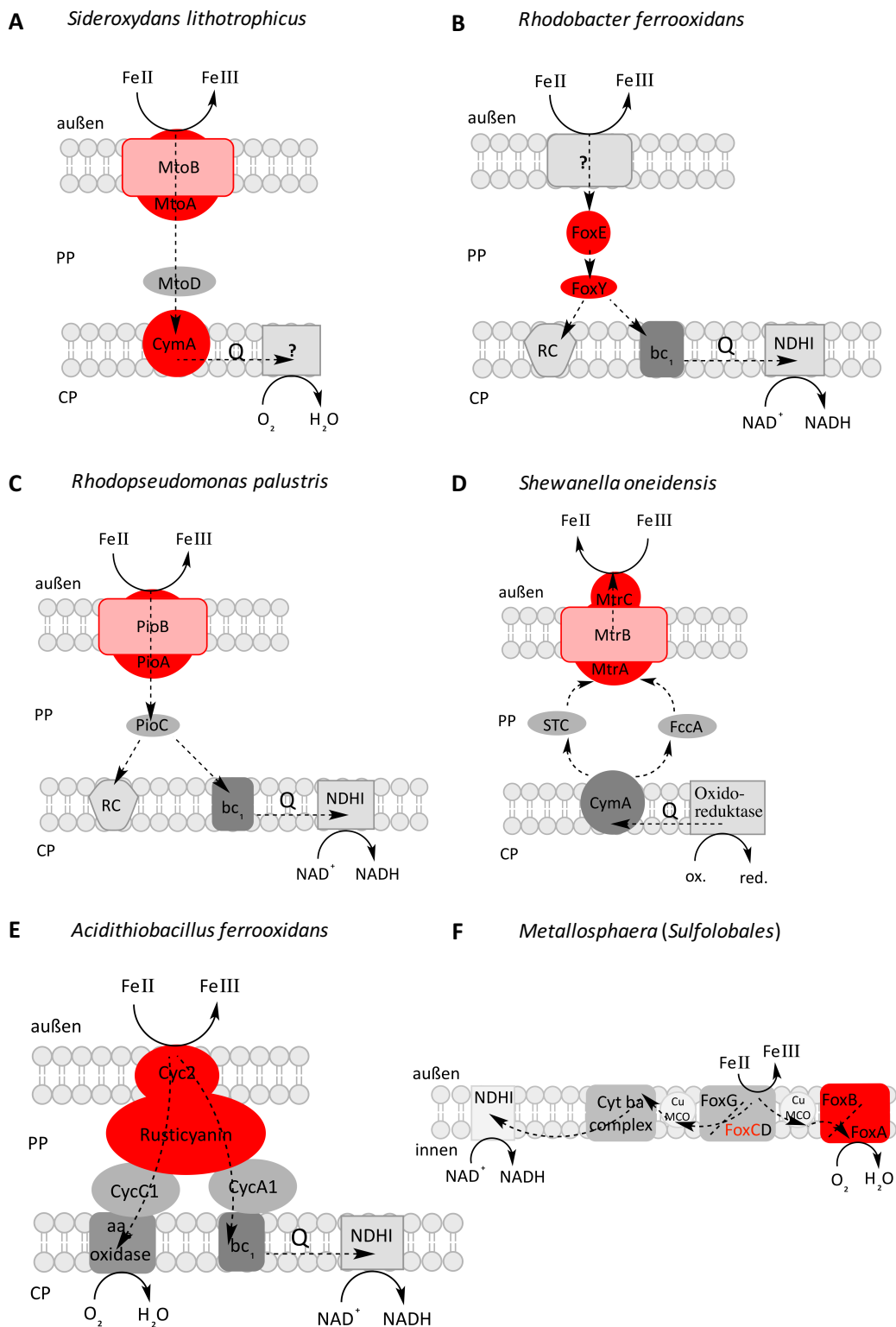
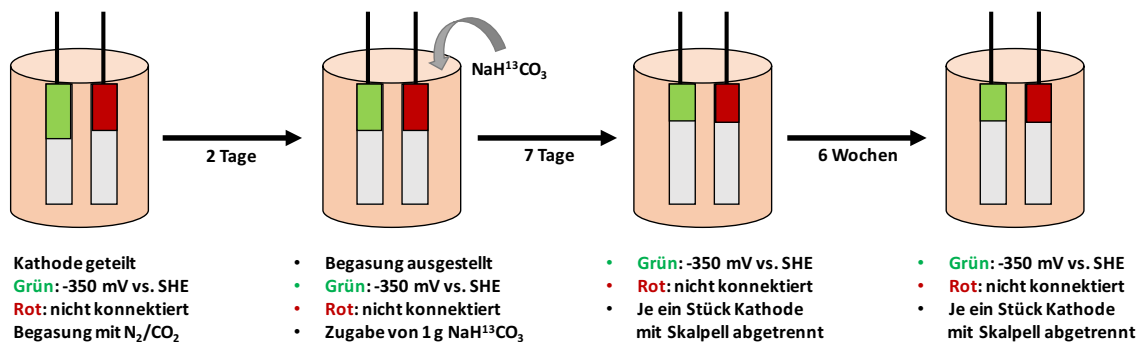


Abbildung 15: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen zur direkten Aufnahme von Elektronen von einer Kathode. Abgebildet sind die Mechanismen bekannter Eisenoxidierer, sowie der Mechanismus der Eisenreduktion in *Shewanella oneidensis*. In rot hervorgehoben sind diejenigen Proteine, für die entsprechende Sequenzen im Metatranskriptom gefunden wurden. **A** *Sideroxydans lithotrophicus*. **B** *Rhodobacter ferrooxidans*. **C** *Rhodopseudomonas palustris*. **D** *Shewanella oneidensis*. **E** *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **F** *Metallosphaera (Sulfolobales)*.

¹³C-Inkorporation

Über Metagenom und Metatranskriptom konnten mehrere Schlüsselenzyme aus bekannten CO₂-Fixierungswegen identifiziert werden. Im Folgenden sollte ein weiterer Beweis erbracht werden, der die autotrophe Lebensweise der Gemeinschaft an Mikroorganismen auf der Kathode bestätigt. Zu diesem Zweck wurde ein Experiment mit ¹³C-markiertem Bicarbonat durchgeführt (siehe Methoden 4.5). Bei der Kohlenstoff-Isotopen-Fraktionierung wird die Menge an ¹²C und ¹³C in einer Probe relativ zu einem Standard bestimmt. Die Werte einer Isotopen-Fraktionierung sind normalerweise sehr klein und werden daher in Promille als δ¹³C-Wert angegeben. In Abbildung 16 sind der Versuchsaufbau, die Probenvorbereitung, die Formel zur Berechnung des δ¹³C-Wertes und die Ergebnisse der NMR-Analyse übersichtlich dargestellt.

A Versuchsaufbau**B Probenaufbereitung**

- Zellen in 10 mM H₂SO₄ bei 10 Hz aus dem Vlies lösen
- TOC-Analyse
- 500 µl in Zinnkartusche → lyophilisieren
- NMR-Analyse:

C $\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{Probe}} - {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{Standard}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{Standard}}} \right] \times 1000$

D Ergebnis der Isotopenanalyse

| | δ ¹³ C -350 mV vs. SHE | δ ¹³ C nicht konnektiert |
|----------|---|---|
| 7 Tage | 61 ‰ | -28 ‰ |
| 6 Wochen | 226 ‰ | -20,1 ‰ |

Abbildung 16: Versuchsaufbau ¹³C-Inkorporation. Dargestellt ist der Reaktor mit zwei Kathoden von denen eine über den Potentiostaten mit Elektronen von -350 mV vs. SHE versorgt wird (grün) und eine nicht konnektiert ist (rot). **A** Versuchsaufbau. **B** Ablauf der Probenvorbereitung. **C** Formel zur Berechnung von δ¹³C. **D** Tabelle mit den Ergebnissen der Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance* = NMR) dargestellt.

Diese Analyse zeigte, dass eine Inkorporation von ¹³C ausschließlich in den Zellen stattfand, die sich auf der Kathode befanden, welche über den Potentiostaten mit Elektronen

von -350 mV vs. SHE versorgt wurden. Die erste Probe wurde eine Woche nach der Zugabe des ^{13}C -markierten Bicarbonats in den Elektrosynthese-Reaktor entnommen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Probe von der Kathode, die an den Potentiostat angeschlossen war, einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von 61 ‰, wohingegen die Kathode, welche nicht mit Elektronen versorgt wurde, einen Wert von -28 ‰ aufwies. Nach sieben Wochen wurde das Experiment beendet. Zu diesem Zeitpunkt lag der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert für die Probe der konnektierten Kathode bei 226 ‰, während sich der Wert in der Probe von der Kathode ohne Elektronenzufuhr kaum änderte; dieser lag bei -20,1 ‰.

5.1.2 Transplantations-Versuch

Während dieser Arbeit wurde mehrmals versucht, das initial im Elektrosynthese-Reaktor angereicherte Konsortium in einen neuen Elektrosynthese-Reaktor zu überführen. Die alleinige Überführung der Flüssigphase resultierte dabei nicht in einem wünschenswerten Ergebnis. Daher war eine weitere Überlegung, einen Teil der bewachsenen Kathode steril zu entfernen und diesen auf eine neue Kathode aufzubringen. Zusätzlich zu dieser Transplantation wurde auch 1 L der Flüssigphase in den neuen Elektrosynthese-Reaktor überführt, und beide Systeme wurden mit frischem Medium aufgefüllt. Die Ergebnisse dieser Transplantation werden im Folgenden dargestellt. Die Bezeichnungen des alten und neuen Reaktors sind mit Spender und Transplant angegeben.

Chronoamperometrie

Abbildung 17 zeigt die Änderung der Stromstärke für den Spender- und den Transplant-Reaktor, bei einem konstant angelegten Potential von -350 mV vs. SHE, über ca. 37 Wochen. In rot ist der Verlauf der Stromstärke für den Transplant-Reaktor und in schwarz der Verlauf für den Spender dargestellt. Die Datensätze wurden, wie für die initiale Anreicherung, geglättet (Savitzky-Golay Filter, 160 Punkte für die Berechnung der lokalen quadratischen Regression), um das Rauschen zu vermindern, und dann als Punktdiagramm nach der Zeit aufgetragen. Eingriffe in das System sind in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet. Während die Stromstärke im Spender-Reaktor direkt nach dem Anschließen an den Potentiostaten abnahm, erfolgte die Abnahme im Transplant-Reaktor um einiges langsamer. In Woche 15 wurde in dem Spender-Reaktor die Referenzelektrode ausgetauscht und ein

neuer Stecker an der Gegenelektrode montiert, da der alte korrodiert war. Dieser Eingriff bewirkte eine unmittelbare Änderung der Stromstärke von -0,45 mA auf -0,8 mA, ferner war der nachfolgende Kurvenverlauf ähnlich. Vor der Entnahme eines Teils der Kathode (Abbildung 17, Woche 26) erreichte der Spender-Reaktor eine Stromstärke -1,2 mA. Da die Kathode des Spender-Reaktors bereits zu Beginn des Experiments nicht dieselbe Fläche wie die des unbeschnittenen Transplant-Reaktors aufwies, macht ein Vergleich der Stromdichten zu diesem Zeitpunkt keinen Sinn. Bis zu dem Zeitpunkt der Entnahme eines Stückes der Kathode wurde im Transplant-Reaktor eine Stromdichte von $0,125 \text{ A/m}^2$ erreicht. Bereits zu diesem Zeitpunkt war der Transplant-Reaktor deutlich über dem gemessenen Wert der nicht beimpften Kontrolle, welcher eine Stromdichte von $0,063 \text{ A/m}^2$ aufwies. Am Ende des Experiments zeigten der Spender- und der Transplant-Reaktor vergleichbare Stromstärken von ca. -0,55 mA. Dies entspricht einer Stromdichte von $0,375 \text{ A/m}^2$ im Transplant-Reaktor. Unter der Annahme, dass die Kathodenfläche im Spender-Reaktor noch ca. halb so groß war (8 cm^2) wie ursprünglich wurde in diesem Reaktor sogar eine Stromdichte von $0,625 \text{ A/m}^2$ erreicht. Die detektierten Schwankungen im Kurvenverlauf sind auf Unterschiede in der Begasung, sowie auf Verdunstung des Mediums aufgrund der hohen Temperaturen und ein anschließendes Auffüllen mit ddH₂O zurückzuführen.

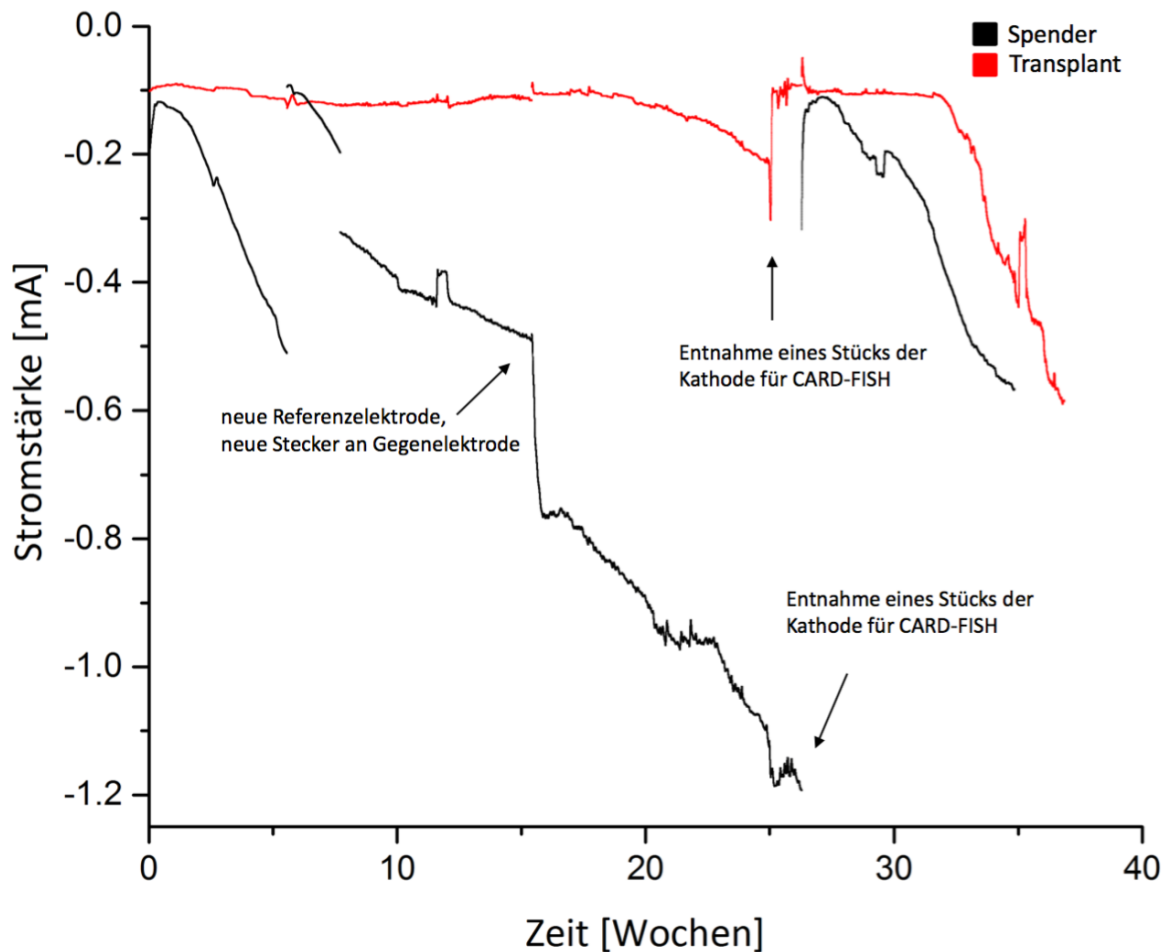


Abbildung 17: Änderung der Stromstärke im Spender- und Transplant-Reaktor. Das angelegte Potential entsprach -350 mV vs. SHE. Abgebildet sind die Stromstärken über einen Zeitraum von ca. 37 Wochen. Die rote Kurve zeigt die gemessene Stromstärke im Transplant-, die schwarze die Stromstärke im Spender-Reaktor. Eingriffe in das System sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Mikroskopische Analyse

Um zu bestätigen, dass die detektierte Änderung der Stromstärke auf die Aktivität von Mikroorganismen zurückzuführen ist, wurde ein Teil der Kathode steril entnommen und eine CARD-FISH Analyse durchgeführt. Die verwendeten Sonden und das Protokoll waren dabei dasselbe wie bereits für die Analyse der initialen Anreicherung (Spender-Reaktor) beschrieben.

CARD-FISH

Die Ergebnisse der CARD-FISH Analyse zeigen, dass sich aktive Bakterien auf den Graphit-Fasern der Kathode angesiedelt haben. Wie in Abbildung 18 zu sehen, gibt es Zellen, die nur mit DAPI (blau) angefärbt werden konnten, jedoch nicht mit der Sonde für Bacteria (rot). Die Inkubation mit der Sonde für Archaea lieferte kein Ergebnis.

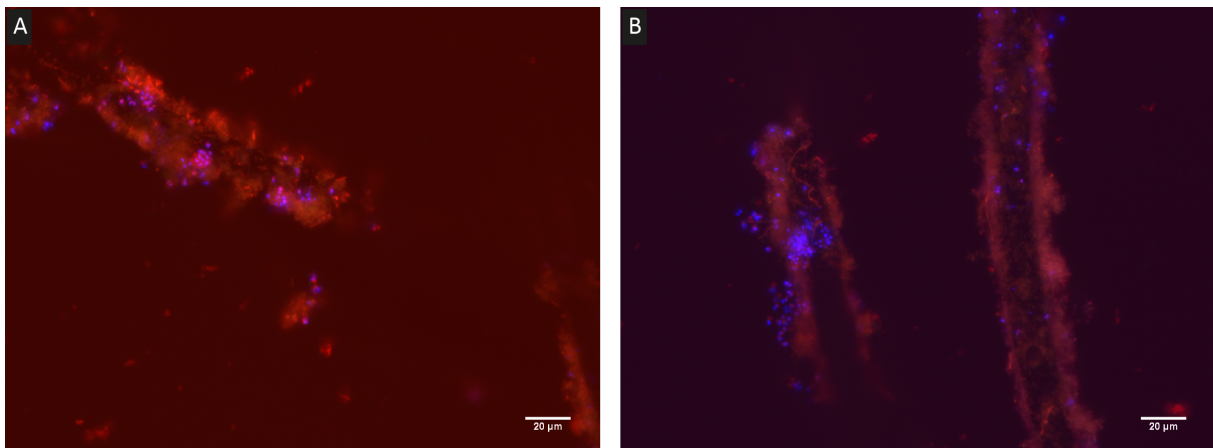


Abbildung 18: CARD-FISH Analyse der Kathode aus dem Transplant-Reaktor. Die Mikroorganismen wurden mit Sonden für Bacteria (EUB338-I, Alexa546, rot) und DAPI (blau) behandelt. Der Größenbalken entspricht in jedem Bild 20 µm.

5.1.3 Elektrosynthese-Versuch in Medium ohne HEPES

Nachdem der zu Beginn eingestellte neutrale pH-Wert bei der initialen Anreicherung innerhalb der ersten Wochen auf 3,5 gesunken war, wurden alle weiteren Medien auf diesen pH eingestellt. Die Zugabe von HEPES, das eine gute Pufferkapazität im Bereich von 6,8 – 8,2 besitzt, ergab ab diesem Moment zwar seitens eines Puffersystems keinen Sinn mehr, es wurde jedoch weiterhin zugegeben, um zu verhindern, dass eine unbekannte Komponente, die in HEPES vorhanden sein könnte, einen Erfolg der Anreicherung verhindern könnte. Um zu testen, ob HEPES für das initial angereicherte Konsortium wirklich notwendig ist, wurde daher im Verlauf dieser Arbeit ein Ansatz in Medium ohne HEPES überführt. In der Übersicht in Abbildung 7 sind die Elektrosynthese-Reaktoren ohne HEPES in grau dargestellt. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse für diesen Ansatz aufgeführt.

Chronoamperometrie

In Abbildung 19 ist die Änderung der Stromstärke für den Elektrosynthese-Reaktor ohne HEPES und eine nicht beimpfte Kontrolle desselben Mediums dargestellt. Der Graph zeigt die Änderung der Stromstärke bei einem angelegten Potential von -350 mV vs. SHE , über einen Zeitraum von ca. 50 Wochen. In rot ist der Verlauf der Stromstärke für den beimpften Elektrosynthese-Reaktor und in schwarz der Verlauf für das nicht beimpfte Medium dargestellt. Die Datensätze wurden, wie für die initiale Anreicherung, geglättet (Savitzky-Golay Filter, 160 Punkte für die Berechnung der lokalen quadratischen Regression), um das Rauschen zu vermindern, und dann als Punktdiagramm gegen die Zeit aufgetragen. Eingriffe in das System sind in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet. Für den beimpften Reaktor ist über die gesamte Zeit der Inkubation eine konstante Abnahme der Stromstärke zu verzeichnen. In Woche 28 wurde die Referenzelektrode ausgetauscht und ein neuer Stecker an der Gegenelektrode montiert, da der vorherige korrodiert war. Dieser Eingriff bewirkte eine Änderung der Stromstärke von $-0,3\text{ mA}$ auf $-0,15\text{ mA}$. Nach diesem Eingriff sank die Stromstärke jedoch unmittelbar weiter. Der Graph für die Kontrolle beginnt zwar auf einem niedrigeren Level, es war jedoch kein vergleichbares Absinken über die gemessene Zeit hin zu bemerken. Vor der Entnahme eines Teils der Kathode (Abbildung 19, Woche 39) erreichte der Elektrosynthese-Reaktor ohne HEPES eine Stromdichte von $0,27\text{ A/m}^2$. Die nicht beimpfte Kontrolle zeigte über die gemessene Zeit durchschnittlich eine Stromdichte von $0,09\text{ A/m}^2$. Die detektierten Schwankungen im Kurvenverlauf sind auf Unterschiede in der Begasung, sowie auf Verdunstung des Mediums bei den hohen Temperaturen und ein anschließendes Auffüllen mit ddH_2O zurückzuführen. Insgesamt kam der Elektrosynthese-Reaktor ohne HEPES während der gesamten Inkubationszeit nie auf die Stromdichten, die für die Ansätze mit HEPES verzeichnet werden konnten.

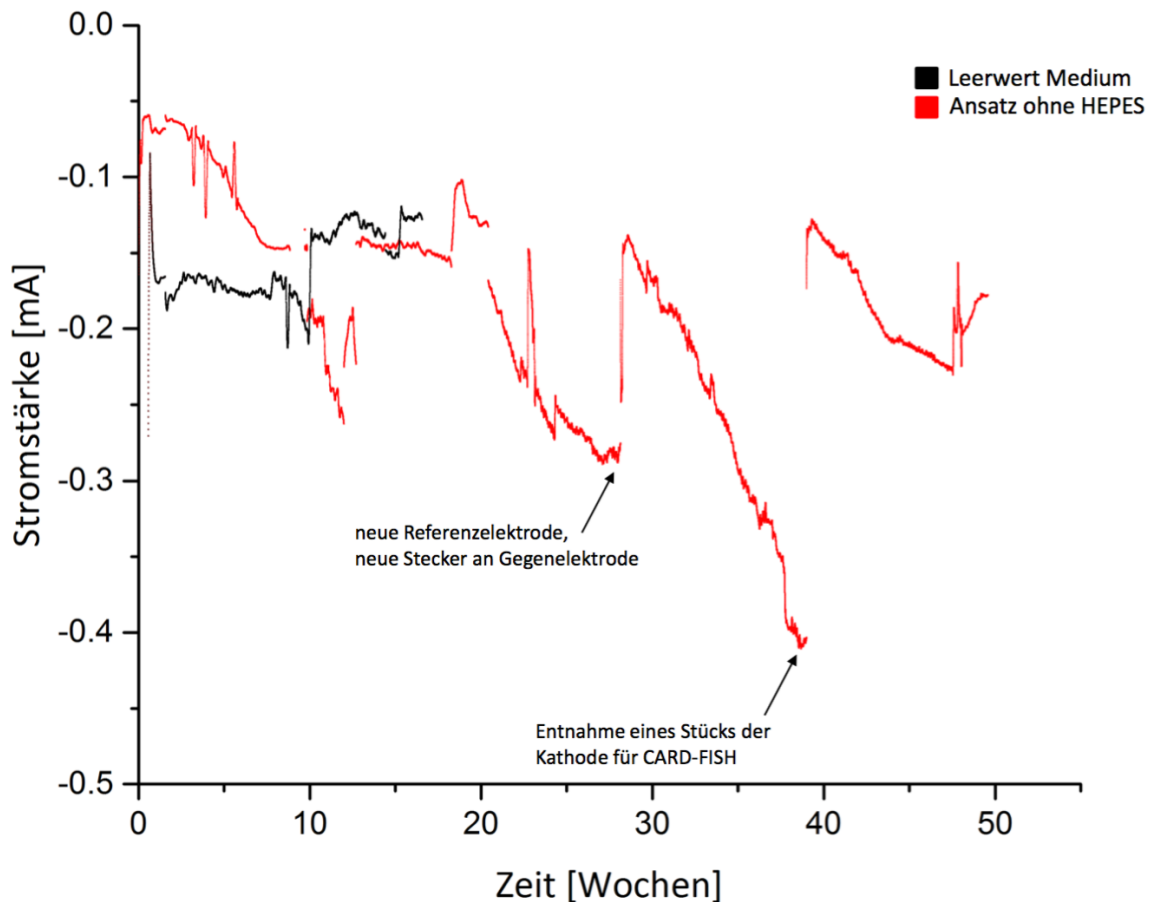


Abbildung 19: Änderung der Stromstärke in der Überführung ohne HEPES. Angelegt war ein konstantes Potential von -350 mV vs. SHE. Aufgetragen ist die Stromstärke über einen Zeitraum von ca. 50 Wochen. In rot ist die Stromstärke im Reaktor der Anreicherung ohne HEPES dargestellt, in schwarz die Kontrolle des Medienblindwerts. Eingriffe in das System sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Mikroskopische Analyse

Um zu bestätigen, dass die detektierte Änderung der Stromstärke auf die Aktivität von Mikroorganismen zurückzuführen ist, wurde ein Teil der Kathode steril entnommen und eine CARD-FISH Analyse durchgeführt. Die verwendeten Sonden und das Protokoll waren dabei dasselbe wie bereits für die Analyse der initialen Anreicherung beschrieben. Weiterhin wurden von dieser Kathode auch mit dem REM Aufnahmen gemacht.

CARD-FISH

Die Ergebnisse der CARD-FISH Analyse zeigen, dass sich aktive Bakterien auf den Graphit-Fasern der Kathode angesiedelt haben. Wie in Abbildung 20 zu sehen, gibt es Zellen, die nur mit DAPI (blau) angefärbt werden konnten, jedoch nicht mit der Sonde für Bacteria (rot). Die Inkubation mit der Sonde für Archaea lieferte kein Ergebnis.

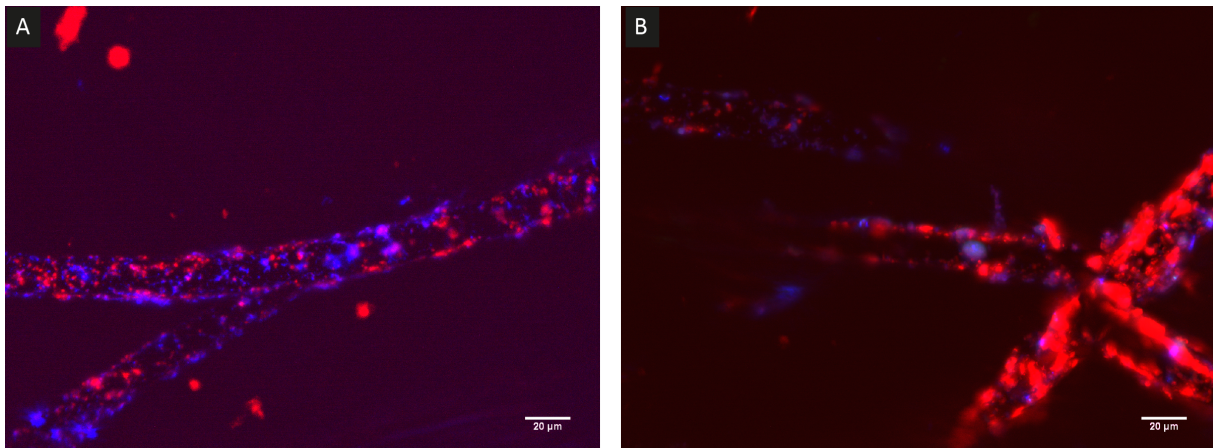


Abbildung 20: CARD-FISH Analyse der Kathode aus dem Reaktor ohne HEPES. Die Mikroorganismen wurden mit Sonden für Bacteria (EUB338-I, Alexa546, rot) und DAPI (blau) behandelt. Der Größenbalken entspricht in jedem Bild 20 µm.

REM

Abbildung 21 zeigt REM Aufnahmen der Kathode in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen. In Abbildung A sieht man mehrere bewachsene Graphit-Fasern. Die Abbildungen B und C zeigen Nahaufnahmen je eines bewachsenen Faserstranges.

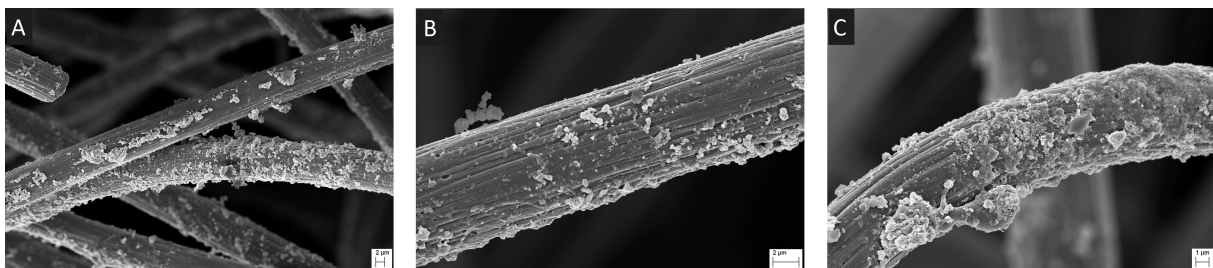


Abbildung 21: REM Aufnahmen der Kathode aus dem Reaktor ohne HEPES. A Mehrere bewachsene Faserstränge (Vergrößerung: 4000x). B + C Einzelner Faserstrang (Vergrößerung: 12000x).

16S rRNA Diversitäts-Analyse

Nachdem über mikroskopische Analysen bestätigt werden konnte, dass sich auf der Kathode ein Biofilm aus aktiven Mikroorganismen angesiedelt hatte, sollten diese weiter charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde die gesamte DNA der Zellen isoliert, eine 16S-Analyse durchgeführt und ausgewertet, wie es bereits für die initiale Anreicherung beschrieben wurde. Bei der Analyse des Elektrosynthese-Reaktors ohne HEPES wurde lediglich die Gemeinschaft der Mikroorganismen auf der Kathode untersucht. Da es sich bei diesem Elektrosynthese-Reaktor um eine Überführung der initialen Anreicherung handelte, war das Inokulum dasselbe wie für die anfangs beschriebene Anreicherung. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Diversitäts-Analyse graphisch dargestellt, die Tabellen 28 und 29 zeigen eine genaue Auflistung der detektierten Mikroorganismen auf Familienebene in Prozent. Für Bacteria wurden 4967 *reads* und für Archaea 1044 *reads* sequenziert. Für die mit dem Primerpaar für Archaea amplifizierten Sequenzen wurden 66,9 % der OTUs der Familie *Sulfolobaceae* zugeteilt, 32,4 % der *reads* konnten taxonomisch nicht zugeordnet werden. Bei den OTUs für Bacteria waren die am häufigsten vertretenen Familien *Peptococcaceae* (26,6 %), *Flavobacteriaceae* (13,5 %), *Sulfobacillus* (5,3 %), *Cytophagaceae* (4,4 %) und *Halomonadaceae* (3,7 %). Auch hier konnten 34,3 % der OTUs taxonomisch nicht zugeteilt werden.

Tabelle 28: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea auf der Kathode in der Überführung in Medium ohne HEPES (zu Abbildung 22).

| Taxonomie | Kathode |
|-----------------------|----------------|
| <i>Sulfolobaceae</i> | 66.9 |
| <i>Picrophilaceae</i> | 0.7 |
| unassigned | 32.4 |

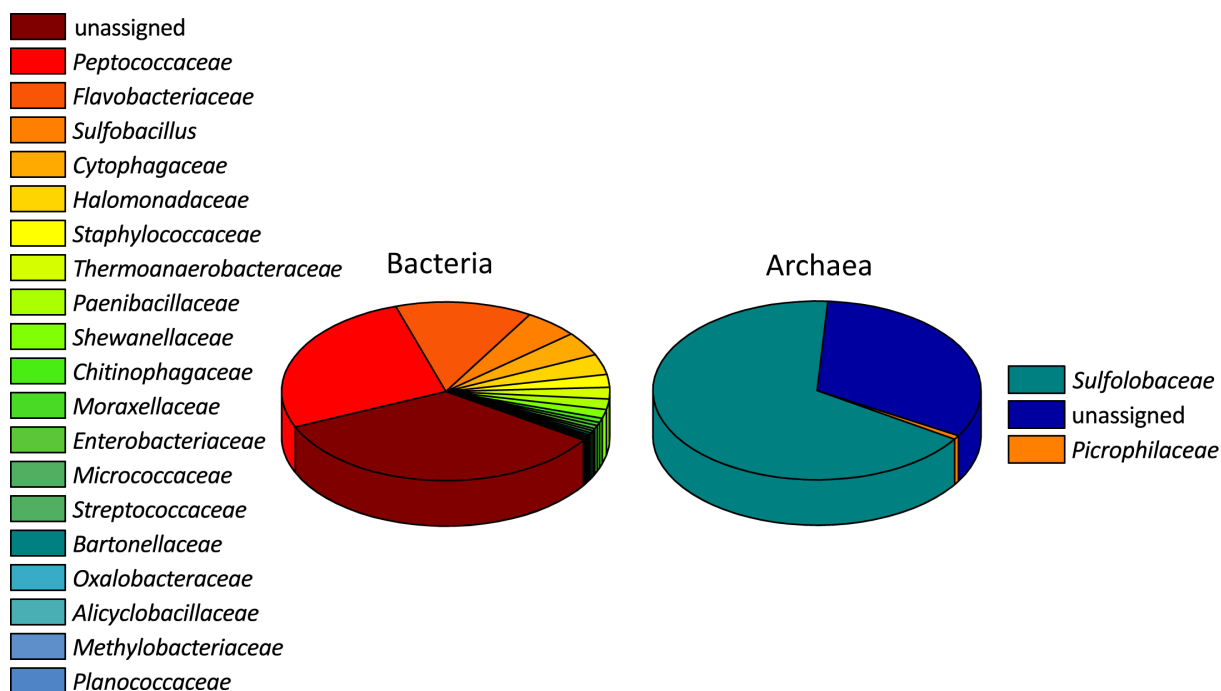


Abbildung 22: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität in dem Elektrosynthese-Reaktor mit Medium ohne HEPES.

Tabelle 29: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria auf der Kathode in der Überführung in Medium ohne HEPES (zu Abbildung 22).

| Taxonomie | Kathode |
|--------------------------------|---------|
| <i>Peptococcaceae</i> | 26.6 |
| <i>Flavobacteriaceae</i> | 13.5 |
| <i>Sulfobacillus</i> | 5.3 |
| <i>Cytophagaceae</i> | 4.4 |
| <i>Halomonadaceae</i> | 3.7 |
| <i>Staphylococcaceae</i> | 2.3 |
| <i>Thermoanaerobacteraceae</i> | 2.1 |
| <i>Paenibacillaceae</i> | 1.9 |
| <i>Shewanellaceae</i> | 1.6 |
| <i>Chitinophagaceae</i> | 0.8 |
| <i>Moraxellaceae</i> | 0.6 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 0.6 |
| <i>Micrococcaceae</i> | 0.4 |
| <i>Streptococcaceae</i> | 0.4 |
| <i>Bartonellaceae</i> | 0.4 |
| <i>Oxalobacteraceae</i> | 0.3 |
| <i>Alicyclobacillaceae</i> | 0.3 |
| <i>Methylobacteriaceae</i> | 0.3 |
| <i>Planococcaceae</i> | 0.2 |
| unassigned | 34.3 |

5.2 Anreicherungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor

Nachdem es im ersten Teil dieser Arbeit erfolgreich gelungen war, ein thermophiles Konsortium in einem Elektrosynthese-Reaktor mit Elektronen von einer Kathode als einziger Energiequelle und CO₂ als einziger Kohlenstoffquelle anzureichern, war das nächste Ziel, einzelne Mikroorganismen aus der Gemeinschaft weiter anzureichern und zu isolieren. Für die erfolgreiche Isolierung eines Mikroorganismus sind allgemein viele unterschiedliche Parameter relevant, die in unterschiedlichen Ansätzen getestet werden müssen, da die Anzahl zur Verfügung stehender Potentiostaten die Anzahl paralleler Anreicherungen stark limitiert hätte. Daher wurden die Isolierungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor zunächst über klassische Ansätze in definierten Medien vorgenommen. So gelang es beispielsweise, *Kyrpidia* sp. im Rahmen einer Masterarbeit erfolgreich aus dem Konsortium zu isolieren. Es konnte für diesen Organismus weiter gezeigt werden, dass er zu elektroautotrophem Wachstum fähig ist (Reiner 2015).

In diesem Teil der Arbeit werden drei Anreicherungen besprochen, die alle auf demselben Grundmedium basieren, in denen jedoch drei unterschiedliche Elektronenakzeptoren zur Verfügung gestellt wurden (Methoden 4.2). Als Grundmedium für die Anreicherungen wurde ein modifiziertes *Sulfolobus*-Medium gewählt, da *Sulfolobus* den größten Anteil innerhalb der elektroautotrophen Gemeinschaft darstellt. Allen Ansätzen wurde 0,1 % Hefeextrakt zugegeben, um Limitationen durch unbekannte Komponenten möglichst ausschließen zu können. Als Elektronendonator diente in allen Ansätzen Wasserstoff, da alle bereits beschriebenen elektroautotrophen Organismen gemeinsam haben, dass sie Wasserstoff als Elektronendonator nutzen können. Da der pH-Wert in allen Ansätzen mit H₂SO₄ auf 4 eingestellt wurde, stellte Sulfat einen möglichen Elektronenakzeptor in allen Ansätzen dar. Einem Ansatz wurde zusätzlich 2 mM KNO₃ zugegeben und der dritte Ansatz bekam eine geringe Menge an Sauerstoff zugesetzt. Als Kohlenstoffquelle diente in jedem Ansatz CO₂, welches über eine Gasmischung mit Wasserstoff (H₂:CO₂,80:20) immer wieder nachgefüllt wurde. Alle Ansätze wurden bei 60 °C schüttelnd inkubiert, um eine optimale Verteilung des H₂:CO₂ Gemisches zu gewährleisten.

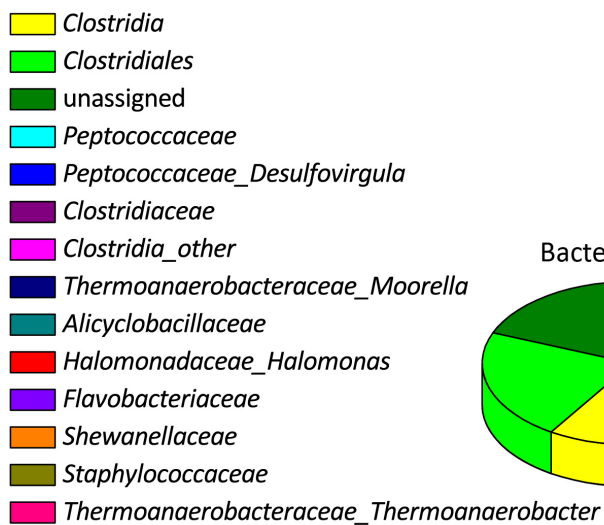
Alle Anreicherungen wurden mikroskopisch auf Wachstum untersucht und bei einer entsprechenden Zelldichte zu 1 % in frisches Medium überführt. Die hier besprochenen

Anreicherungen wurden dreimal überführt, bevor eine 16S Diversitäts-Analyse über eine 454-Sequenzierung durchgeführt wurde. An dieser Stelle ist noch anzumerken, dass die Anreicherung mit Sauerstoff stets die geringste Zelldichte aufwies.

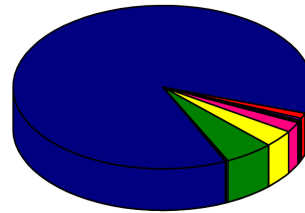
16S rRNA Diversitäts-Analyse

Aus der dritten Überführung aller drei Ansätze wurde zunächst die gesamte DNA isoliert. Hierfür wurde dasselbe Protokoll verwendet wie bereits für die Isolation der DNA aus den Graphitvlies-Kathoden. Anschließend wurde die 16S über eine PCR mit Primern für Archaea und Bacteria amplifiziert und diese, wie in den zuvor beschriebenen Anreicherungen in Elektrosynthese-Reaktoren, mittels 454-Sequenzierung analysiert. Bereits bei der Aufreinigung der PCR-Fragmente aus einem Agarosegel war zu erkennen, dass das Primerpaar für Archaea eine geringere Menge an Amplifikat ergab, verglichen mit der Bacteria Reaktion. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in der Anzahl erhaltener *reads* wieder. So wurden für Archaea lediglich 20 *reads* in der Nitrat-, 31 *reads* in der Sulfat- und 369 *reads* in der Sauerstoff-Anreicherung sequenziert. Für Bacteria konnten in der Nitrat-Anreicherung 10028 *reads*, in der Sulfat-Anreicherung 9876 *reads* und in der Sauerstoff-Anreicherung 4263 *reads* sequenziert werden. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der 16S Analyse mit QIIME graphisch dargestellt. Die Tabellen 30 und 31 zeigen die genaue taxonomische Zuordnung der OTUs in Prozent. Bereits auf den ersten Blick kann man erkennen, dass die Verwendung der drei unterschiedlichen Elektronenakzeptoren zu einer Anreicherung komplett unterschiedlicher Organismen geführt hat. Bei den wenigen *reads*, die für Archaea sequenziert wurden, konnten 93,5 % in der Sulfat- und 85 % in der Nitrat-Anreicherung nicht taxonomisch zugeordnet werden. Die verbleibenden 6,5 % für die Sulfat-Anreicherung wurden *Acidianus* zugeschrieben. In der Nitrat-Anreicherung waren es 10 % für *Acidianus* und 5 % für *Thermogymnomonas*. Die Anreicherung mit Sauerstoff zeigte die größte Vielfalt in den sequenzierten Archaea *reads*, hier konnten nur 10,7 % der *reads* nicht zugeordnet werden. Von den verbleibenden OTUs wurden 67,8 % zu *Acidianus* eingeordnet, die restlichen OTUs wurden den *Picrophilaceae* zugeteilt (genaue Angaben sind Tabelle 30 zu entnehmen).

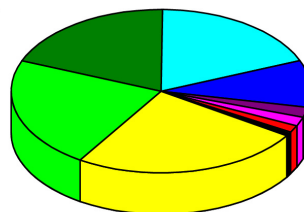
Bacteria



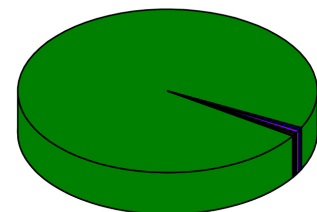
Bacteria Sauerstoff



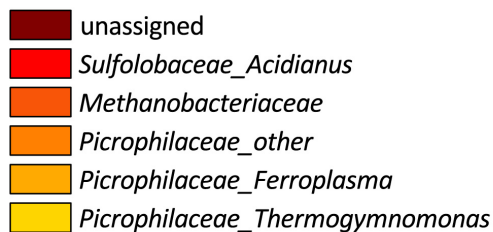
Bacteria Sulfat



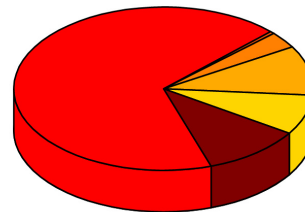
Bacteria Nitrat



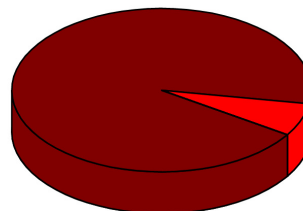
Archaea



Archaea Sauerstoff



Archaea Sulfat



Archaea Nitrat

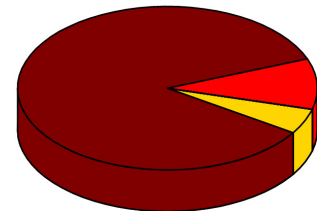


Abbildung 23: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität für Archaea und Bacteria von den drei Anreicherungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor. Angegeben ist jeweils der für die Anreicherung verwendete Elektronenakzeptor.

Tabelle 30: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Archaea in den jeweiligen Anreicherungen (zu Abbildung 23).

| Taxonomie | Archaea (SO ₄ ²⁻) | Archaea (O ₂) | Archaea (NO ₃ ⁻) |
|--|---|------------------------------|--|
| <i>Sulfolobaceae_Acidianus</i> | 6,5 % | 67,8 % | 10 % |
| <i>Methanobacteriaceae</i> | 0 % | 0,5 % | 0 % |
| <i>Picrophilaceae_other</i> | 0 % | 3,3 % | 0 % |
| <i>Picrophilaceae_Ferroplasma</i> | 0 % | 9,8 % | 0 % |
| <i>Picrophilaceae_Thermogymnomonas</i> | 0 % | 7,9 % | 5 % |
| unassigned | 93,5 % | 10,7 % | 85 % |

Auch bei der Diversität innerhalb der Bacteria sind große Unterschiede zwischen den einzelnen Anreicherungsansätzen festzustellen. Die geringste Diversität zeigte hier die Nitrat Anreicherung, auch wenn hier 98,2 % der *reads* nicht zuzuordnen waren. In der Anreicherung mit Sauerstoff konnten nur 5,3 % der *reads* nicht taxonomisch eingeordnet werden. 87 % der OTUs wurden hier zu *Moorella* gruppiert, nachfolgend waren Clostridia (3,4 %), *Thermoanaerobacter* (2 %) und *Halomonas* (1,1 %) vertreten. Am diversesten zeigte sich die Anreicherung mit Sulfat, hier waren 19,1 % der *reads* nicht zuzuordnen. Die restlichen OTUs waren alle unter den Clostridia angesiedelt. 24,9 % der OTUs konnten nur bis zur Klasse der Clostridia eingeteilt werden, 22 % zu *Clostridiales*, 18,7 % zur Familie *Peptococcaceae* und 9,3 % wurden *Desulfoviregula* zugeteilt. Eine Auflistung aller OTUs für Bacteria ist Tabelle 31 zu entnehmen.

Tabelle 31: Auflistung der prozentualen Verteilung der OTUs für Bacteria in den jeweiligen Anreicherungen (zu Abbildung 23).

| Taxonomie | Bacteria (SO₄²⁻) | Bacteria (O₂) | Bacteria (NO₃⁻) |
|---|---|-------------------------------------|--|
| <i>Clostridia</i> | 24,9 % | 3,4 % | 0,1 % |
| <i>Clostridiales</i> | 22 % | 0 % | 0 % |
| <i>Peptococcaceae</i> | 18,7 % | 0,2 % | 0 % |
| <i>Thermoanaerobacteraceae_Desulfoviregula</i> | 9,3 % | 0,1 % | 0 % |
| <i>Clostridiaceae</i> | 2 % | 0 % | 0 % |
| <i>Clostridia_other</i> | 1,8 % | 0 % | 0 % |
| <i>Thermoanaerobacteraceae_Moorella</i> | 1,4 % | 87 % | 0 % |
| <i>Alicyclobacillaceae</i> | 0,3 % | 0 % | 0 % |
| <i>Halomonadaceae_Halomonas</i> | 0,2 % | 1,1 % | 0,5 % |
| <i>Flavobacteriaceae</i> | 0,1 % | 0,4 % | 0,6 % |
| <i>Shewanellaceae</i> | 0,1 % | 0,3 % | 0,3 % |
| <i>Staphylococcaceae</i> | 0,1 % | 0,2 % | 0,3 % |
| <i>Thermoanaerobacteraceae_Thermoanaerobacter</i> | 0 % | 2 % | 0 % |
| unassigned | 19,1 % | 5,3 % | 98,2 % |

Bestimmung der α -Diversität (Shannon Index)

Der Shannon Index ist eine mathematische Größe zur Beschreibung der Biodiversität. In der dem Shannon Index zugrundeliegenden mathematischen Formel wird sowohl die Anzahl unterschiedlicher Individuen (z.B. die Anzahl unterschiedlicher Arten) als auch deren Abundanz berücksichtigt. Um die Anreicherungen weiter zu beschreiben, soll an dieser Stelle der Shannon Index für die drei Anreicherungen angegeben werden. Dieser wurde ebenfalls

mittels QIIME ermittelt. Als Grundlage zur Berechnung des Shannon Index dienen die zusammengeführten OTUs sowie deren taxonomische Zuordnung. Das Ergebnis dieser Analyse bestätigt eindeutig, dass die Anreicherung mit Nitrat als Elektronenakzeptor die geringste Diversität aufweist und demnach die größte Reinheit besitzt (auch wenn die meisten OTUs nicht taxonomisch eingeordnet werden konnten). Die genauen Zahlen für alle drei Anreicherungen können Tabelle 32 entnommen werden.

Tabelle 32: Shannon Indices der drei Anreicherungen.

| | Sulfat | Sauerstoff | Nitrat |
|-----------------|---------------|-------------------|---------------|
| Bacteria | 4,72 | 1,88 | 1,08 |
| Archaea | 1,85 | 2,23 | 1,85 |

Analyse stoffwechselphysiologischer Parameter

Um eine genauere Übersicht über die angereicherten Kulturen zu erlangen, wurden einige stoffwechselphysiologische Parameter der drei Anreicherungen bestimmt. Die verwendeten Methoden können im Methodenteil 4.4 nachgelesen werden. Alle drei Anreicherungen wurden über einen Zeitraum von 17 Tagen verfolgt und dabei immer wieder Proben genommen zur Bestimmung des pH-Wertes und der Sulfat-Konzentration. Von der Anreicherung, der Nitrat als Elektronenakzeptor zur Verfügung stand, wurde zusätzlich die Konzentration an Nitrat und Nitrit bestimmt. In Abbildung 24 ist die Änderung des pH-Wertes der drei Anreicherungen über die Zeit dargestellt. In allen Anreicherungen ist eine Zunahme des pH-Wertes zu verzeichnen, wobei die Anreicherung, welche außer CO₂ und Sulfat keinen weiteren Elektronenakzeptor enthält, den rasantesten Anstieg zeigt. Hier war der detektierte pH-Wert bereits nach einer Woche bei 7 und blieb dann konstant.

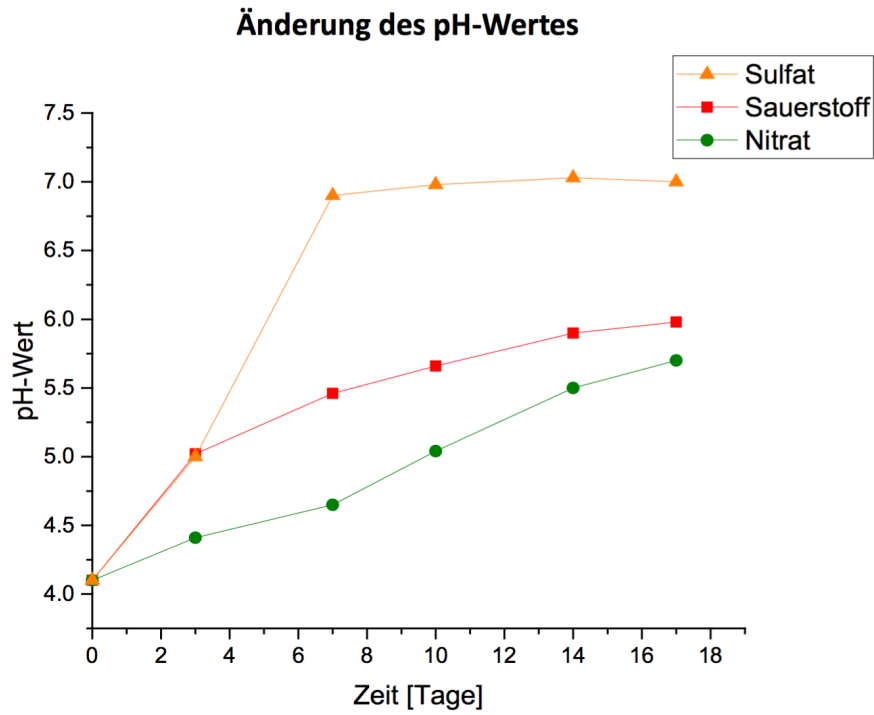


Abbildung 24: Änderung des pH-Wertes in den drei Anreicherungsansätzen.

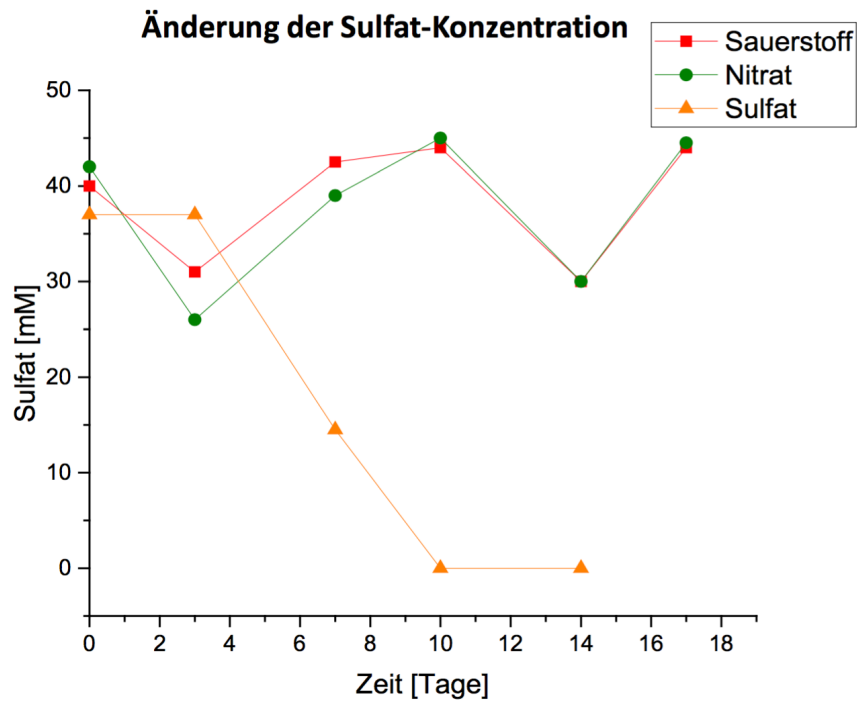


Abbildung 25: Änderung der Sulfat-Konzentration in den drei Anreicherungen.

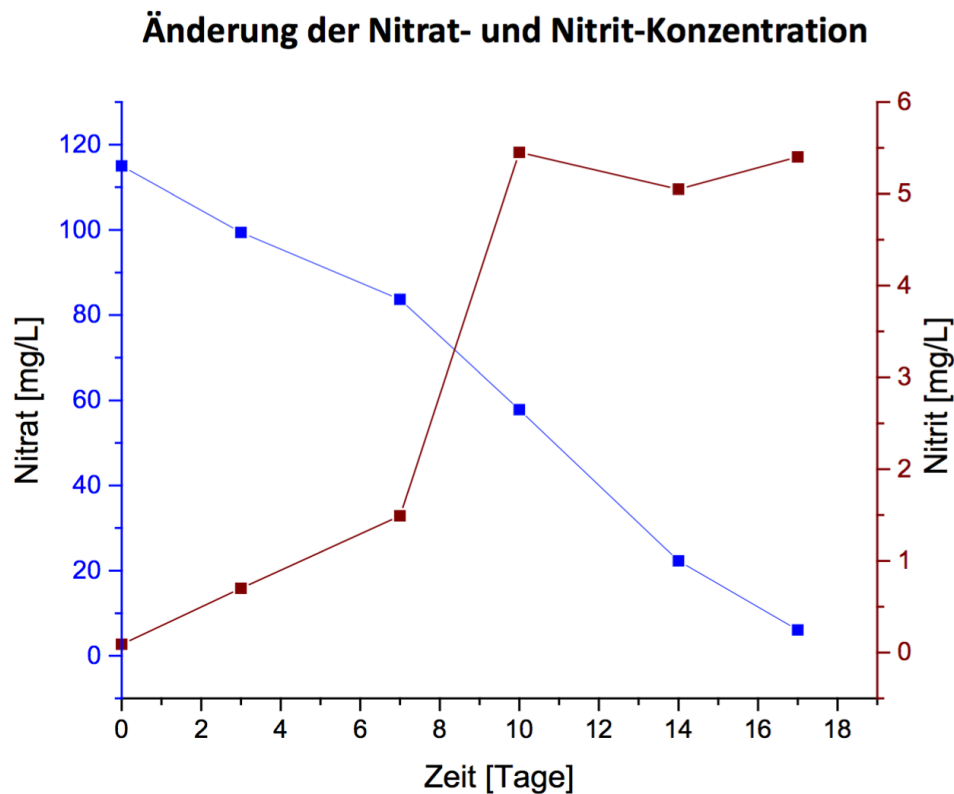


Abbildung 26: Änderung der Nitrat- und Nitrit-Konzentration in der Anreicherung mit Nitrat als Elektronenakzeptor. In blau sind die Werte für Nitrat, in braun die Werte für Nitrit dargestellt.

Eine Änderung der Sulfat-Konzentration konnte nur in der Anreicherung ohne weiteren Elektronenakzeptor detektiert werden (Abbildung 25). In den anderen beiden Anreicherungsansätzen schwankt die Konzentration an Sulfat zwar zwischen Werten von 25 und 44 mM, ist jedoch am Ende auf dem gleichen Level wie zu Beginn.

In Abbildung 26 ist die Änderung der Nitrat- und Nitrit-Konzentration in der Anreicherung mit 2 mM Nitrat als Elektronenakzeptor dargestellt. Es ist hier eine deutliche Abnahme der Konzentration an Nitrat zu verzeichnen. Nitrit wird zwar gebildet, jedoch scheint nicht alles Nitrat zu Nitrit reduziert zu werden. Eine Änderung der Konzentration an Ammonium konnte nicht bestimmt werden, da das Medium bereits Ammonium enthielt und dessen Bestimmung daher nicht durchführbar war.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse aus den drei Anreicherungskulturen zusammengefasst.

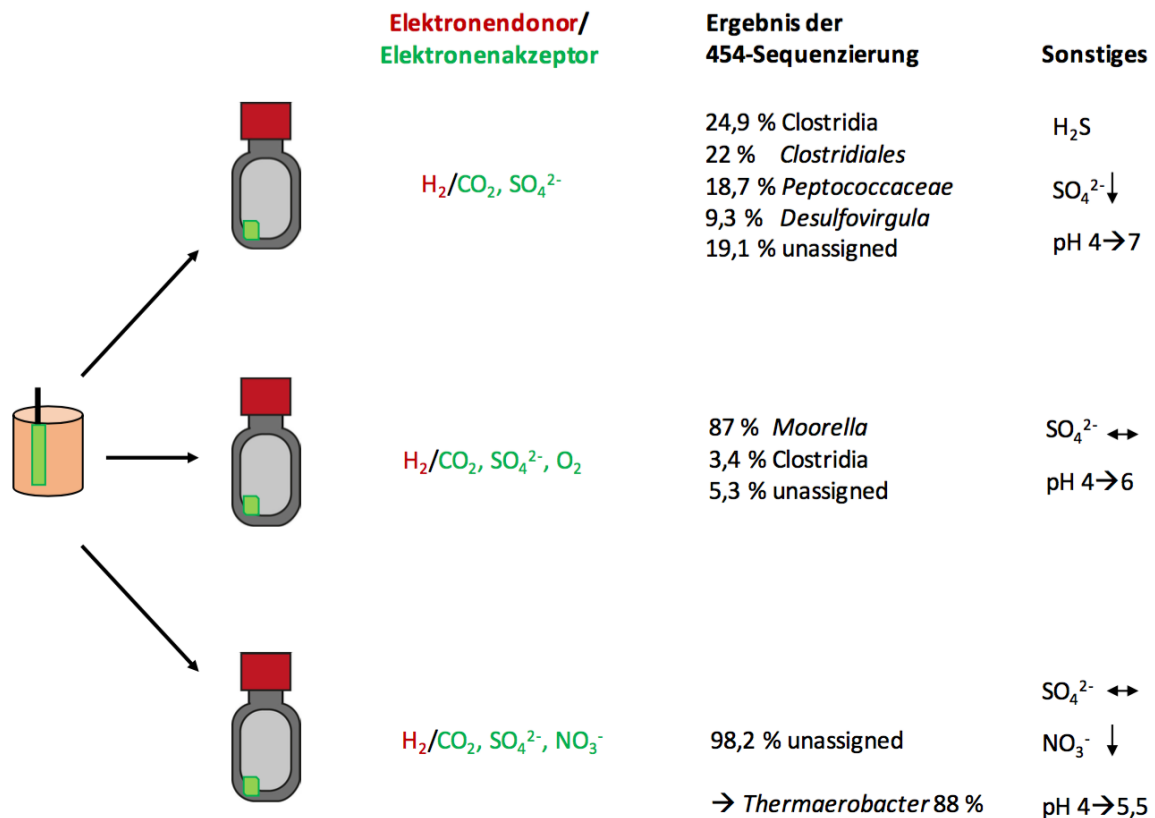


Abbildung 27: Schematische Darstellung der drei Anreicherungen aus dem Elektrosynthesereaktor. Angegeben sind der Elektronendonator sowie mögliche Elektronenakzeptoren. Außerdem die Hauptvertreter laut 16S-Diversitätsanalyse und einige physiologische Merkmale der Anreicherungen.

5.3 Anreicherung in $FeCO_3$ -Gradientenröhrchen

Neben der direkten Anreicherung im Elektrosynthese-Reaktor und der Isolationen aus selbigem, wurde im Verlauf dieser Arbeit zusätzlich eine weitere, klassische Anreicherungsstrategie verfolgt. Das Ziel hierbei war es, thermophile mikroaerophile eisenoxidierende Organismen zu finden, die bei neutralem pH-Wert leben. In der Theorie könnte solch ein Organismus dazu in der Lage sein, in einem Elektrosynthese-Aufbau Elektronen von einer Kathode zu beziehen. Die Anreicherung erfolgte in $FeCO_3$ -Gradientenröhrchen und ist in Kapitel 4.3 genauer beschrieben. Es handelt sich dabei um eine Methode von Emerson et al. 1997, bei der sich aerobe, eisenoxidierende Mikroorganismen in halbfestem Medium in den für sie optimalen Zonen bezüglich Fe^{2+} und Sauerstoffkonzentration ansiedeln. Als Inokulum für diese Anreicherungen diente zum einen eine Probe aus einer warmen Quelle im Taroko National Park (Taiwan) (Materialien 3.2.2)

und zum anderen Probe # 8 (Tabelle 4), die nahe des Geothermiekraftwerks *Central Geothérmica Pico Vermelho* auf den Azoren entnommen wurde. Aus diesen Proben konnten über mehrere Überführungen zwei Organismen bei 45 °C isoliert werden, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

5.3.1 Isolierung von *Crenotalea* sp.

Dieser Organismus stammt aus einem Ansatz, der mit der Probe #8 aus der Nähe des Geothermiekraftwerks *Central Geothérmica Pico Vermelho* auf den Azoren beimpft wurde. Über mehrere Überführungen in den FeCO₃-Gradientenröhrchen konnte schließlich ein Organismus isoliert werden, der im Weiteren auch in R2A Medium kultiviert werden konnte. Das isolierte Bakterium zeigte bei einem Sequenzalignment über 1423 bp eine 97,9%ige Übereinstimmung (*pairwise identity*, *geneious*) zur 16S rDNA von *Crenotalea thermophila* Stamm STH-1-Y1, einem Vertreter aus der Familie *Chitinophagaceae*. In Abbildung 29 ist ein phylogenetischer Stammbaum (Neighbour-Joining Methode, *geneious*) des Isolats mit den nächsten verwandten Organismen dargestellt. Weiterhin sind einige bekannte eisenoxidierende Organismen mit in dem Stammbaum enthalten.

Auf festem Medium bilden *Crenotalea* sp. gelbe Kolonien (siehe Abbildung 28 A), ein Wachstum auf LB-Medium konnte nicht festgestellt werden. Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop sind die Zellen von *Crenotalea* sp. als lange Stäbchen zu erkennen (Abbildung 28 B). Der Organismus wurde bei 45 °C kultiviert, bei 37 °C und bei 60 °C konnte kein Wachstum mehr beobachtet werden.

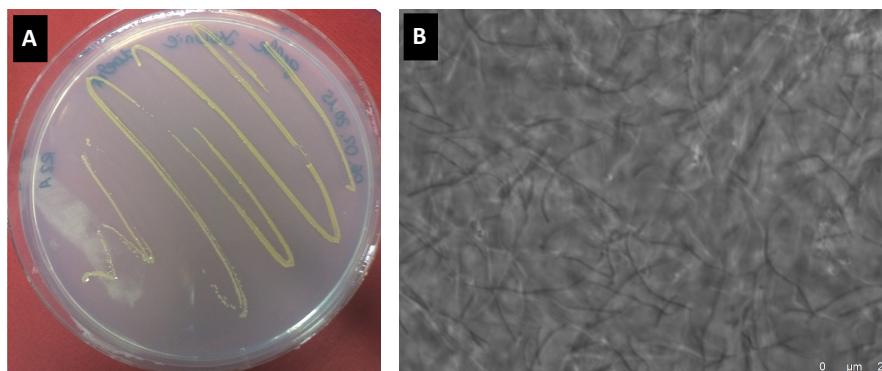


Abbildung 28: A Gelbe Kolonien von *Crenotalea* sp. auf R2A-Patte. B Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von *Crenotalea* sp..

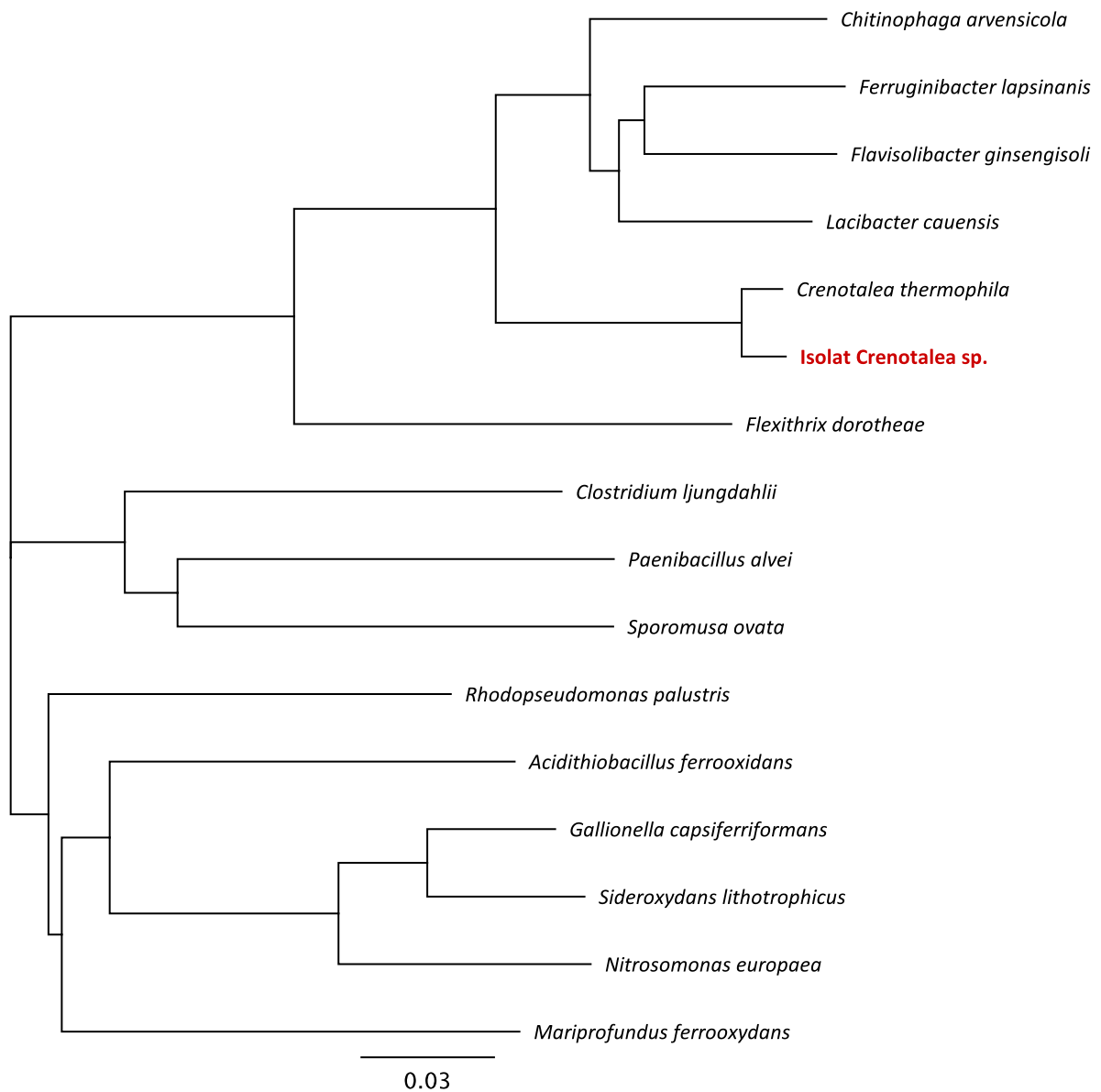


Abbildung 29: Phylogenetischer Stammbaum des Isolats *Crenotalea sp.* und nächstverwandter Spezies. Der Stammbaum wurde mithilfe der Neighbour-Joining Methode über das Programm geneious erstellt. Die Astlänge ist proportional der Anzahl an Basenaustauschen. Neben den nächsten verwandten wurden einige bekannte eisenoxidierende Mikroorganismen in den Stammbaum integriert.

5.3.2 Isolierung eines Bakteriums aus der Ordnung Rhizobiales

Der zweite Organismus, der während dieser Arbeit erfolgreich isoliert werden konnte, stammt aus einer Anreicherung, die initial mit Probenmaterial aus einer heißen Quelle im Taroko Nationalpark (Taiwan) inokuliert wurde. Wie bereits für das Isolat *Crenotalea* sp. beschrieben, wurde auch dieser Organismus über mehrere Überführungen aus den FeCO₃-Gradientenröhrchen isoliert und konnte anschließend in R2A-Medium kultiviert werden. Die nächsten Verwandten des Isolats sind, laut eines 16S rDNA-Datenabgleichs (*pairwise identity, geneious*) über 1400 bp, *Pseudolabrys taiwanensis* (94,6%), *Variibacter gotjawalensis* (93,9%) und *Rhodoplanes elegans* (93,7%). Das Isolat gehört demnach innerhalb der Alphaproteobacteria zur Ordnung der Rhizobiales und bildet hier wahrscheinlich die erste Art einer neuen Familie. In Abbildung 31 ist ein phylogenetischer Stammbaum des Isolats (Neighbour-Joining Methode, *geneious*) und der nächsten isolierten, verwandten Organismen dargestellt. Weiterhin sind einige bekannte eisenoxidierende Organismen mit in dem Stammbaum enthalten.

Das Bakterium wurde bei 45 °C isoliert, bei 37 °C sowie bei 60 °C konnte kein Wachstum beobachtet werden. Auf festem Medium bildet das Isolat farblose kleine Kolonien. Die Zellen des Rhizobiales Isolates sind unter dem Phasenkontrastmikroskop als lange, dünne Stäbchen zu erkennen (Abbildung 30 A und B). Weiterhin wurde die Bildung von Zellagglomerationen sowohl beim Wachstum auf festem Nährmedium wie in Flüssigkultur beobachtet.

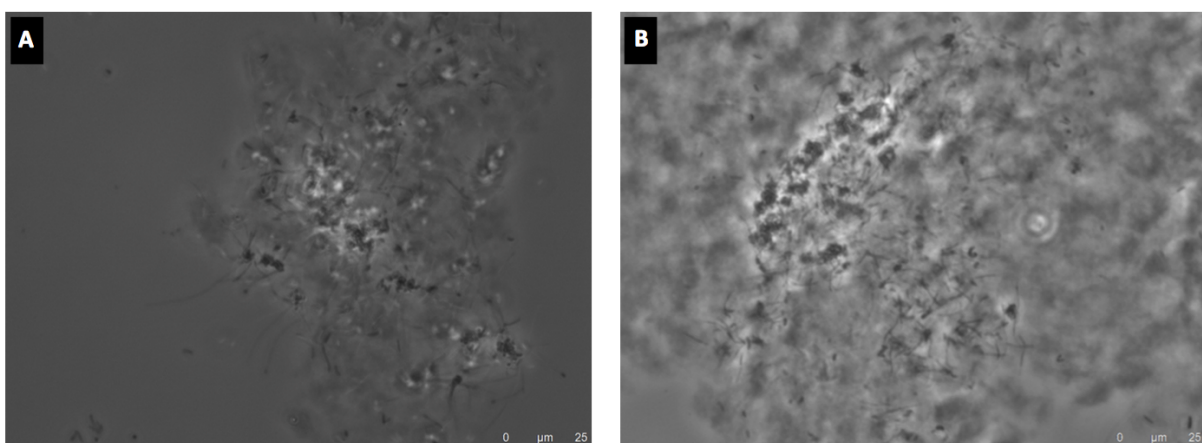


Abbildung 30: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des Rhizobiales Isolats. A und B: lange, dünne stäbchenförmige Zellen, teilweise an einem Zellpol zusammenhängend.

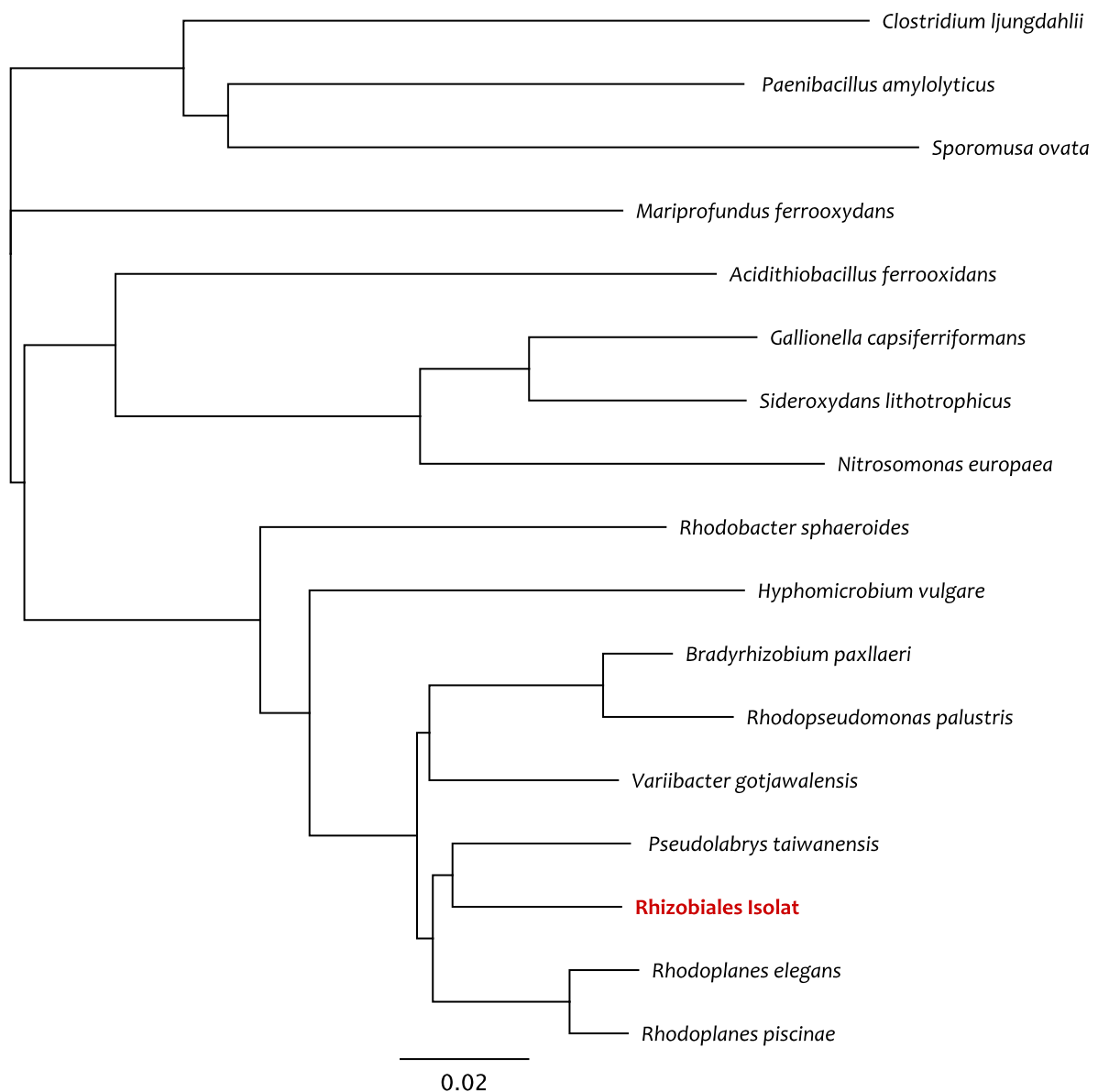


Abbildung 31: Phylogenetischer Stammbaum des Rhizobiales Isolats und der nächstverwandten Spezies. Der Stammbaum wurde mithilfe der Neighbour-Joining Methode über das Programm geneious erstellt. Die Astlänge ist proportional der Anzahl an Basenaustauschen. Neben den nächsten verwandten wurden einige bekannte eisenoxidierende Mikroorganismen in den Stammbaum integriert.

6 Diskussion

6.1 Thermophile Elektrosynthese

Das Ziel dieser Arbeit war es, thermophile, elektroautotrophe Mikroorganismen anzureichern, die Elektronen von einer Kathode nutzen können, um damit CO₂ zu fixieren. Nahezu alle bisher publizierten Studien zu mikrobieller Elektrosynthese wurden unter moderaten Bedingungen im neutralen pH-Bereich und bei Temperaturen zwischen 25 und 37 °C durchgeführt (Nevin *et al.* 2011; Lohner *et al.* 2014; Marshall and May 2009; Dopson *et al.* 2015). Diese Arbeit beschreibt eine Langzeitstudie zu einem elektroautotrophen Konsortium, das unter kontinuierlicher CO₂-Zufuhr, bei 60 °C, einem pH-Wert von 3,5 und einem Potential von -350 mV vs. SHE angereichert wurde. Nach einer anfänglichen Anreicherungsphase von ca. 18 Monaten konnte die Gemeinschaft der auf der Kathode ansässigen Mikroorganismen über mehrere 16S rRNA-Diversitäts-Analysen sowie CARD-FISH-Aufnahmen taxonomisch eingeordnet werden. Darüber hinaus diente die Erstellung eines Metagenoms sowie eines Metatranskriptoms der Charakterisierung der stoffwechselphysiologischen Prozesse in den im Elektrosynthese-Reaktor angereicherten Mikroorganismen. Durch den Vergleich zweier Kathoden, von denen nur an eine ein konstantes Potential angelegt wurde, konnte über den Einbau von isotoopenreinem ¹³C-Bicarbonat eine stromabhängige CO₂-Fixierung nachgewiesen werden.

6.1.1 Initiale Anreicherung

Nur eine von ursprünglich vier angesetzten Elektrosynthese-Anreicherungen zeigte nach ca. vierwöchiger Inkubation eine Veränderung der Stromstärke. Den Unterschied machte demnach die Zugabe von Sediment zu diesem Ansatz. Die anderen drei Elektrosynthese-Reaktoren wurden ausschließlich mit 40 ml der Flüssigphase aus der Mischung der 24

Proben beimpft. Zu Beginn der Arbeit wurde für die Anreicherung ein Medium mit einem neutralen pH-Wert gewählt, weswegen 5 mM HEPES als Puffersystem zugegeben wurden. Da der anfänglich eingestellte pH-Wert schnell fiel und sich konstant bei 3,5 einpendelte, wurde dieser pH-Wert für alle weiteren Versuche beibehalten und mit H_2SO_4 auf selbigen eingestellt. Da es sich bei HEPES um eine organische Verbindung ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) handelt, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass einige Organismen dazu in der Lage sind, sich dieser Kohlenstoffquelle zu bedienen. Aufgrund der geringen Menge an HEPES von 5 mM konnte dieser nur anfänglich als Kohlenstoffquelle dienen. Im Verlauf des Experiments wurden Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung mit ungepuffertem ddH_2O aufgefüllt. Insgesamt standen den Mikroorganismen 0,96 g Kohlenstoff aus HEPES zur Verfügung.

Chronoamperometrie

Bei der initialen Anreicherung wurden Stromdichten von bis zu $0,75 \text{ A/m}^2$ erreicht. Ein Kontroll-Reaktor, der unter denselben Bedingungen lief, zeigte innerhalb von 60 Tagen nie eine größere Stromdichte als $0,063 \text{ A/m}^2$. Der Graph für die Stromstärke in der Elektrosynthese-Anreicherung zeigt immer wieder Sprünge von bis zu 0,3 mA. Diese sind größtenteils auf eine unregelmäßige Begasung mit N_2/CO_2 zurückzuführen, da der Volumenstrom manuell reguliert wurde und zudem Schwankungen durch Arbeiten an parallel betriebenen Reaktoren entstanden. Dass die Begasung einen direkten Einfluss auf die gemessene Stromstärke hat, konnte bereits in einer vorherigen Arbeit gezeigt werden (Reiner 2015). Trotz der verzeichneten Sprünge war dennoch eine konstante Abnahme der Stromstärke innerhalb jedes Zeitintervalls zu verzeichnen. Neben den angereicherten Mikroorganismen könnten auch abiotische Prozesse an der Kathode zu einer Veränderung der Stromstärke führen. Hier sei beispielsweise die abiotische Reduktion von Sauerstoff, zusammen mit Protonen, zu Wasser zu erwähnen (Renslow *et al.* 2011; Freguia *et al.* 2007). Sauerstoff, der in geringen Mengen durch die Hydrolyse von Wasser an der Anode entsteht, kann aus dem Anodenkompartiment, welches in dem hier verwendeten Aufbau nur durch eine poröse Glasfritte vom umgebenden Medium getrennt ist, zur Kathode diffundieren und dort der Graphitelektrode selbst als Elektronenakzeptor dienen. Da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser mit steigender Temperatur sinkt und der geringe pH-Wert die Löslichkeit weiter beeinträchtigt, kann der Einfluss von Sauerstoff als Elektronenakzeptor für die Kathode selbst als vernachlässigbar eingestuft werden. Der an der Anode entstandene

Sauerstoff steht auch den elektroautotrophen Mikroorganismen selbst als potentieller Elektronenakzeptor zur Verfügung, auf diesen Sachverhalt soll jedoch an einer späteren Stelle eingegangen werden. Die beobachteten Unterschiede in den Stromdichten für den beimpften Elektrosynthese-Ansatz und die sterile Kontrolle deuteten erstmals auf einen biologischen Einfluss hin, den es in folgenden Analysen zu bestätigen galt.

Mikroskopische Analysen

Die durchgeführte Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass die Veränderung der Stromstärke in der Aktivität von Mikroorganismen begründet liegt. Es konnte gezeigt werden, dass sich auf der Graphitkathode ein Biofilm mit Mikroorganismen aus dem Reich der Archaea wie auch der Bacteria angesiedelt hatte. Die Gegenfärbung mit DAPI zeigte keine weiteren Zellen, woraus zum einen auf die Aktivität der vorhandenen Mikroorganismen geschlossen werden kann und zum anderen, dass es möglich war, mit den verwendeten Sonden alle Organismen auf der Kathode zu detektieren. Bacteria machten eindeutig den Großteil der Gemeinschaft an Mikroorganismen aus, während das Signal für Archaea stets unterrepräsentiert war. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der erhobenen 16S-Diversitäts-Analyse und der taxonomischen Zuordnung der Proteine im Metagenom, hier waren den Archaea zugeordnete Sequenzen ebenso in der Unterzahl. Neben der CARD-FISH Analyse wurden auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der bewachsenen Kathoden aufgenommen. Diese zeigten einerseits Zellen unterschiedlicher Struktur, welche direkt auf der Graphitfaser anhaften, weiterhin waren Zellaggregate zwischen den Fasersträngen zu sehen. Obwohl es sich bei der Elektronenmikroskopie um eine vergleichsweise stark von Artefakten behaftete Methode handelt (die Probe muss erst fixiert und dehydriert werden, bevor sie schließlich im Hochvakuum analysiert werden kann), konnten diese Zellaggregate auch in den CARD-FISH Untersuchungen gesehen werden. Da die einzelnen Zellen eines Aggregates nicht alle mit der Kathode in Kontakt stehen, kann hier beispielsweise von einer Übertragung der Elektronen von Zelle zu Zelle ausgegangen werden. Es wäre andererseits auch denkbar, dass einige Zellen des Aggregates unabhängig von der Kathode leben. Voraussetzung zu diesen Annahmen ist, dass die beobachteten Aggregate kein Artefakt der Probenfixierung darstellen, bei der ein Teil des Biofilms von den Fasern abgetragen worden sein könnte.

16S rRNA Diversitäts-Analysen

Die Ergebnisse der 16S-Amplikon-Sequenzierung bestätigten, dass die elektroautotrophe Gemeinschaft aus Bacteria und Archaea besteht. Die Aussage der CARD-FISH Bilder spiegelte sich auch hier wieder. So konnten weniger *reads* für Archaea sequenziert werden und auch die Diversität innerhalb der Archaea war um einiges geringer als innerhalb der Bacteria. Insgesamt wurden für die initiale Anreicherung zwei 454-Sequenzierungen durchgeführt. In der ersten Sequenzierung wurde die mikrobielle Gemeinschaft der Zellen auf der Kathode mit dem ursprünglichen Inokulum verglichen. In einer zweiten Studie wurde untersucht, ob es einen Unterschied zwischen der Zusammensetzung der Mikroorganismen auf der Kathode und der in der planktonischen Phase des Elektrosynthese-Reaktors gibt. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass ein Unterschied in der organismischen Zusammensetzung des Inokulums vor der Anreicherung und nach der Inkubation unter elektroautotrophen Bedingungen besteht. Im zweiten Experiment stellte sich heraus, dass es ferner keinen gravierenden Unterschied in der Zusammensetzung der Zellen auf der Kathode und der Zusammensetzung der planktonischen Zellen gibt. Unter der Annahme einer elektroautotrophen Lebensweise der angereicherten Mikroorganismen deutet diese Beobachtung auf einen dynamischen Kreislauf hin, bei dem Zellen an der Kathode anhaften und sich wieder von ihr ablösen, um dadurch an Energie in Form von Elektronen zu kommen. Solch ein dynamischer Prozess würde dadurch begünstigt, dass die Flüssigphase durch die permanente Begasung mit N_2/CO_2 kontinuierlich durchmischt wird. Weiterhin wäre denkbar, dass einige Organismen aus der Gemeinschaft redox-aktive Substanzen sekretieren, über die wiederum Elektronen an planktonische Zellen übertragen werden können.

Die Sequenzierung der 16S rRNA Gene der Archaea ergab, dass unter den gegebenen Bedingungen eine deutliche Anreicherung von Organismen der Familie *Sulfolobaceae* (81,1 %) stattfand. Innerhalb dieser Familie findet man Vertreter, wie beispielsweise *Acidianus* oder *Metallosphaera*, die als autotrophe Eisenoxidierer beschrieben sind (Li, 2012; Kozubal, 2008). Die Anreicherung derartiger Organismen entspricht daher der Hypothese von elektroautotrophem Wachstum. Die Ergebnisse der 16S-Analyse für Bacteria zeigten, dass Organismen aus der Familie *Thermoanaerobacteraceae* am häufigsten vertreten sind (36,1 % der Sequenzen), gefolgt von *Nitrospiraceae*, *Thermaceae* und *Caldiseriaceae*. *Moorella thermoacetica*, ein Vertreter der *Thermoanaerobacteraceae*, wurde bereits als

elektroautotroph beschrieben. In einem Elektrosynthese Ansatz konnte gezeigt werden, dass *M. thermoacetica* Elektronen mit einem Potential von -400 mV vs. SHE nutzt und dass in diesem System hauptsächlich Acetat produziert wird (Nevin *et al.* 2011). *Caldanaerobacter subterraneus*, ein weiteres Mitglied der *Thermoanaerobacteraceae*, wurde in einer Anreicherung auf der Anode einer mikrobiellen Brennstoffzelle, die bei 80 °C betrieben wurde, gefunden (Fu *et al.* 2013). Organismen aus der Familie der *Nitrospiraceae* sind dazu in der Lage, CO₂ über den reduktiven Citratzyklus zu fixieren.

Die zweite Diversitätsstudie, bei der die Verteilung der Mikroorganismen auf der Kathode mit denen der planktonischen Phase verglichen wurde, zeigt eine Abweichung von der zuvor beschriebenen Analyse. Für die Sequenzierung der Archaea ergab sich das gleiche Bild wie bereits in der ersten Studie, hier stellte die Familie der *Sulfolobaceae* mehr als 93 % aller detektierten OTUs. Bei den Bacteria war ein deutlicher Unterschied zur ersten Studie vorhanden. Ein Großteil der ausgewerteten OTUs wurden hier der Familie *Oxalobacteraceae* (35 %) zugeschrieben, gefolgt von *Sulfobacillus*, *Caulobacteraceae* und *Halomonadaceae*. Innerhalb der Familie *Oxalobacteraceae* ist ein genetisch veränderter *Ralstonia eutropha* Stamm beschrieben, der mit Formiat, welches elektrochemisch an einer Kathode produziert wurde, in der Anwesenheit von Sauerstoff Biokraftstoff produzieren kann (Li *et al.* 2012). Die Produktion von Formiat an der Kathode konnte in dieser Studie unterdessen nur bei einem sehr geringen Potential von -1,4 mV vs. SHE beobachtet werden. Da in der vorliegenden Arbeit das Kathodenpotential konstant bei -350 mV vs. SHE gehalten wurde, scheidet Formiat als ein möglicher Elektronendonator in diesem System aus. *Sulfobacillus* Spezies sind sowohl bekannte eisenoxidierende wie auch autotrophe Organismen (Pina *et al.* 2010; Berg 2011; Dinarieva *et al.* 2010). Der Unterschied bezüglich der Verteilung an Mikroorganismen in der ersten und der zweiten Studie könnte beispielsweise von einer ungleichen Verteilung der Mikroorganismen auf der Kathodenoberfläche selbst herrühren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich die Gemeinschaft an Mikroorganismen über die Zeit hin verändert hat, da die beiden Sequenzierungen ca. 7 Monate auseinander lagen. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch die, der Sequenzierung vorangestellte, Amplifizierung der bakteriellen 16S durch verwendete Primer kann ausgeschlossen werden, da diese für die Erstellung der Amplikons in beiden Analysen dieselbe Spezifität hatten. Gegen die Hypothese einer Veränderung der Gemeinschaft an Mikroorganismen über die Zeit spricht allerdings die Taxonomie, die aus

den Proteinzuweisungen des Metagenoms erstellt wurde. Die taxonomische Verteilung der im Metagenom detektierten Proteine spiegelt die Taxonomie der ersten 16S-Diversitäts-Analyse ziemlich genau wieder. Zeitlich gesehen gehören jedoch die Proben für das Metagenom, das Metatranskriptom und die zweite 16S-Amplikon-Sequenzierung zueinander. Am plausibelsten ist eine Kombination der Annahme einer ungleichen Verteilung der Organismen auf der Kathodenoberfläche selbst und eines unterschiedlich begünstigten Zellaufschlusses und, damit verbunden, einer ungleichen Verteilung der Organismen bei den durchgeführten Analysen. Es kann daher angenommen werden, dass sich durch die Gesamtheit der Analysen ein Bild ergibt, welches der Realität am ehesten entspricht.

Alles in allem lieferten die 16S-Diversitäts-Analysen zwar keinen Anhaltspunkt für eine Anreicherung obligat autotropher Organismen, jedoch sind viele unter ihnen als fakultativ autotrophe, mixotrophe Mikroorganismen beschrieben. Die Tatsache, dass nur innerhalb weniger der gefundenen Familien Organismen vertreten sind, die als elektroautotroph beschrieben wurden, ist nicht verwunderlich, da diese Arbeit eine der ersten beschriebenen Studien zu mikrobieller Elektrosynthese in einem sauren und thermophilen Milieu darstellt und Beschreibungen dahingehend erst zu erbringen sind.

Metagenom-Analyse

Die Analyse des Metagenoms bestätigte das Bild aus den 16S-Diversitätsstudien, dass Chemolithoautotrophie eine begünstigte Lebensweise des elektroautotroph angereicherten, mikrobiellen Konsortiums darstellt. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, korrelierte die Taxonomie aus der ersten 16S-Diversitätsstudie mit der taxonomischen Zuordnung der im Metagenom detektierten Proteinsequenzen. 18,6 % der Sequenzen aus dem Metagenom wurden archaeellen Proteinen zugeschrieben. Dass Bacteria in der elektroautotrophen Gemeinschaft überwiegen, konnte demnach auch mit dieser Analyse bestätigt werden. Insgesamt ist ein Vergleich der Taxonomie zwischen der Amplikon-Sequenzierung und dem Metagenom nur bedingt sinnvoll. Im ersten Fall wurden spezifische Bereiche der 16S analysiert, die Taxonomie des Metagenoms hingegen wurde über den Abgleich mit Proteindatenbanken erstellt. Obgleich der Metagenomdatensatz kaum ribosomale Information enthielt, konnte den Proteinen somit eine taxonomische Angabe zugeteilt

werden. Dass sich aus den beiden Analysen, die mithilfe gänzlich verschiedener Methoden der DNA-Isolierung, der Amplifizierung und auch der Sequenzierung durchgeführt wurden, dennoch ein stimmiges Bild ergab, unterstützt die erzielten Ergebnisse um so mehr.

Weder das Metagenom noch die Diversitäts-Analyse lieferten einen Hinweis auf die Aktivität von methanogenen Mikroorganismen innerhalb des Konsortiums. Dies war bei einem angelegten Potential von -350 mV vs. SHE zu erwarten, denn aus vorherigen Studien war ersichtlich, dass die Produktion von Wasserstoff an einer Kathode erst ab einem Potential von -600 mV vs. SHE eine Rolle spielt (Deutzmann *et al.* 2015; Yates *et al.* 2014).

Eine Zuordnung der assemblierten *contigs* gegen die nicht-redundante Datenbank von NCBI lieferte einen umfassenden Datensatz, der im Weiteren auch zum Abgleich der Transkriptom-Rohdaten genutzt wurde. Da das Transkriptom ein tieferes Verständnis über die tatsächlich ablaufenden Vorgänge innerhalb der Gemeinschaft an Mikroorganismen auf der Kathode gibt, soll an dieser Stelle nur ein kurzer Überblick über die prinzipiell im Metagenom enthaltene Information aufgeführt werden.

Antworten auf die zentralen Fragen dieser Arbeit lieferte eine spezifische Analyse des Metagenom Datensatzes über zwei individuell erstellte Datenbanken mit Schlüsselenzymen aus bekannten CO₂-Fixierungswegen und Proteinen aus bestätigten Eisenoxidations-Mechanismen, die wahrscheinlich beteiligt sind an der Elektronenaufnahme von einer Kathode. Bei dieser Analyse stellte sich heraus, dass das Metagenom die genetische Information für eine CO₂-Fixierung über den Wood-Ljungdahl-Weg, den 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Weg, den 3-Hydroxypropionat-Bicyclus, den reduktiven Citratzyklus sowie den Calvin-Zyklus enthält. Außerdem kodiert das Metagenom für Hydrogenasen und Formiat-Dehydrogenasen sowie für eine Vielzahl an Proteinen, die homolog sind zu Proteinen aus bekannten Eisenoxidations- und Eisenreduktionswegen. Bezüglich potentiell verwendeter Elektronenakzeptoren konnten die Gene für Carbonat-Atmung, Nitratammonifizierung sowie für die Reduktion von Sulfat und Sauerstoff identifiziert werden. Die notwendige genetische Grundausstattung für elektroautotrophes Wachstum ist demnach gegeben. Im Folgenden sollte die Analyse des Metatranskriptoms Aufschluss über die tatsächlich ablaufenden Prozesse innerhalb der Mikroorganismen der Elektrosynthese-Anreicherung geben.

Metatranskriptom

Bei der Untersuchung des Metatranskriptoms war das Augenmerk besonders auf das Vorhandensein von Schlüsselenzymen der CO₂-Fixierungswege sowie auf Proteine, die an der Aufnahme von Elektronen von der Kathode beteiligt sein könnten, gerichtet.

Es wurden Transkripte zu den Schlüsselenzymen von fünf CO₂-Fixierungswegen gefunden. Da insgesamt nur eine Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase vorhanden war, kann angenommen werden, dass die Fixierung von CO₂ über den Calvin-Zyklus eine untergeordnete Rolle bei der Primärproduktion durch das elektroautotrophe Konsortium spielt. Wie zu erwarten, variierte die absolute Anzahl an *reads*, die zu den einzelnen CO₂-Fixierungswegen gefunden wurden, stark. Durch die zahlreichen Schritte, die der Sequenzierung vorangeschaltet waren (RNA-Isolierung, Amplifizierung der RNA, Umschreiben in cDNA), sollte diesen Zahlenwerten nicht zu viel Bedeutung beigemessen werden. Weitere Ursachen, die das Ergebnis stark beeinflussten, stellten die bioinformatische Auswertung sowie die verwendeten Datenbanken dar. In einigen Fällen wurden identische *reads* einmal dem Wood-Ljungdahl-Weg und einmal dem 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Weg zugeordnet, je nachdem, welche Datenbank zum Abgleich herangezogen wurde. War dies der Fall, so wurden die *reads* doppelt, für beide Wege, gewertet. Dennoch soll das Ergebnis der Auswertung als relatives Maß für die quantitative Verteilung der einzelnen CO₂-Fixierungswege gelten, welches zumindest tendenziell die Realität abbildet. Für die quantitative Bewertung wurde von jedem CO₂-Fixierungsweg jeweils nur ein Schlüsselenzym zur Bewertung herangezogen. Unter dieser Annahme ist der Wood-Ljungdahl-Weg mit 111 (von insgesamt 190) *reads*, die der Acetyl-CoA-Synthase zugeordnet wurden, mengenmäßig am stärksten vertreten. Dass der WL-Weg eine Rolle in der Elektrosynthese-Anreicherung spielt, entsprach den Erwartungen, denn alle bisher beschriebenen elektroautotrophen Organismen fixieren CO₂ über diesen Weg (Nevin *et al.* 2011; Ragsdale and Pierce 2009). Innerhalb des Konsortiums ist die CO₂-Fixierung über den WL-Weg sowohl für *Thermoanaerobacteraceae* wie für *Peptococcaceae* denkbar (Ragsdale and Pierce 2009; Kim *et al.* 2012; Nevin *et al.* 2011; Marshall and May 2009). Am zweithäufigsten wurde die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (71 *reads*), ein Schlüsselenzym, das sowohl im 3-Hydroxypropionat/ 4-Hydroxybutyrat- wie auch im Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus involviert ist, detektiert. Da ferner 175 *reads* für die Acetyl-CoA-Carboxylase, welche nur im 3HP/4HB-Zyklus eine Rolle spielt, gefunden

wurden, ist die Aktivität dieses Weges doppelt gesichert. Eine besondere Stellung des 3HP/4HB-Zyklus in der elektroautotrophen Anreicherung macht Sinn, da dieser CO₂-Fixierungsweg einerseits Sauerstoff toleriert und durch die Sauerstoffentwicklung an der Anode keine strikt anaeroben Bedingungen zu erwarten sind. Außerdem kommt der 3HP/4HB-Zyklus hauptsächlich bei den Sulfolobales und Thaumarchaeota vor (Berg et al. 2007; Berg, Ramos-Vera, et al. 2010; Walker et al. 2010). Proteine, die diesen beiden Ordnungen zugeschrieben wurden, machten wiederum 9,2 % und 0,3 % der kodierenden Gene des Metagenoms aus. Auch in den 16S Diversitäts-Analysen gehörten mehr als 90 % der archaeellen OTUs zur Familie *Sulfolobaceae*. Über die taxonomische Zuordnung der RNA *reads* zeigt sich, dass sie meist auf einem *contig* liegen, welches *Sulfolobus* oder *Acidianus* zugeteilt wurde, und auch die Acetyl-CoA-Carboxylase stammt mit großer Wahrscheinlichkeit aus *Acidianus*. Der Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Weg hingegen ist nur bei strikten Anaerobiern und nur bei Thermoproteales und Desulfurococcales anzutreffen (Berg et al. 2010; Huber et al. 2008; Ramos-Vera 2009, Berg and Fuchs 2009). Diese Organismen treten bei der Diversitätsanalyse nicht in Erscheinung und ihr Anteil am Metagenom macht nur 0,1 % aus. Es ist daher wahrscheinlich, dass effektiv nur der 3HP/4HB-Zyklus vertreten ist und nicht der Dicarb/4HB-Zyklus. Der reduktive Citratzyklus war im Metatranskriptom mit 140 *reads* vertreten, 21 davon wurden der ATP-Citrat-Lyase als Schlüsselenzym zugeteilt. Der rTCA kommt sowohl in anaeroben wie auch in mikroaeroben Mikroorganismen vor. Transkripte des rTCA zu finden, ergab daher in diesem System Sinn. Keinem der *reads*, welche über den Abgleich mit der Datenbank für CO₂-Fixierungswege dem rTCA zugeteilt wurden, konnte eine taxonomische Information zugewiesen werden. Eine Aussage darüber, welche Organismen sich dieses Weges bedienen, konnte daher nicht getroffen werden.

Ein Abgleich der sequenzierten RNA *reads* gegen die Datenbank mit Proteinen aus bekannten eisenoxidierenden Mikroorganismen zeigte die Zuordnung einiger *reads* zu den Sequenzen von FoxA, B und C aus *S. metallicus*, sowie zu Sulfocyanin und Rusticyanin aus weiteren Archaea. Für Bacteria konnten *reads* passend zu Proteinen aus den Eisenoxidationswegen von *R. ferrooxidans*, *Rh. palustris*, *At. ferrooxidans*, *G. capsiferiformans* und *S. lithotrophicus* gefunden werden. Ferner wurden Transkripte mit Ähnlichkeit zu MtrA, B und C aus *S. oneidensis* sowie zu PccH, einem periplasmatischen Protein aus

G. sulfurreducens gefunden. Für diese beiden Modellorganismen für Anoden-Atmung konnte gezeigt werden, dass sie über die detektierten Proteine zur Aufnahme von Elektronen von einer Kathode fähig sind (Ross *et al.* 2011; Soussan *et al.* 2013). Außerdem konnten viele *reads* Sequenzen für *c*-Typ Cytochrome zugeordnet werden. Es scheint daher sehr offensichtlich, dass die elektroautotroph angereicherten Organismen Homologe zu diesen Proteinen für die Aufnahme der kathodischen Elektronen nutzen. Die Involvierung von Wasserstoff oder Formiat als Elektronendonator kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, da sowohl Transkripte für Hydrogenasen wie auch für Formiat-Dehydrogenasen im Metatranskriptom vorhanden waren.

Über das Metatranskriptom konnte bestätigt werden, dass durch die Gemeinschaft der Mikroorganismen auf der Kathode des Elektrosynthesereaktors CO₂ fixiert wird und die Organismen ferner Proteine exprimieren, welche die Aufnahme von Elektronen von der Kathode bewerkstelligen können. Dennoch besteht eine Diskrepanz zu dem erstellten Metagenom. Nicht zu allen erstellten und annotierten *contigs* des Metagenoms konnten auch Transkripte im Metatranskriptom gefunden werden. Gründe dafür könnten einerseits in den unterschiedlichen Isolierungs- und Amplifizierungstechniken begründet liegen. Andererseits wäre auch denkbar, dass einige Gene des Metagenoms in den Mikroorganismen nicht transkribiert werden oder dass im Metagenom erschienene Mikroorganismen in unserem Versuchsaufbau nur überdauern (beispielsweise als Sporen) und nicht aktiv sind. Die Isolierung solch überdauernder Organismen über einen Elektrosynthese-unabhängigen Ansatz ist dennoch angestrebt, denn eine Limitierung dieser Organismen beispielsweise durch zu geringe Konzentrationen an Sauerstoff wäre denkbar und könnte unter definierten Bedingungen in Reinkultur getestet werden.

¹³C-Inkorporation

Die elektroautotrophe Lebensweise der Elektrosynthese-Anreicherung konnte über die Inkorporation von ¹³C verifiziert werden. Bei dem Vergleich von zwei Kathodenstücken, von denen nur an einer ein konstantes Potential von -350 mV vs. SHE über den Potentiostaten angelegt wurde, konnte eine Zunahme des δ¹³C-Wertes nur für die konnektierte Kathode festgestellt werden. Hier stieg der δ¹³C-Wert von anfänglichen 61 ‰ (eine Woche nach Zugabe) auf 226 ‰ (nach sieben Wochen). Der δ¹³C-Wert für die Proben der Kathode ohne

Stromzufuhr änderte sich während der Versuchslaufzeit nur geringfügig und lag zu Beginn bei -28 ‰, am Ende bei -20,1‰. Beide Kathoden befanden sich in exakt demselben Reaktor und wurden bis auf das angelegte Potential gleichbehandelt. Dieses Experiment beweist daher eindeutig, dass die CO₂-Fixierung durch die Mikroorganismen im Biofilm auf der Kathode an eine Aufnahme von kathodischen Elektronen gekoppelt ist. Bei der Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff wird in biologischen Prozessen stets das leichtere ¹²C Isotop dem schwereren ¹³C vorgezogen, wodurch es zu einer Anreicherung von ¹²C markierter organischer Masse (und verminderter ¹³C markierter) und damit zu negativen δ¹³C-Werten kommt (Berg *et al.* 2010). Die δ¹³C-Werte der nicht-konnektierten Proben spiegeln demnach den natürlichen Isotopeneffekt wider. Ein Abgleich mit der Literatur legt die Vermutung nahe, dass in der Elektrosynthese-Anreicherung eine Mischung von mehreren CO₂-Fixierungswegen, mit einem Schwerpunkt auf Wood-Ljungdahl-Weg und reduktivem Citratzyklus, vorkommt und bestätigt damit die Aussage des Metatranskriptoms. In den Proben, die mit Elektronen von der Kathode versorgt wurden, kam es durch die hohe Konzentration an ¹³C zu positiven δ¹³C-Werten und einer Verschiebung des Isotopeneffekts.

6.1.2 Transplantations-Versuch

Durch das Aufbringen eines Stückes bewachsener Kathode auf eine sterile Kathode und das Zufügen von 1 L Flüssigphase aus dem Spender-Reaktor gelang es, das initial angereicherte Konsortium zu überführen. In diesem Elektrosynthese Aufbau wurden Stromdichten von bis zu 0,375 A/m² erzielt. In der Abbildung sind starke Schwankungen in der Stromstärke zu verzeichnen. Diese kamen durch Eingriffe in das System (in Abbildung 15 mit Pfeilen kenntlich gemacht) sowie durch die verschiedenen starke Begasung und die Verdunstung von Medium zustande. Zum Versuchsende zeigten sowohl der Spender- wie auch der Transplant-Reaktor ähnliche Stromstärken. Da die Kathode des Spender-Reaktors bereits für mehrere Analysen beschnitten wurde, war die Kathodenfläche um einiges kleiner als beim Transplant-Reaktor. Eine verbliebene Kathodenfläche von geschätzten 8 cm² würde eine Stromdichte von 0,625 A/m² im Spender-Reaktor bedeuten.

Die mikroskopischen CARD-FISH Analysen zeigten ein starkes Signal mit der Bacteria Sonde, ein Signal für Archaea konnte derweil nicht detektiert werden. Dass einige Zellen nur mit DAPI angefärbt wurden, könnte zweierlei bedeuten. Zum einen liegt die Vermutung nahe,

dass die verwendete Archaea Sonde in irgendeiner Weise beschädigt war. Es wäre andererseits jedoch auch möglich, dass die Archaea aus dem Spender-Reaktor nicht überführt werden konnten und es sich bei den mit DAPI angefärbten Zellen um nicht aktive Organismen handelt. Bei einer 16S PCR, auf isolierte DNA aus dem Transplant-Reaktor, wurde sowohl ein Signal mit Primern für Bacteria wie auch für Archaea detektiert. Eine umfassende Diversitäts-Analyse wurde indessen für den Transplant-Reaktor nicht durchgeführt. Es sind demnach Archaea auf der Kathode vorhanden, über deren Aktivität jedoch keine Aussage gemacht werden kann. Dennoch gelang es, den in der initialen Anreicherung verzeichneten Stromverlauf, durch eine zumindest teilweise Überführung der elektroautotrophen Mikroorganismen, zu reproduzieren.

6.1.3 Elektrosynthese-Versuch in Medium ohne HEPES

Die Zugabe von HEPES war seitens eines Puffersystems bei einem pH-Wert von 3,5 nicht mehr zweckmäßig, weswegen dessen Notwendigkeit in einem separaten Versuchsansatz untersucht wurde. Durch den Einsatz einer bereits bewachsenen Kathode aus der initialen Anreicherung und einem Liter Flüssigphase der Anreicherung (abzentrifugiert und in Medium ohne HEPES resuspendiert) sollte die Überführung möglichst aller Mikroorganismen gewährleistet werden.

Chronoamperometrie

Auch ohne die Zugabe von HEPES wurden durch die elektroautotrophen Mikroorganismen Stromdichten von bis zu $0,27 \text{ A/m}^2$ erreicht, der Leerwert des Mediums lag bei $0,09 \text{ A/m}^2$. Die Graphen in Abbildung 18 zeigen starke Schwankungen in der Stromstärke, welche durch im vorherigen Kapitel bereits beschriebene Umstände verursacht worden sein könnten. In der initialen Anreicherung wurden Stromdichten von $0,75 \text{ A/m}^2$ erreicht, und auch die maximale Stromdichte im Transplant-Reaktor von $0,375 \text{ A/m}^2$ lag über der für den Elektrosynthese-Ansatz ohne HEPES. Es kann daher angenommen werden, dass eine in Spuren vorhandene Komponente des HEPES (es gab kein erneutes Zufügen von HEPES, es sei denn ein Ansatz wurde auf zwei neue aufgeteilt) für manche Mikroorganismen der Gemeinschaft notwendig ist. Deren verminderte oder ausbleibende Aktivität wäre eine Erklärung für die geringeren Stromdichten, die in dem Ansatz ohne HEPES detektiert

wurden. Es könnten jedoch auch veränderte Leitfähigkeitseffekte gewesen sein, die zu den verzeichneten Unterschieden führten.

Mikroskopische Analyse

Die CARD-FISH Analyse zeigte eine Anhaftung von aktiven Bakterien an den Graphit-Fasern. Die Inkubation mit der Sonde für Archaea lieferte kein Ergebnis, es gab jedoch Zellen, die ausschließlich mit DAPI gefärbt wurden. Wie bereits in 6.1.2 beschrieben, ist es naheliegend, dass die Archaea-Sonde beschädigt war, beide Färbungen wurden zeitgleich durchgeführt. Für den Ansatz ohne HEPES wurde außerdem eine Diversitäts-Analyse durchgeführt, in der *reads* für Archaea sequenziert wurden. Auch hier kann keine Aussage über die Aktivität der Archaea gemacht werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen einen Biofilm auf den Graphitvlies-Fasern.

16S rRNA Diversitäts-Analyse

Die Sequenzierung der 16S ergab wie bei den vorherigen Sequenzierungen weniger *reads* für Archaea als für Bacteria. Berücksichtigt man, dass 32,4 % der OTUs aus dem Archaea-Datensatz nicht zugeordnet werden konnten, wurden alle restlichen OTUs der Familie *Sulfolobaceae* zugeteilt. Von archaeeller Seite spiegelt dies die Situation aus den Elektrosynthese-Ansätzen mit HEPES wieder. Bei den Bacteria konnten 34,3 % der OTUs taxonomisch nicht zugeordnet werden, 26,6 % der OTUs wurden der Familie *Peptococcaceae* zugeteilt, welche stark in der Taxonomie des Metagenoms vertreten ist. Vertreter der *Flavobacteriaceae* machten ferner 13,5 % der OTUs aus. Diese Familie war bis zu diesem Punkt noch in keinem Datensatz in Erscheinung getreten. Da in jedem Fall dieselben Primerpaare verwendet wurden, kann man davon ausgehen, dass sich eher die veränderten Versuchsbedingungen vorteilhaft auf die *Flavobacteriaceae* auswirkten, als dass von einer Kontamination ausgegangen werden kann. Gegen eine Kontamination während der Probenvorbereitung spricht auch, dass es in den im folgenden Kapitel besprochenen Anreicherungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor unter anderem auch zu einer geringfügigen Anreicherung von *Flavobacteriaceae* kam. Im Zusammenhang mit Elektrosynthese sind *Flavobacteriaceae* bisher noch nicht erwähnt, es gibt jedoch einige Publikationen zu mikrobiellen Brennstoffzellen mit Vertretern der *Flavobacteriaceae* (White *et al.* 2009; Mei *et al.* 2015). 5,3 % der OTUs gehören zu *Sulfobacillus*, einer Ordnung, die

auch im Biofilm auf der Kathode einen Großteil der elektroautotrophen Gemeinschaft ausmachte.

Dieser Versuchsaufbau zeigte, dass der Einsatz von HEPES zumindest nicht für alle Mikroorganismen des Konsortiums essentiell ist. Die geringeren Stromdichten für diesen Ansatz und die veränderte organismische Zusammensetzung könnten ein Anzeichen dafür sein, dass HEPES in der initial angereicherten elektroautotrophen Gemeinschaft eine gewisse Rolle spielt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der Unterschied in den Stromdichten, verglichen mit den Ansätzen mit HEPES, durch eine veränderte Leitfähigkeit zustande kam. Zukünftige Experimente mit Reinkulturen isolierter Organismen sollten diesbezüglich Klarheit bringen.

6.2 Anreicherung aus dem Elektrosynthese-Reaktor

Um die in den Elektrosynthese-Reaktoren angereicherten, potentiell elektroautotrophen Organismen weiter in Reinkultur zu bringen, wurden Teile der bewachsenen Kathoden in anaerobes Minimalmedium gegeben und die Gasphase gegen H_2/CO_2 ausgetauscht. H_2 stellte in allen Anreicherungen den Elektronendonator dar. In allen Ansätzen standen CO_2 und Sulfat als mögliche Elektronenakzeptoren zur Verfügung, ein Ansatz enthielt zusätzlich 2 mM Nitrat, ein Ansatz wurde mikroaerob inkubiert. In allen drei Ansätzen wurde nach kurzer Inkubationszeit Wachstum festgestellt. Trotz der angestrebten Selektion auf autotrophe Organismen wurde den Ansätzen 0,1 % Hefeextrakt zugegeben. Dieses sollte eine unbekannte, aber essentielle Komponente ersetzen und das Wachstum beschleunigen, es konnte dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch heterotrophe Organismen angereichert werden könnten. Prinzipiell schließen sich Heterotrophie und Elektroautotrophie jedoch nicht gegenseitig aus; vielmehr bringt ein mixotroph wachsender Organismus einige Vorteile mit sich. So werden unter heterotrophen Bedingungen allgemein höhere Zelldichten erreicht und auch die Wachstumsgeschwindigkeiten sind größer als unter autotrophen Bedingungen. Eine heterotroph vorinkubierte Bakterienkultur könnte damit schneller für elektroautotrophe Experimente zur Verfügung stehen. *Kyrpidia* sp. kann beispielsweise auf R2A-Medium vorgezogen werden und anschließend in Elektrosynthese-Reaktoren unter elektroautotrophen Bedingungen untersucht werden (Reiner 2015). Ein

weiterer Vorteil von Heterotrophie ist, dass sie eine Kultivierung auf festen Nährmedien begünstigt. Dies wiederum ist nützlich für die Selektion entsprechender Mutanten nach einer genetischen Manipulation. Wie zu erwarten, kam es durch die drei Ansätze zu einer Anreicherung vollkommen unterschiedlicher Mikroorganismen. Die 16S rRNA- Diversitäts-Analysen ergaben kaum *reads* für Archaea, weswegen an dieser Stelle nur auf die Bacteria eingegangen wird.

6.2.1 Anreicherung mit Sulfat als Elektronenakzeptor

Ein Anreicherungsansatz enthielt außer CO₂ und Sulfat, welches durch den mit H₂SO₄ auf 4 eingestellten pH-Wert in allen Ansätzen vorhanden war, keinen weiteren Elektronenakzeptor. Nach der dritten Überführung zeigte diese Anreicherung unter dem Mikroskop die größte Vielfalt. Diese Einschätzung konnte mit der Diversitäts-Analyse bestätigt werden. 19,1 % der Sequenzen konnten nicht taxonomisch eingeteilt werden, die verbliebenen OTUs wurden nahezu ausschließlich der Klasse Clostridia zugeschrieben, wobei 24,9 % der OTUs nicht weiter als bis auf Klassenebene bestimmt werden konnten. 22 % clusterten zu Clostridiales, 18,7 % zur Familie *Peptococcaceae* und 9,3 % der OTUs konnten innerhalb der *Thermoanaerobacteraceae* bis zur Gattung *Desulfoviregula* eingeteilt werden. Mit einem Wert von 4,72 zeigte sich die Diversität der Anreicherung auch bei Betrachtung des Shannon Index. Dennoch ist die Anreicherung vielversprechend, denn für Clostridien wurde die Elektrosynthese mit am häufigsten beschrieben (Choi *et al.* 2014; Jeon *et al.* 2012; Nevin *et al.* 2011), auch wenn bis dato nicht geklärt ist, wie es zu einer Elektronenübertragung an der Kathode kommt. *Clostridium ljungdahli* ist einer der wenigen genetisch zugänglichen Organismen, der im Zusammenhang mit Elektrosynthese untersucht wird (Ueki *et al.* 2014). Innerhalb der Familie *Peptococcaceae* ist für *Thermincola* sp. beschrieben, dass sie zum direkten Elektronentransfer auf eine Anode befähigt sind (Wrighton *et al.* 2011; Marshall and May 2009). Es ist daher auch denkbar, dass andere Vertreter der *Peptococcaceae* Elektronen von einer Kathode beziehen können. Die Gattung *Desulfoviregula* besteht derzeit nur aus einer Art, *Desulfoviregula thermocuniculi* (Kaksonen *et al.* 2007). *D. thermocuniculi* ist beschrieben als thermophiles Sulfat-reduzierendes Bakterium, welches H₂, in der Anwesenheit von CO₂ und Carbonsäuren, als Elektronenakzeptor nutzen kann (Kaksonen *et al.* 2007).

Bei einer Überwachung der Anreicherung über ca. zwei Wochen wurde die Veränderung des pH-Wertes und der Sulfat-Konzentration dokumentiert. Die Reduktion von 40 mM Sulfat erfolgte innerhalb von 10 Tagen, damit einher ging eindeutig die Entwicklung von H₂S. Zeitgleich stieg der pH-Wert in den ersten sieben Tagen von anfänglichen 4 auf ca. 7 und blieb konstant bei diesem Wert.

6.2.2 Anreicherung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor

Um ein mikroaerobes Klima zu erzeugen, wurde einem Ansatz zusätzlich zu dem Gasgemisch aus H₂/CO₂ noch etwas Umgebungsluft zugegeben. In diesem Ansatz standen demnach CO₂, Sulfat und Sauerstoff als Elektronenakzeptoren zur Verfügung. Insgesamt zeigte dieser Ansatz das langsamste Wachstum. Die 16S Diversitäts-Analyse zeigte, dass Bakterien der Gattung *Moorella*, mit 87 % aller OTUs, die Haupt-Vertreter dieser Anreicherung darstellten. Weitere 3,4 % wurden den Clostridia zugeschrieben und nur 5,3 % der OTUs konnten taxonomisch nicht eingeteilt werden. *Moorella thermoacetica* ist als elektroautotrophes Bakterium beschrieben, welches Elektronen eines Potentials von -400 mV vs. SHE nutzt, um CO₂ zu fixieren (Nevin *et al.* 2011). *M. thermoacetica* gilt außerdem als der Modellorganismus für CO₂-Fixierung über den Wood-Ljungdahl-Weg (Ragsdale and Pierce 2009). Der Wood-Ljungdahl-Weg ist stark Sauerstoff empfindlich und wurde bisher hauptsächlich für anaerobe Mikroorganismen beschrieben (Ragsdale and Pierce 2009; Berg 2011). Es ist daher verwunderlich, dass es ausgerechnet unter mikroaeroben Bedingungen zur Anreicherung von *Moorella* Spezies kam. Berücksichtigt man, dass in der Anreicherung ohne weiteren Elektronenakzeptor 1,4 % OTUs für *Moorella* detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die angereicherte *Moorella* sp. geringe Mengen Sauerstoff toleriert, wohingegen die Sulfat-reduzierenden Clostridien durch ihn offensichtlich inhibiert werden. Auch für andere Organismen, die den Wood-Ljungdahl-Weg nutzen, wird angenommen, dass sie Mechanismen entwickelt haben, um unter mikroaeroben Bedingungen bestehen zu können (Drake *et al.* 2008; Shima *et al.* 2001).

Während der zwei Wochen, in denen die Anreicherung überwacht wurde, stieg der pH langsam von 4 auf 6 an. In dieser Zeit änderte sich die Konzentration an Sulfat insgesamt nicht, es gab jedoch Schwankungen von ca. 10 mM zwischen den einzelnen Messpunkten. Da dieser Ansatz sehr langsam wächst, ist davon auszugehen, dass sich die Organismen bei

einem Beobachtungszeitraum von 2 Wochen noch in der lag-Phase befinden. Eine Überführung der mikroaeroben Anreicherung in anaerobes Medium könnte eventuell in einem beschleunigten Wachstum resultieren, da es eher unwahrscheinlich ist, dass *Moorella sp.* Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzen.

6.2.3 Anreicherung mit Nitrat als Elektronenakzeptor

In dem dritten Ansatz wurde den Mikroorganismen, neben CO₂ und Sulfat, 2 mM Nitrat als alternativer Elektronenakzeptor angeboten. Diese Anreicherung zeigte bereits nach der dritten Überführung unter dem Mikroskop ein relativ homogenes Bild, es waren hauptsächlich lange stäbchenförmige Zellen zu sehen. Bei der 16S rRNA Diversitäts-Analyse konnten 98 % der *reads* taxonomisch nicht zugeordnet werden, dennoch kann davon ausgegangen werden, dass diese Anreicherung keine große Diversität aufweist. Der mikroskopische Eindruck wurde durch den berechneten Shannon Index von 1,08 für diese Probe unterstützt. Die Berechnung des Shannon Index berücksichtigt auch die Anzahl an OTUs, welche vor der taxonomischen Zuordnung gebildet werden. Nichtsdestotrotz sollte die bioinformatische Auswertung dieser Anreicherung unter Vorbehalt gehandelt und eventuell wiederholt werden. Als weiterer Hinweis für die dominierende Anreicherung einer Spezies kann die Tatsache angesehen werden, dass es möglich war, nach einer DNA-Isolierung dieser Probe eine 16S PCR durchzuführen und nach der Sequenzierung ein eindeutiges Ergebnis zu bekommen. Laut BLAST Abgleich handelt es sich bei dem angereicherten Organismus um eine neue Gattung und Art, eventuell sogar um eine neue Familie. Der nächste verwandte Organismus ist *Thermaerobacter subterraneus* mit einer Sequenzübereinstimmung von 88 %.

Über die zwei Wochen, in denen die Anreicherung verfolgt wurde, stieg der pH-Wert nur leicht von 4 auf ca. 5,5 an. Die Sulfat-Konzentration änderte sich insgesamt nicht, sie unterlag jedoch denselben Schwankungen, die auch in der mikroaeroben Anreicherung beobachtet wurden. Die Konzentration an Nitrat nahm kontinuierlich ab, zum Versuchsende war nahezu alles aufgebraucht. Eine entsprechende Akkumulation von Nitrit konnte nicht gezeigt werden. Wahrscheinlich betreibt das angereicherte Isolat Denitrifikation zu N₂, dies muss allerdings in folgenden Studien überprüft werden.

Die Verwendung unterschiedlicher Elektronenakzeptoren führte in jedem Ansatz zu einer Anreicherung völlig verschiedener Spezies. Es konnte somit gezeigt werden, dass das initial angereicherte Konsortium aus aeroben wie auch aus anaeroben Sulfat-reduzierenden und anaeroben Nitrat-reduzierenden Organismen besteht. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass die angelegten Versuchsbedingungen zu einer Selektion bestimmter Organismen führten. Es war möglich, *Moorella* Spezies und *Desulfoviregula* anzureichern, die beide zur Familie *Thermoanaerobacteraceae* gehören, welche einen Großteil der bakteriellen Gemeinschaft der initialen Elektrosynthese-Anreicherung, laut 16S-Diversitäts-Analyse und Metagenom, darstellt. Auch die in der Sulfat-Anreicherung stark vertretenen *Peptococcaceae*, und Clostridia allgemein, werden durch das Metagenom abgebildet. Durch die Isolierung und Charakterisierung einzelner Organismen sind zukünftig neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der mikrobiellen Elektrosynthese bei erhöhten Temperaturen zu erwarten.

6.3 Anreicherung in FeCO₃-Gradientenröhrchen

6.3.1 Isolierung von *Crenotalea* sp.

Crenotalea sp. wurde über einen speziellen Ansatz zur Anreicherung von aeroben neutrophilen eisenoxidierenden Mikroorganismen in FeCO₃-Gradientenröhrchen bei 45 °C zunächst angereichert und konnte dann als gelbe Kolonie auf R2A-Platten isoliert werden. Als Inokulum diente ein Biofilm aus der Nähe eines Geothermiekraftwerks auf den Azoren. Mit einer Sequenzübereinstimmung von 97,9 % ist *Crenotalea thermophila* Stamm STH-1-Y1 (isoliert aus einer heißen Quelle in Japan) der nächste Verwandte des Isolats. *C. thermophila* ist als stäbchenförmiges, obligat aerobes und heterotrophes Bakterium beschrieben (Hanada *et al.* 2014). Unter den *Chitinophagaceae* ist *C. thermophila* an die höchsten Temperaturen angepasst, Wachstum konnte noch bei 60 °C beobachtet werden. Für das Isolat dieser Anreicherung konnte weder bei 37 °C noch bei 60 °C Wachstum festgestellt werden.

6.3.2 Isolierung eines Bakteriums aus der Ordnung Rhizobiales

Wie auch *Crenotalea* sp. wurde dieses Bakterium aus der Ordnung Rhizobiales über FeCO₃-Gradientenröhrchen bei 45 °C zunächst angereichert und konnte dann auf R2A-Platten unter mikroaeroben Bedingungen isoliert werden. Das Probenmaterial des Inokulums stammte

von einer heißen Quelle in Taiwan, die nächsten Verwandten des isolierten Organismus waren *Pseudolabrys taiwanensis* (94,6%), *Variibacter gotjawalensis* (93,9%) und *Rhodoplanes elegans* (93,7%). Das Isolat bildet eine neue Gattung und Art, eventuell auch eine neue Familie innerhalb der Ordnung Rhizobiales. Unter den Rhizobiales gibt es sowohl Metall-oxidierende autotrophe Organismen, wie auch solche, die bereits in elektroautotrophen Systemen beschrieben wurden (Anderson *et al.* 2009; Wang *et al.* 2015). Unter diesem Gesichtspunkt ist es angebracht, auch dieses Isolat auf elektroautotrophes Wachstum zu testen.

7 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es thermophile, elektroautotrophe Mikroorganismen anzureichern. Nachdem in der initialen Phase ein Abfall der Stromstärke erste Hinweise zu Elektrotrophie brachte, konnte zu einem späteren Zeitpunkt die Inkorporation von ^{13}C -markiertem Bicarbonat, und damit Autotrophie, ausschließlich in Zellen, welche über die Kathode mit Elektronen versorgt wurden, gezeigt werden. Damit war der Beweis erbracht, dass es unter den angelegten Versuchsbedingungen gelungen war, ein elektroautotrophes Konsortium anzureichern. Die elektroautotrophe Gemeinschaft wurde im Folgenden bezüglich ihrer taxonomischen Zusammensetzung untersucht. Ferner diente die Erstellung eines Metagenoms und eines Metatranskriptoms der Charakterisierung möglicherweise ablaufender Prozesse in der elektroautotrophen Gemeinschaft.

Zum heutigen Zeitpunkt sind kaum Daten im Zusammenhang mit extremen Bedingungen, wie beispielsweise erhöhter Temperatur und niedrigem pH, veröffentlicht worden. Diese Arbeit liefert daher interessante neue Einblicke in die physiologischen Vorgänge der mikrobiellen Elektrosynthese. Sie zeigt weiterhin, dass Elektrosynthese unter extremen Bedingungen möglich ist, und liefert zudem erfolgversprechende Anreicherungen thermophiler Organismen, die im Weiteren in der Anwendung getestet werden können. Dies kann beispielsweise als ein erster Schritt dazu angesehen werden, den CO_2 -Gehalt heißer Abgasströme zu verringern und in Plattformchemikalien zu fixieren.

7.1 Thermophile Elektrosynthese

Über das Metatranskriptom konnte gezeigt werden, dass die angereicherten elektroautotrophen Mikroorganismen zumindest den Wood-Ljungdahl-Weg, den reduktiven Citratzyklus und den 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Weg zur Fixierung von CO_2

nutzen. Alle bis dato in der Literatur beschriebenen elektroautotrophen Organismen fixieren CO_2 über den Wood-Ljungdahl-Weg. Sowohl der reduktive Citratzyklus wie auch der 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Weg sind sauerstofftolerant, wodurch sich ein entscheidender Vorteil gegenüber dem strikt anaeroben Wood-Ljungdahl-Weg ergibt. Durch die Verwendung von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor wird das thermodynamische Fenster für Synthesereaktionen deutlich erweitert. Somit würde eine Synthese von energieaufwändigeren Produkten ermöglicht, als sie heute mithilfe von acetogenen Mikroorganismen bei der mikrobiellen Elektrosynthese verzeichnet werden.

Im nächsten Schritt soll darauf abgezielt werden, einzelne Vertreter des Konsortiums in Reinkultur zu bringen, um sie im Folgenden bezüglich des verwendeten CO_2 -Fixierungs-Wegs und des Mechanismus zur Aufnahme der Elektronen von der Kathode detailliert zu beschreiben. Einen wichtigen Ansatz hierfür stellt die Kultivierung unter mikroaeroben Bedingungen dar, da die erhobenen Daten auf eine Sauerstofflimitierung des Systems hindeuten.

7.2 Anreicherungen aus dem Elektrosynthese-Reaktor

Aus den drei Anreicherungsansätzen soll im Weiteren versucht werden, über Verdünnungsreihen und Plattenausstriche einzelne Mikroorganismen zu isolieren. Durch die Variation einzelner Parameter wie beispielsweise der Temperatur, des pH-Wertes oder der Konzentration des Elektronenakzeptors in parallelen Ansätzen würde die Selektion verschiedener Mikroorganismen begünstigt werden. Im Anschluss an die erfolgreiche Isolierung sollten die Mikroorganismen in einem Elektrosynthese-Ansatz auf elektroautotrophes Wachstum untersucht werden.

7.3 Anreicherungen in FeCO_3 -Gradientenröhrchen

Für die beiden Isolate soll zunächst ein optimales Medium gefunden werden, um im Anschluss spezifische Analysen, beispielsweise zu verwertbaren Kohlenstoffquellen, anstellen zu können. Da es ein angestrebtes Ziel war, einen aeroben eisenoxidierenden Mikroorganismus zu isolieren, sollten beide Isolate auf diese Fähigkeit hin untersucht

werden. Würde eine Oxidation von Eisen gezeigt, wäre es zielführend, die Isolate abschließend auf elektroautotrophes Wachstum zu untersuchen.

8 Referenzen

- Abrevaya, Ximena C., Natalia J. Sacco, Maria C. Bonetto, Astrid Hilding-Ohlsson, and Eduardo Cortón. 2015. Analytical Applications of Microbial Fuel Cells. Part II: Toxicity, Microbial Activity and Quantification, Single Analyte Detection and Other Uses. *Biosensors and Bioelectronics*. doi:10.1016/j.bios.2014.04.053.
- Anderson, C. R., Dick, G. J., Chu, M.-L., Cho, J.-C., Davis, R. E., Bräuer, S. L., & Tebo, B. M. 2009. *Aurantimonas Manganoxydans*, Sp. Nov. and *Aurantimonas Litoralis*, Sp. Nov.: Mn(II) Oxidizing Representatives of a Globally Distributed Clade of Alpha-Proteobacteria from the Order Rhizobiales. *Geomicrobiol J* 3 (1): 189–98. doi:http://doi.org/10.1080/01490450902724840.
- Anraku, Yasuhiro. 1988. Bacterial Electron Transport Chains. *Annual Review of Biochemistry* 57 (1): 101–32. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.000533.
- Aulenta, Federico, Alessandro Catervi, Mauro Majone, Stefania Panero, Priscilla Reale, and Simona Rossetti. 2007. Electron Transfer from a Solid-State Electrode Assisted by Methyl Viologen Sustains Efficient Microbial Reductive Dechlorination of TCE. *Environmental Science & Technology* 41 (7). American Chemical Society: 2554–59. doi:10.1021/es0624321.
- Batlle-Vilanova, Pau, Sebastià Puig, Rafael Gonzalez-Olmos, Maria Dolors Balaguer, and Jesús Colprim. 2015. Continuous Acetate Production through Microbial Electrosynthesis from CO₂ with Microbial Mixed Culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. doi:10.1002/jctb.4657.
- Beese-Vasbender, Pascal F., Jan Philipp Grote, Julia Garrelfs, Martin Stratmann, and Karl J J Mayrhofer. 2015. Selective Microbial Electrosynthesis of Methane by a Pure Culture of a Marine Lithoautotrophic Archaeon. *Bioelectrochemistry* 102: 50–55. doi:10.1016/j.bioelechem.2014.11.004.
- Beliaev, Alex S., Daad A. Saffarini, Jennifer L. McLaughlin, and David Hunnicutt. 2001. MtrC, an Outer Membrane Decahem c Cytochrome Required for Metal Reduction in *Shewanella Putrefaciens* MR-1. *Molecular Microbiology* 39 (3): 722–30. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02257.x.
- Berg, Ivan A, Daniel Kockelkorn, Wolfgang Buckel, and Georg Fuchs. 2007. A 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation

- Pathway in Archaea. *Science* 318 (5857): 1782–86. <http://science.sciencemag.org/content/318/5857/1782.abstract>.
- Berg, Ivan A, Daniel Kockelkorn, W Hugo Ramos-Vera, Rafael F Say, Jan Zarzycki, Michael Hügler, Birgit E Alber, and Georg Fuchs. 2010. Autotrophic Carbon Fixation in Archaea. *Nature Reviews. Microbiology* 8 (6). Nature Publishing Group: 447–60. doi:10.1038/nrmicro2365.
- Berg, Ivan A. 2011. Ecological Aspects of the Distribution of Different Autotrophic CO₂ Fixation Pathways. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.02473-10.
- Berg, Ivan A., W. Hugo Ramos-Vera, Anna Petri, Harald Huber, and Georg Fuchs. 2010. Study of the Distribution of Autotrophic CO₂ Fixation Cycles in Crenarchaeota. *Microbiology* 156 (1): 256–69. doi:10.1099/mic.0.034298-0.
- Biegel, Eva, and Volker Müller. 2010. Bacterial Na⁺-Translocating ferredoxin:NAD⁺ Oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (42): 18138–42. doi:10.1073/pnas.1010318107.
- Bond, Daniel R, and Derek R Lovley. 2003. Electricity Production by *Geobacter Sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.69.3.1548.
- Bonnefoy, Violaine, and David S Holmes. 2012. Genomic Insights into Microbial Iron Oxidation and Iron Uptake Strategies in Extremely Acidic Environments. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02626.x.
- Bose, A, E J Gardel, C Vidoudez, E A Parra, and P R Girguis. 2014. Electron Uptake by Iron-Oxidizing Phototrophic Bacteria. *Nat Commun* 5: 3391. doi:10.1038/ncomms4391.
- Bott, T L, and T D Brock. 1969. Bacterial Growth Rates above 90 Degrees C in Yellowstone Hot Springs. *Science (New York, N.Y.)* 164 (3886). UNITED STATES: 1411–12.
- Bretschger, Orianna, Anna Obratzsova, Carter A. Sturm, Seop Chang In, Yuri A. Gorby, Samantha B. Reed, David E. Culley, et al. 2007. Current Production and Metal Oxide Reduction by *Shewanella Oneidensis* MR-1 Wild Type and Mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21): 7003–12. doi:10.1128/AEM.01087-07.
- Brock, T D. 1985. Life at High Temperatures. *Science (New York, N.Y.)* 230 (4722): 132–38. doi:10.1126/science.230.4722.132.
- Bücking, Clemens, Felix Popp, Sven Kerzenmacher, and Johannes Gescher. 2010. Involvement and Specificity of *Shewanella Oneidensis* Outer Membrane Cytochromes in the Reduction of Soluble and Solid-Phase Terminal Electron Acceptors. *FEMS Microbiology Letters* 306 (2): 144–51. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01949.x.
- Caporaso, J Gregory, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D Bushman, Elizabeth K Costello, Noah Fierer, et al. 2010. QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nature Methods* 7 (5): 335–36. doi:10.1038/nmeth.f.303.

- Caporaso, J. Gregory, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Todd Z. Desantis, Gary L. Andersen, and Rob Knight. 2010. PyNAST: A Flexible Tool for Aligning Sequences to a Template Alignment. *Bioinformatics* 26 (2): 266–67. doi:10.1093/bioinformatics/btp636.
- Carbajosa, Sofía, Moustafá Malki, Renaud Caillard, María F Lopez, F Javier Palomares, José A Martín-Gago, Nuria Rodríguez, Ricardo Amils, Victor M Fernández, and Antonio L De Lacey. 2010. Electrochemical Growth of *Acidithiobacillus Ferrooxidans* on a Graphite Electrode for Obtaining a Biocathode for Direct Electrocatalytic Reduction of Oxygen. *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2): 877–80. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.037.
- Cheng, Shaoan, and Bruce E Logan. 2007. Sustainable and Efficient Biohydrogen Production via Electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (47): 18871–73. doi:10.1073/pnas.0706379104.
- Cheng, Shaoan, Defeng Xing, Douglas F. Call, and Bruce E. Logan. 2009. Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. *Environmental Science and Technology* 43 (10): 3953–58. doi:10.1021/es803531g.
- Choi, Okkyoung, Taeyeon Kim, Han Min Woo, and Youngsoon Um. 2014. Electricity-Driven Metabolic Shift through Direct Electron Uptake by Electroactive Heterotroph *Clostridium Pasteurianum*. *Scientific Reports* 4: 6961. doi:10.1038/srep06961.
- Clarke, Thomas a, Tracey Holley, Robert S Hartshorne, Jim K Fredrickson, John M Zachara, Liang Shi, and David J Richardson. 2008. The Role of Multihaem Cytochromes in the Respiration of Nitrite in *Escherichia Coli* and Fe(III) in *Shewanella Oneidensis*. *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 5): 1005–10. doi:10.1042/BST0361005.
- Cruz, J. Virgílio, and Catarina S. Amaral. 2004. Major Ion Chemistry of Groundwater from Perched-Water Bodies of the Azores (Portugal) Volcanic Archipelago. *Applied Geochemistry* 19 (3): 445–59. doi:10.1016/S0883-2927(03)00135-5.
- Cruz, J. Virgílio, and Zilda Franca. 2006. Hydrogeochemistry of Thermal and Mineral Water Springs of the Azores Archipelago (Portugal). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 151 (4): 382–98. doi:10.1016/j.jvolgeores.2005.09.001.
- Degnan, Patrick H, and Howard Ochman. 2012. Illumina-Based Analysis of Microbial Community Diversity. *The ISME Journal* 6 (1). England: 183–94. doi:10.1038/ismej.2011.74.
- DeLong, E F. 1992. Archaea in Coastal Marine Environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12): 5685–89. doi:10.1073/pnas.89.12.5685.
- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7): 5069–72. doi:10.1128/AEM.03006-05.

- Deutzmann, Jörg S., Merve Sahin, and Alfred M. Spormann. 2015. Extracellular Enzymes Facilitate Electron Uptake in Biocorrosion and Bioelectrosynthesis. *mBio* 6 (2): 1–8. doi:10.1128/mBio.00496-15.
- Dick, Gregory J., Karthik Anantharaman, Brett J. Baker, Meng Li, Daniel C. Reed, and Cody S. Sheik. 2013. The Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vent Plumes: Ecological and Biogeographic Linkages to Seafloor and Water Column Habitats. *Frontiers in Microbiology* 4 (MAY): 1–16. doi:10.3389/fmicb.2013.00124.
- Dinariëva, Tatiana Y, Anna E Zhuravleva, Oksana A Pavlenko, Iraida A Tsaplina, and Alexander I Netrusov. 2010. Ferrous Iron Oxidation in Moderately Thermophilic Acidophile *Sulfobacillus Sibiricus* N1(T). *Canadian Journal of Microbiology* 56 (10). Canada: 803–8. doi:10.1139/w10-063.
- Dopson, Mark, and D Barrie Johnson. 2012. Biodiversity, Metabolism and Applications of Acidophilic Sulfur-Metabolizing Microorganisms. *Environmental Microbiology* 14 (10). England: 2620–31. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02749.x.
- Dopson, Mark, Gaofeng Ni, and Tom HJA Sleutels. 2015. Possibilities for Extremophilic Microorganisms in Microbial Electrochemical Systems. *FEMS Microbiology Reviews*, no. January: fuv044. doi:10.1093/femsre/fuv044.
- Dowd, Scot E, Todd R Callaway, Randall D Wolcott, Yan Sun, Trevor McKeegan, Robert G Hagevoort, and Thomas S Edrington. 2008. Evaluation of the Bacterial Diversity in the Feces of Cattle Using 16S rDNA Bacterial Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* 8. England: 125. doi:10.1186/1471-2180-8-125.
- Drake, H L, S L Daniel, K Küsel, C Matthies, C Kuhner, and S Braus-Stromeier. 1997. Acetogenic Bacteria: What Are the in Situ Consequences of Their Diverse Metabolic Versatilities? *BioFactors* 6 (1): 13–24. doi:10.1002/biof.5520060103.
- Drake, Harold L., Anita S. Gößner, and Steven L. Daniel. 2008. Old Acetogens, New Light. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125:100–128. doi:10.1196/annals.1419.016.
- Emerson, David, and Craig Moyer. 1997. Isolation and Characterization of Novel Iron-Oxidizing Bacteria That Grow at Circumneutral pH. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4784–92.
- Franks, Ashley. 2012. What's Current with Electric Microbes? *Journal of Bacteriology & Parasitology* 03 (09): 9–11. doi:10.4172/2155-9597.1000e116.
- Freguia, Stefano, Korneel Rabaey, Zhiguo Yuan, and Jörg Keller. 2007. Non-Catalyzed Cathodic Oxygen Reduction at Graphite Granules in Microbial Fuel Cells. *Electrochimica Acta* 53 (2): 598–603. doi:10.1016/j.electacta.2007.07.037.
- Freguia, Stefano, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano. 2010. Electron Transfer Pathways in Microbial Oxygen Biocathodes. *Electrochimica Acta* 55 (3): 813–18. doi:10.1016/j.electacta.2009.09.027.

- Friedman, Elliot, Kimberley Miller, David Lipson, and Largus Angenent. 2013. Potentiostatically Poised Electrodes Mimic Iron Oxide and Interact with Soil Microbial Communities to Alter the Biogeochemistry of Arctic Peat Soils. *Minerals* 3 (3): 318–36. doi:10.3390/min3030318.
- Fu, Qian, Hajime Kobayashi, Hideo Kawaguchi, Tatsuki Wakayama, Haruo Maeda, and Kozo Sato. 2013. A Thermophilic Gram-Negative Nitrate-Reducing Bacterium, *Calditerrivibrio Nitroreducens*, Exhibiting Electricity Generation Capability. *Environmental Science & Technology* 47 (21). United States: 12583–90. doi:10.1021/es402749f.
- Fu, Qian, Hajime Kobayashi, Yoshihiro Kuramochi, Jing Xu, Tatsuki Wakayama, Haruo Maeda, and Kozo Sato. 2013. Bioelectrochemical Analyses of a Thermophilic Biocathode Catalyzing Sustainable Hydrogen Production. In *International Journal of Hydrogen Energy*, 38:15638–45. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.04.116.
- Fuchs, Georg, and Hans G. Schlegel. 2014. *Allgemeine Mikrobiologie*. 9. Auflage. Thieme.
- Ganigué, R, S Puig, P Batlle-Vilanova, M Dolors Balaguer, and J Colprim. 2015. Microbial Electrosynthesis of Butyrate from Carbon Dioxide. *Chemical Communications* 51 (7000): 3235–38. doi:10.1039/C4CC10121A.
- Golitsch, Frederik, Clemens Bücking, and Johannes Gescher. 2013. Proof of Principle for an Engineered Microbial Biosensor Based on *Shewanella Oneidensis* Outer Membrane Protein Complexes. *Biosensors & Bioelectronics* 47: 285–91. doi:10.1016/j.bios.2013.03.010.
- Gong, Yanming, Ali Ebrahim, Adam M. Feist, Mallory Embree, Tian Zhang, Derek Lovley, and Karsten Zengler. 2013. Sulfide-Driven Microbial Electrosynthesis. *Environmental Science and Technology* 47 (1): 568–73. doi:10.1021/es303837j.
- Gralnick, Jeffrey A., and Dianne K. Newman. 2007. Extracellular Respiration. *Molecular Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05778.x.
- Green, Martin A., Keith Emery, Yoshihiro Hishikawa, Wilhelm Warta, and Ewan D. Dunlop. 2015. Solar Cell Efficiency Tables (Version 45). *Progress in Photovoltaics: Research and Applications* 23 (1): 1–9. doi:10.1002/pip.2573.
- Gregory, Kelvin B, Daniel R Bond, and Derek R Lovley. 2004. Graphite Electrodes as Electron Donors for Anaerobic Respiration. *Environmental Microbiology* 6 (6): 596–604. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x.
- Ha, Phuc Thi, Tae Kwon Lee, Bruce E Rittmann, Joonhong Park, and In Seop Chang. 2012. Treatment of Alcohol Distillery Wastewater Using a Bacteroidetes-Dominant Thermophilic Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology* 46 (5). United States: 3022–30. doi:10.1021/es203861v.
- Hallenbeck, Patrick C., Melanie Grogger, Donald Veverka, and Et.al. 2014. Recent Advances in Microbial Electrocatalysis. *Electrocatalysis*. doi:10.1007/s12678-014-0198-x.
- Hanada, Satoshi, Hideyuki Tamaki, Kazunori Nakamura, and Yoichi Kamagata. 2014.

- Crenotalea Thermophila* Gen. Nov., Sp. Nov., a Member of the Family *Chitinophagaceae* Isolated from a Hot Spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (PART 4): 1359–64. doi:10.1099/ij.s.0.058594-0.
- Harrington, Timothy D, Abdelrhman Mohamed, Vi N Tran, Saeid Biria, Mahmoud Gargouri, Jeong-Jin Park, David R Gang, and Haluk Beyenal. 2015. Neutral Red-Mediated Microbial Electrosynthesis by *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, and *Zymomonas Mobilis*. *Bioresource Technology* 195: 57–65. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.005.
- Hartshorne, Robert S, Catherine L Reardon, Daniel Ross, Jochen Nuester, Thomas a Clarke, Andrew J Gates, Paul C Mills, et al. 2009. Characterization of an Electron Conduit between Bacteria and the Extracellular Environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (52): 22169–74. doi:10.1073/pnas.0900086106.
- Hartshorne, Robert S., Brian N. Jepsen, Tom A. Clarke, Sarah J. Field, Jim Fredrickson, John Zachara, Liang Shi, Julea N. Butt, and David J. Richardson. 2007. Characterization of *Shewanella Oneidensis* MtrC: A Cell-Surface Decaheme Cytochrome Involved in Respiratory Electron Transport to Extracellular Electron Acceptors. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12 (7): 1083–94. doi:10.1007/s00775-007-0278-y.
- Hatch, Jennifer L, and Kevin T Finneran. 2008. Influence of Reduced Electron Shuttling Compounds on Biological H₂ Production in the Fermentative Pure Culture *Clostridium Beijerinckii*. *Current Microbiology* 56 (3): 268–73. doi:10.1007/s00284-007-9073-9.
- Hernandez, Maria E. 2001. Extracellular Electron Transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 58 (11): 1562–71. doi:10.1007/PL00000796.
- Huber, Harald, Martin Gallenberger, Ulrike Jahn, Eva Eylert, Ivan a Berg, Daniel Kockelkorn, Wolfgang Eisenreich, and Georg Fuchs. 2008. A dicarboxylate/4-Hydroxybutyrate Autotrophic Carbon Assimilation Cycle in the Hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus Hospitalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (22): 7851–56. doi:10.1073/pnas.0801043105.
- Hügler, Michael, and Stefan M Sievert. 2011. Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean. *Annual Review of Marine Science* 3 (1): 261–89. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142712.
- Ieropoulos, Ioannis a., Pablo Ledezma, Andrew Stinchcombe, George Papaharalabos, Chris Melhuish, and John Greenman. 2013. Waste to Real Energy: The First MFC Powered Mobile Phone. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* 15 (37): 15312–16. doi:10.1039/c3cp52889h.
- IPCC, and T. Zwickel & J. C. Minx (eds). Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, A. A. Seyboth, K., I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow. 2014. Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change O. USA: Cambridge University Press*, 1–32. doi:10.1016/j.renene.2009.11.012.

- IPCC, and V. Bex & P. M. Midgley (eds). T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia. 2013. Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. USA: Cambridge University Press*, 1–33. doi:10.1017/CBO9781107415324.
- Ishii, Takumi, Satoshi Kawaichi, Hirotaka Nakagawa, Kazuhito Hashimoto, and Ryuhei Nakamura. 2015. From Chemolithoautotrophs to Electrolithoautotrophs: CO₂ Fixation by Fe(II)-Oxidizing Bacteria Coupled with Direct Uptake of Electrons from Solid Electron Sources. *Frontiers in Microbiology* 6 (SEP): 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00994.
- Jeon, B Y, I L Jung, and D H Park. 2012. Conversion of Carbon Dioxide to Metabolites by *Clostridium Acetobutylicum* KCTC1037 Cultivated with Electrochemical Reducing Power. *Advances in Microbiology* 2 (September): 332–39. doi:10.4236/aim.2012.23040.
- Jiang, Yong, Min Su, Yao Zhang, Guoqiang Zhan, Yong Tao, and Daping Li. 2013. Bioelectrochemical Systems for Simultaneously Production of Methane and Acetate from Carbon Dioxide at Relatively High Rate. *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (8): 3497–3502. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.107.
- Jong, Bor Chyan, Byung Hong Kim, In Seop Chang, Pauline Woan Ying Liew, Yeng Fung Choo, and Gi Su Kang. 2006. Enrichment, Performance, and Microbial Diversity of a Thermophilic Mediatorless Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology* 40 (20). United States: 6449–54.
- Jourdin, Ludovic, Stefano Freguia, Bogdan C. Donose, and Jurg Keller. 2015. Autotrophic Hydrogen-Producing Biofilm Growth Sustained by a Cathode as the Sole Electron and Energy Source. *Bioelectrochemistry* 102: 56–63. doi:10.1016/j.bioelechem.2014.12.001.
- Kaksonen, Anna H., Stefan Spring, Peter Schumann, Reiner M. Kroppenstedt, and Jaakko A. Puhakka. 2007. *Desulfoviregula Thermocuniculi* Gen. Nov., Sp. Nov., a Thermophilic Sulfate-Reducer Isolated from a Geothermal Underground Mine in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (1): 98–102. doi:10.1099/ijs.0.64655-0.
- Kardi, Seyedeh Nazanin, Norahim Ibrahim, Noor Aini Abdul Rashid, and Ghasem Najafpour Darzi. 2016. Simultaneous Acid Red 27 Decolourisation and Bioelectricity Generation in a (H-Type) Microbial Fuel Cell Configuration Using NAR-2. *Environmental Science and Pollution Research International* 23 (4). Germany: 3358–64. doi:10.1007/s11356-015-5538-8.
- Kato, Souichiro. 2015. Biotechnological Aspects of Microbial Extracellular Electron Transfer. *Microbes and Environments / JSME* 30 (2): 133–39. doi:10.1264/jsme2.ME15028.
- Kim, Sang-Hoon, Christina Harzman, John K. Davis, Rachel Hutcheson, Joan B. Broderick, Terence L. Marsh, and James M. Tiedje. 2012. Genome Sequence of *Desulfotobacterium Hafniense* DCB-2, a Gram-Positive Anaerobe Capable of Dehalogenation and Metal Reduction. *BMC Microbiology* 12 (1): 21. doi:10.1186/1471-2180-12-21.

- Kobayashi, Hajime, Naoki Saito, Qian Fu, Hideo Kawaguchi, Javier Vilcaez, Tatsuki Wakayama, Haruo Maeda, and Kozo Sato. 2013. Bio-Electrochemical Property and Phylogenetic Diversity of Microbial Communities Associated with Bioelectrodes of an Electromethanogenic Reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 116 (1): 114–17. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.001.
- Kolmert, Åsa, Per Wikström, and Kevin B. Hallberg. 2000. A Fast and Simple Turbidimetric Method for the Determination of Sulfate in Sulfate-Reducing Bacterial Cultures. *Journal of Microbiological Methods* 41 (3): 179–84. doi:10.1016/S0167-7012(00)00154-8.
- Kracke, Frauke, Igor Vassilev, and Jens O. Krömer. 2015. Microbial Electron Transport and Energy Conservation - The Foundation for Optimizing Bioelectrochemical Systems. *Frontiers in Microbiology* 6 (JUN): 1–18. doi:10.3389/fmicb.2015.00575.
- Kvist, Thomas, Birgitte K Ahring, and Peter Westermann. 2007. Archaeal Diversity in Icelandic Hot Springs. *FEMS Microbiology Ecology* 59 (1). England: 71–80. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00209.x.
- LaBelle, Edward V., Christopher W. Marshall, Jack A. Gilbert, and Harold D. May. 2014. Influence of Acidic pH on Hydrogen and Acetate Production by an Electrosynthetic Microbiome. *PLoS ONE* 9 (10): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0109935.
- Lane, D J, A P Harrison, D Stahl, B Pace, S J Giovannoni, G J Olsen, and N R Pace. 1992. Evolutionary Relationships among Sulfur- and Iron-Oxidizing Eubacteria. *Journal of Bacteriology*.
- Lee, Tae Kwon, Tuan Van Doan, Kyuseon Yoo, Soojung Choi, Changwon Kim, and Joonhong Park. 2010. Discovery of Commonly Existing Anode Biofilm Microbes in Two Different Wastewater Treatment MFCs Using FLX Titanium Pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (6). Germany: 2335–43. doi:10.1007/s00253-010-2680-6.
- Lewin, Anna, Alexander Wentzel, and Svein Valla. 2013. Metagenomics of Microbial Life in Extreme Temperature Environments. *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/j.copbio.2012.10.012.
- Li, Han, Paul H Opgenorth, David G Wernick, Steve Rogers, Tung-Yun Wu, Wendy Higashide, Peter Malati, Yi-Xin Huo, Kwang Myung Cho, and James C Liao. 2012. Integrated Electromicrobial Conversion of CO₂ to Higher Alcohols. *Science (New York, N.Y.)* 335 (6076). United States: 1596. doi:10.1126/science.1217643.
- Logan, B. E., and K. Rabaey. 2012. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science* 337 (2012): 686–90. doi:10.1126/science.1217412.
- Logan, Bruce E., Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Schröder, Jörg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman, Willy Verstraete, and Korneel Rabaey. 2006. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environmental Science and Technology*. doi:10.1021/es0605016.

- Lohner, Svenja T, Jörg S Deutzmann, Bruce E Logan, John Leigh, and Alfred M Spormann. 2014. Hydrogenase-Independent Uptake and Metabolism of Electrons by the Archaeon *Methanococcus Maripaludis*. *The ISME Journal* 8 (8): 1673–81. doi:10.1038/ismej.2014.82.
- Lovley, D R. 2012. Electromicrobiology. *Annu Rev Microbiol* 66: 391–409. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150104.
- Lovley, Derek R, and Nikhil S Malvankar. 2015. Seeing Is Believing: Novel Imaging Techniques Help Clarify Microbial Nanowire Structure and Function. *Environmental Microbiology* 17 (7). England: 2209–15. doi:10.1111/1462-2920.12708.
- Lovley, Derek R., and Kelly P. Nevin. 2011. A Shift in the Current: New Applications and Concepts for Microbe-Electrode Electron Exchange. *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.009.
- Lovley, Derek R., and Kelly P. Nevin. 2013. Electrobiocommodities: Powering Microbial Production of Fuels and Commodity Chemicals from Carbon Dioxide with Electricity. *Current Opinion in Biotechnology* 24 (3): 385–90. doi:10.1016/j.copbio.2013.02.012.
- MacDonald, Maurice. 2003. *Photobiology of Higher Plants*. New York: NY: Wiley.
- Madigan, Michael T, John M Martinko, Paul V Dunlap, and David P Clark. 2009. *Brock Mikrobiologie (11. Auflage)*. Cell. Vol. 2. doi:10.1016/B978-1-4832-3136-5.50010-3.
- Maier, Tamara M, Judith M Myers, and Charles R Myers. 2003. Identification of the Gene Encoding the Sole Physiological Fumarate Reductase in *Shewanella Oneidensis* MR-1. *Journal of Basic Microbiology* 43 (4). Germany: 312–27. doi:10.1002/jobm.200390034.
- Malvankar, Nikhil S, Madeline Vargas, Kelly Nevin, Pier-Luc Tremblay, Kenneth Evans-Lutterodt, Dmytro Nykypanchuk, Eric Martz, Mark T Tuominen, and Derek R Lovley. n.d. Structural Basis for Metallic-Like Conductivity in Microbial Nanowires. doi:10.1128/mBio.00084-15.
- Marshall, Christopher W., and Harold D. May. 2009. Electrochemical Evidence of Direct Electrode Reduction by a Thermophilic Gram-Positive Bacterium, *Thermincola Ferriacetica*. *Energy & Environmental Science* 2 (6): 699. doi:10.1039/b823237g.
- Marshall, Christopher W., Daniel E. Ross, Erin B. Fichot, R. Sean Norman, and Harold D. May. 2012. Electrosynthesis of Commodity Chemicals by an Autotrophic Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (23): 8412–20. doi:10.1128/AEM.02401-12.
- Marshall, Christopher W., Daniel E. Ross, Erin B. Fichot, R. Sean Norman, and Harold D. May. 2013. Long-Term Operation of Microbial Electrosynthesis Systems Improves Acetate Production by Autotrophic Microbiomes. *Environmental Science and Technology* 47 (11): 6023–29. doi:10.1021/es400341b.
- Mathis, B. J., C. W. Marshall, C. E. Milliken, R. S. Makkar, S. E. Creager, and H. D. May. 2008. Electricity Generation by Thermophilic Microorganisms from Marine Sediment. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology* 78 (1): 147–55. doi:10.1007/s00253-007-1266-4.
- McAllister, Sean M, Richard E Davis, Joyce M McBeth, Bradley M Tebo, David Emerson, and Craig L Moyer. 2011. Biodiversity and Emerging Biogeography of the Neutrophilic Iron-Oxidizing Zetaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15). United States: 5445–57. doi:10.1128/AEM.00533-11.
- Mei, Xiaoxue, Changhong Guo, Bingfeng Liu, Yu Tang, and Defeng Xing. 2015. Shaping of Bacterial Community Structure in Microbial Fuel Cells by Different Inocula. *RSC Adv.* 5 (95). Royal Society of Chemistry: 78136–41. doi:10.1039/C5RA16382J.
- Mikkelsen, Mette, Mikkel Jorgensen, and Frederik C Krebs. 2010. The Teraton Challenge. A Review of Fixation and Transformation of Carbon Dioxide. *Energy Environ. Sci.* 3 (1). The Royal Society of Chemistry: 43–81. doi:10.1039/B912904A.
- Myers, C. R., and J. M. Myers. 2003. Cell Surface Exposure of the Outer Membrane Cytochromes of *Shewanella Oneidensis* MR-1. *Letters in Applied Microbiology* 37 (3): 254–58. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01389.x.
- Myers, Charles R., and Judith M. Myers. 1997. Outer Membrane Cytochromes of *Shewanella Putrefaciens* MR-1: Spectral Analysis, and Purification of the 83-KDa c-Type Cytochrome. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1326 (2): 307–18. doi:10.1016/S0005-2736(97)00034-5.
- Myers, Judith M., and Charles R. Myers. 2000. Role of the Tetraheme Cytochrome CymA in Anaerobic Electron Transport in Cells of *Shewanella Putrefaciens* MR-1 with Normal Levels of Menaquinone. *Journal of Bacteriology* 182 (1): 67–75. doi:10.1128/JB.182.1.67-75.2000.
- Nevin, Kelly P., Sarah A. Hensley, Ashley E. Franks, Zarath M. Summers, Jianhong Ou, Trevor L. Woodard, Oona L. Snoeyenbos-West, and Derek R. Lovley. 2011. Electrosynthesis of Organic Compounds from Carbon Dioxide Is Catalyzed by a Diversity of Acetogenic Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (9): 2882–86. doi:10.1128/AEM.02642-10.
- Nevin, Kelly P., Trevor L. Woodard, Ashley E. Franks, Zarath M. Summers, and Derek R. Lovley. 2010. Microbial Electrosynthesis: Feeding Microbes Electricity to Convert Carbon Dioxide and Water to Multicarbon Extracellular Organic Compounds. *mBio* 1 (2). doi:10.1128/mBio.00103-10.
- Nie, Huarong, Tian Zhang, Mengmeng Cui, Haiyun Lu, Derek R Lovley, and Thomas P Russell. 2013. Improved Cathode for High Efficient Microbial-Catalyzed Reduction in Microbial Electrosynthesis Cells. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 15: 14290–94. doi:10.1039/c3cp52697f.
- Ogata, H, S Goto, K Sato, W Fujibuchi, H Bono, and M Kanehisa. 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 27 (1). ENGLAND: 29–34.
- Parameswaran, Prathap, Tyson Bry, Sudeep C Papat, Bradley G Lusk, Bruce E Rittmann, and

- Cesar I Torres. 2013. Kinetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization of the Thermophilic, Anode-Respiring Bacterium *Thermincola Ferriacetica*. *Environmental Science & Technology* 47 (9). United States: 4934–40. doi:10.1021/es400321c.
- Park, D. H., and J. G. Zeikus. 1999. Utilization of Electrically Reduced Neutral Red by *Actinobacillus Succinogenes*: Physiological Function of Neutral Red in Membrane-Driven Fumarate Reduction and Energy Conservation. *Journal of Bacteriology* 181 (8): 2403–10.
- Patil, Sunil A., Sylvia Gildemyn, Deepak Pant, Karsten Zengler, Bruce E. Logan, and Korneel Rabaey. 2015. A Logical Data Representation Framework for Electricity-Driven Bioproduction Processes. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.002.
- Peng, Yu, Henry C M Leung, S. M. Yiu, and Francis Y L Chin. 2012. IDBA-UD: A de Novo Assembler for Single-Cell and Metagenomic Sequencing Data with Highly Uneven Depth. *Bioinformatics* 28 (11): 1420–28. doi:10.1093/bioinformatics/bts174.
- Pernthaler, a, and J Pernthaler. 2004. Sensitive Multi-Color Fluorescence in Situ Hybridization for the Identification of Environmental Microorganisms. *Molecular Microbial Ecology Manuel* 3 (11): 711–26. doi:10.1007/978-1-4020-2177-0_311.
- Pikuta, Elena V, Richard B Hoover, and Jane Tang. 2007. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. *Critical Reviews in Microbiology* 33 (3). United States: 183–209. doi:10.1080/10408410701451948.
- Pina, Pablo S., Victor A. Oliveira, Flávio L.S. Cruz, and Versiane A. Leão. 2010. Kinetics of Ferrous Iron Oxidation by *Sulfobacillus Thermosulfidooxidans*. *Biochemical Engineering Journal* 51 (3): 194–97. doi:10.1016/j.bej.2010.06.009.
- Pirbadian, Sahand, Sarah E Barchinger, Kar Man Leung, Hye Suk Byun, Yamini Jangir, Rachida A Bouhenni, Samantha B Reed, et al. 2014. *Shewanella Oneidensis* MR-1 Nanowires Are Outer Membrane and Periplasmic Extensions of the Extracellular Electron Transport Components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (35): 12883–88. doi:10.1073/pnas.1410551111.
- Pisciotta, John M, Zehra Zaybak, Douglas F Call, and Bruce E Logan. 2012. Enrichment of Microbial Electrolysis Cell Biocathodes from Sediment. doi:10.1128/AEM.00480-12.
- Rabaey, Korneel, Nico Boon, Steven D Siciliano, Willy Verstraete, and Marc Verhaege. 2004. Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5373–82. doi:10.1128/AEM.70.9.5373.
- Rabaey, Korneel, Jorge Rodríguez, Linda L Blackall, Jurg Keller, Pamela Gross, Damien Batstone, Willy Verstraete, and Kenneth H Nealson. 2007. Microbial Ecology Meets Electrochemistry: Electricity-Driven and Driving Communities. *The ISME Journal* 1 (1): 9–18. doi:10.1038/ismej.2007.4.
- Rabaey, Korneel, and René A Rozendal. 2010. Microbial Electrosynthesis - Revisiting the

- Electrical Route for Microbial Production. *Nature Reviews. Microbiology* 8 (10). Nature Publishing Group: 706–16. doi:10.1038/nrmicro2422.
- Ragsdale, Stephen W, and Elizabeth Pierce. 2009. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO₂ Fixation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (12): 1873–98. doi:10.1016/j.bbapap.2008.08.012.Acetogenesis.
- Ramos-Vera, W. Hugo, Ivan A. Berg, and Georg Fuchs. 2009. Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation in Thermoproteales Revisited. *Journal of Bacteriology* 191 (13): 4286–97. doi:10.1128/JB.00145-09.
- Reasoner, D. J., and E. E. Geldreich. 1985. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water 49 (1): 1–7.
- Reiner, Johannes Eberhard. 2015. Isolierung von Elektroautotrophen Mikroorganismen. *Masterarbeit*, Institut für angewandte Biologie, KIT.
- Renslow, Ryan, Conrad Donovan, Matthew Shim, Jerome Babauta, Srilekha Nannapaneni, James Schenk, and Haluk Beyenal. 2011. Oxygen Reduction Kinetics on Graphite Cathodes in Sediment Microbial Fuel Cells. *Physical Chemistry Chemical Physics* 13: 21573–84. doi:10.1039/c1cp23200b.
- Rosenbaum, Miriam A., and Ashley E. Franks. 2014. Microbial Catalysis in Bioelectrochemical Technologies: Status Quo, Challenges and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-013-5396-6.
- Rosenbaum, Miriam A., and Alexander W. Henrich. 2014. Engineering Microbial Electrocatalysis for Chemical and Fuel Production. *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/j.copbio.2014.03.003.
- Rosenbaum, Miriam, Federico Aulenta, Marianna Villano, and Largus T. Angenent. 2011. Cathodes as Electron Donors for Microbial Metabolism: Which Extracellular Electron Transfer Mechanisms Are Involved? *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.008.
- Ross, Daniel E., Jeffrey M. Flynn, Daniel B. Baron, Jeffrey A. Gralnick, and Daniel R. Bond. 2011. Towards Electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of Reversing the Mtr Pathway for Reductive Metabolism. *PLoS ONE* 6 (2): 94305. doi:10.1371/journal.pone.0016649.
- Rozendal, René A., Emilie Leone, Jörg Keller, and Korneel Rabaey. 2009. Efficient Hydrogen Peroxide Generation from Organic Matter in a Bioelectrochemical System. *Electrochemistry Communications* 11 (9): 1752–55. doi:10.1016/j.elecom.2009.07.008.
- Sasaki, Kengo, Yota Tsuge, Daisuke Sasaki, and Akihiko Kondo. 2014. Increase in Lactate Yield by Growing *Corynebacterium Glutamicum* in a Bioelectrochemical Reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117 (5): 598–601. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.10.026.
- Schneider, Caroline A, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nature Methods* 9 (7). United States: 671–75.

- Schröder, Uwe, Falk Harnisch, Largus T. Angenent, and Et. Al. 2015. Microbial Electrochemistry and Technology: Terminology and Classification. *Energy Environ. Sci.* 8 (2): 513–19. doi:10.1039/C4EE03359K.
- Schuetz, B, M Schicklberger, J Kuermann, A M Spormann, and J Gescher. 2009. Periplasmic Electron Transfer via the *c*-Type Cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella Oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* 75 (24): 7789–96. doi:Doi 10.1128/Aem.01834-09.
- Shen, Hai Bo, Xiao Yu Yong, Yi Lu Chen, Zhi Hong Liao, Rong Wei Si, Jun Zhou, Shu Ya Wang, Yang Chun Yong, Ping Kai OuYang, and Tao Zheng. 2014. Enhanced Bioelectricity Generation by Improving Pyocyanin Production and Membrane Permeability through Sophorolipid Addition in *Pseudomonas Aeruginosa*-Inoculated Microbial Fuel Cells. *Bioresource Technology* 167: 490–94. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.093.
- Shima, Seigo, Melanie Sordel-Klippert, Andrei Brioukhanov, Alexander Netrusov, Dietmar Linder, and Rudolf K. Thauer. 2001. Characterization of a Heme-Dependent Catalase from *Methanobrevibacter Arboriphilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7): 3041–45. doi:10.1128/AEM.67.7.3041-3045.2001.
- Snider, R. M., S. M. Strycharz-Glaven, S. D. Tsoi, J. S. Erickson, and L. M. Tender. 2012. Long-Range Electron Transport in *Geobacter Sulfurreducens* Biofilms Is Redox Gradient-Driven. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (38): 15467–72. doi:10.1073/pnas.1209829109.
- Soussan, Laurence, Julien Riess, Benjamin Erable, Marie Line Delia, and Alain Bergel. 2013. Electrochemical Reduction of CO₂ Catalysed by *Geobacter Sulfurreducens* Grown on Polarized Stainless Steel Cathodes. *Electrochemistry Communications* 28: 27–30. doi:10.1016/j.elecom.2012.11.033.
- Stahl D. A., and Rudolf Amann. 1991. Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 205–48.
- Steele, B C, and Angelika Heinzl. 2001. Materials for Fuel-Cell Technologies. *Nature* 414 (November): 345–52. doi:10.1038/35104620.
- Strycharz, Sarah M, Richard H Glaven, Maddalena V Coppi, Sarah M Gannon, Lorrie a Perpetua, Anna Liu, Kelly P Nevin, and Derek R Lovley. 2011. Gene Expression and Deletion Analysis of Mechanisms for Electron Transfer from Electrodes to *Geobacter Sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* 80 (2): 142–50. doi:10.1016/j.bioelechem.2010.07.005.
- Sturm-Richter, Katrin, Frederik Golitsch, Gunnar Sturm, Elena Kipf, André Dittrich, Sebastian Beblawy, Sven Kerzenmacher, and Johannes Gescher. 2015. Unbalanced Fermentation of Glycerol in *Escherichia Coli* via Heterologous Production of an Electron Transport Chain and Electrode Interaction in Microbial Electrochemical Cells. *Bioresource Technology* 186. Elsevier Ltd: 89–96. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.116.
- Sturm, Gunnar. 2014. Periplasmatische Elektronentransfer-Reaktionen in *Shewanella Oneidensis* MR-1. Insitut für angewandte Biologie, KIT.

- Sturm, Gunnar, Katrin Richter, Andreas Doetsch, Heinrich Heide, Ricardo O Louro, and Johannes Gescher. 2015. A Dynamic Periplasmic Electron Transfer Network Enables Respiratory Flexibility beyond a Thermodynamic Regulatory Regime. *The ISME Journal* 9 (8): 1802–11. doi:10.1038/ismej.2014.264.
- Summers, Zarath M, Heather E Fogarty, Ching Leang, Ashley E Franks, Nikhil S Malvankar, and Derek R Lovley. 2010. Direct Exchange of Electrons within Aggregates of an Evolved Syntrophic Coculture of Anaerobic Bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 330 (6009): 1413–15. doi:10.1126/science.1196526.
- Summers, Zarath M, Jeffrey A Gralnick, and Daniel R Bond. 2013. Cultivation of an Obligate Fe (II) -Oxidizing Lithoautotrophic. *mBio* 4 (1): 1–5. doi:10.1128/mBio.00420-12.Editor.
- Takai, K, K Nakamura, T Toki, U Tsunogai, M Miyazaki, J Miyazaki, H Hirayama, S Nakagawa, T Nunoura, and K Horikoshi. 2008. Cell Proliferation at 122 Degrees C and Isotopically Heavy CH₄ Production by a Hyperthermophilic Methanogen under High-Pressure Cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10949–54. doi:10.1073/pnas.0712334105.
- TerAvest, Michaela A, Miriam A Rosenbaum, Nicholas J Kotloski, Jeffrey A Gralnick, and Largus T Angenent. 2014. Oxygen Allows *Shewanella Oneidensis* MR-1 to Overcome Mediator Washout in a Continuously Fed Bioelectrochemical System. *Biotechnology and Bioengineering* 111 (4). United States: 692–99. doi:10.1002/bit.25128.
- Thauer, Rudolf K., Anne-Kristin Kaster, Henning Seedorf, Wolfgang Buckel, and Reiner Hedderich. 2008. Methanogenic Archaea: Ecologically Relevant Differences in Energy Conservation. *Nature Reviews Microbiology* 6 (8): 579–91. doi:10.1038/nrmicro1931.
- Thornton, Philip K., Polly J. Ericksen, Mario Herrero, and Andrew J. Challinor. 2014. Climate Variability and Vulnerability to Climate Change: A Review. *Global Change Biology*. doi:10.1111/gcb.12581.
- Thrash, J. Cameron, and John D. Coates. 2008. Review: Direct and Indirect Electrical Stimulation of Microbial Metabolism. *Environmental Science and Technology*. doi:10.1021/es702668w.
- Torres, César I., Andrew Kato Marcus, Hyung Sool Lee, Prathap Parameswaran, Rosa Krajmalnik-Brown, and Bruce E. Rittmann. 2010. A Kinetic Perspective on Extracellular Electron Transfer by Anode-Respiring Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00191.x.
- Ueki, Toshiyuki, Kelly P. Nevin, Trevor L. Woodard, and Derek R. Lovley. 2014. Converting Carbon Dioxide to Butyrate with an Engineered Strain of *Clostridium Ljungdahlii*. *mBio* 5 (5): 19–23. doi:10.1128/mBio.01636-14.
- Van Gelder, R N, M E von Zastrow, a Yool, W C Dement, J D Barchas, and J H Eberwine. 1990. Amplified RNA Synthesized from Limited Quantities of Heterogeneous cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (5): 1663–67. doi:10.1073/pnas.87.5.1663.

- Velasquez-Orta, Sharon B., Ian M. Head, Thomas P. Curtis, Keith Scott, Jonathan R. Lloyd, and Harald Von Canstein. 2010. The Effect of Flavin Electron Shuttles in Microbial Fuel Cells Current Production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (5): 1373–81. doi:10.1007/s00253-009-2172-8.
- Villano, Marianna, Federico Aulenta, Costanza Ciucci, Tommaso Ferri, Antonio Giuliano, and Mauro Majone. 2010. Bioelectrochemical Reduction of CO₂ to CH₄ via Direct and Indirect Extracellular Electron Transfer by a Hydrogenophilic Methanogenic Culture. *Bioresource Technology* 101 (9): 3085–90. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.077.
- Walker, C B, J R de la Torre, M G Klotz, H Urakawa, N Pinel, D J Arp, C Brochier-Armanet, et al. 2010. *Nitrosopumilus Maritimus* Genome Reveals Unique Mechanisms for Nitrification and Autotrophy in Globally Distributed Marine Crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8818–23. doi:10.1073/pnas.0913533107.
- Wang, Qiong, George M. Garrity, James M. Tiedje, and James R. Cole. 2007. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261–67. doi:10.1128/AEM.00062-07.
- Wang, Zheng, Dagmar H. Leary, Anthony H P Malanoski, Robert W. Li, W. Judson Hervey, Brian J. Eddie, Gabrielle S. Tender, et al. 2015. A Previously Uncharacterized, Nonphotosynthetic Member of the *Chromatiaceae* Is the Primary CO₂-Fixing Constituent in a Self-Regenerating Biocathode. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (2): 699–712. doi:10.1128/AEM.02947-14.
- Weber, Karrie a, Laurie a Achenbach, and John D Coates. 2006. Microorganisms Pumping Iron: Anaerobic Microbial Iron Oxidation and Reduction. *Nature Reviews. Microbiology* 4 (10): 752–64. doi:10.1038/nrmicro1490.
- White, Helen K, Clare E Reimers, Erik E Cordes, Geoffrey F Dilly, and Peter R Girguis. 2009. Quantitative Population Dynamics of Microbial Communities in Plankton-Fed Microbial Fuel Cells. *The ISME Journal* 3 (6). Nature Publishing Group: 635–46. doi:10.1038/ismej.2009.12.
- Williams, Kenneth H., Kelly P. Nevin, Ashley Franks, Andreas Englert, Philip E. Long, and Derek R. Lovley. 2010. Electrode-Based Approach for Monitoring in Situ Microbial Activity during Subsurface Bioremediation. *Environmental Science and Technology* 44 (1): 47–54. doi:10.1021/es9017464.
- Wrighton, K. C., J. C. Thrash, R. A. Melnyk, J. P. Bigi, K. G. Byrne-Bailey, J. P. Remis, D. Schichnes, M. Auer, C. J. Chang, and J. D. Coates. 2011. Evidence for Direct Electron Transfer by a Gram-Positive Bacterium Isolated from a Microbial Fuel Cell. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (21): 7633–39. doi:10.1128/AEM.05365-11.
- Wrighton, Kelly C, Peter Agbo, Falk Warnecke, Karrie A Weber, Eoin L Brodie, Todd Z DeSantis, Philip Hugenholtz, Gary L Andersen, and John D Coates. 2008. A Novel Ecological Role of the Firmicutes Identified in Thermophilic Microbial Fuel Cells. *The ISME Journal* 2 (11). England: 1146–56. doi:10.1038/ismej.2008.48.

-
- Yates, Matthew D., Michael Siegert, and Bruce E. Logan. 2014. Hydrogen Evolution Catalyzed by Viable and Non-Viable Cells on Biocathodes. *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (30): 16841–51. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.015.
- Zaybak, Zehra, John M Pisciotta, Justin C Tokash, and Bruce E Logan. 2013. Enhanced Start-up of Anaerobic Facultatively Autotrophic Biocathodes in Bioelectrochemical Systems. *Journal of Biotechnology* 168 (4). Elsevier B.V.: 478–85. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.10.001.
- Zhang, Tian, Sarah M Gannon, Kelly P Nevin, Ashley E Franks, and Derek R Lovley. 2010. Stimulating the Anaerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons in Contaminated Sediments by Providing an Electrode as the Electron Acceptor. *Environmental Microbiology* 12 (4): 1011–20. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02145.x.
- Zhang, Tian, Huarong Nie, Timothy S. Bain, Haiyun Lu, Mengmeng Cui, Oona L. Snoeyenbos-West, Ashley Edwin Franks, Kelly Nevin, Thomas P Russell, and Derek Lovley. 2013. Improved Cathode Materials for Microbial Electrosynthesis. *Energy & Environmental Science* 6: 217–24. doi:10.1039/c2ee23350a.

Anhang

Manuskript

Physiological and molecular investigation on an electroautotrophic consortium at high temperatures followed by the reverse engineering with a distinct organism

Geiger, Katharina; Dötsch, Andreas; Golitsch, Frederik; Reiner, Johannes E.; Hügler, Michael; Wilcke, Wolfgang; and Gescher Johannes. Physiological and molecular investigation on an electroautotrophic consortium at high temperatures followed by the reverse engineering with a distinct organism. To be submitted.

1 **Physiological and molecular investigation on an electroautotrophic consortium at**
2 **high temperatures followed by the reverse engineering with a distinct organism**

3

4 Katharina Geiger¹, Andreas Dötsch², Frederik Golitsch¹, Johannes E. Reiner¹, Michael
5 Hügler³, Wolfgang Wilcke⁴ and Johannes Gescher¹

6 ¹ Institute for Applied Biosciences, Department of Applied Biology, Karlsruhe Institute of
7 Technology, Fritz-Haber-Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany.

8 ² Institute of Functional Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology, Herrmann-von-
9 Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany.

10 ³ Microbiology Department, Water Technology Center, Karlsruher Strasse 84, 76139
11 Karlsruhe, Germany.

12 ⁴ Institute of Geography and Geoecology, Karlsruhe Institute of Technology, Reinhard-
13 Baumeister-Platz 1, 76131 Karlsruhe, Germany.

14

15

16

17 **Abstract**

18 Electroautotrophy describes a lifestyle where microorganisms use electrical energy
19 provided via a cathode as a source for metabolic electrons to reduce carbon dioxide.
20 This is seen as a trendsetting approach to combine the reduction of CO₂ to organic
21 compounds thereby addressing the demand of storage solutions for excess energy. This
22 work shows an enrichment of electroautotrophic organisms with a particular focus on
23 thermophiles. The cathode potential was -350 mV vs. standard hydrogen electrode
24 (SHE) and CO₂ was the carbon source. After 18 months a constant current of
25 about -1 mA was reached. High-throughput sequencing of the 16S rRNA revealed a
26 mixture of bacteria and archaea. Metagenomic and metatranscriptomic analysis
27 examined three CO₂ fixation pathways and further the lack of transcribed hydrogenases
28 points evidence for a direct transfer of electrons from the cathode. Reverse engineering
29 of the system was possible with distinct organisms that were isolated from the reactor
30 before.

31

32 **Introduction**

33 Microbial electrosynthesis is a process that was only recently described by Nevin et al.
34 as an electricity-driven reduction of carbon dioxide catalyzed by microorganisms (3).
35 The application of this process addresses the demand for an electrical energy storage
36 solution from renewable sources as well as the need for new ways to transform CO₂ into
37 valuable compounds (1,2,4,5).

38 Autotrophic electrosynthesis is a respiratory process in which microbes use the
39 difference in redox potential between a cathode as electron donor and an electron
40 acceptor to establish an ion-gradient that is used for ATP synthesis. Interestingly, the
41 biochemistry that enables the import of electrons from cathodes is so far not well
42 understood and it is still under debate whether electron transfer occurs in all reported
43 cases directly or at least to some extent mediated via cathode driven hydrogen
44 production (4,10,15). Whether or not hydrogen could be produced on the cathode will
45 depend on the choice of the cathode material as well as the working electrode potential.
46 The midpoint redox potential of the H⁺/H₂ redox couple is -414 mV vs. standard
47 hydrogen electrode (SHE) and Yates et al. could show hydrogen production on graphite
48 block cathodes starting at a potential of -600 mV vs. SHE (14,16,29). Lohner et al. used
49 *Methanococcus maripaludis* and analyzed cathode driven methane production at a
50 potential of -600 mV vs. SHE (10). The conducted experiments revealed that a
51 hydrogenase deficient mutant produced only 10% of the methane formed by the wild
52 type. Along these lines, a further study revealed that spent, cell-free medium from
53 routinely cultured *M. maripaludis* wild type cells contained hydrogenases and that this
54 spent medium was sufficient to explain the rates of electromethanogenesis in previous
55 studies with *M. maripaludis* (14). This points towards a direct interaction between the
56 cathode and a secreted hydrogenase and does not favor the hypothesis of mediator-free

57 import of electrons by the organisms. Moreover, the cell-free medium did not only
58 catalyze production of hydrogen but also formate, which could indicate that formate is
59 another potential mediator of electron transfer (14). A similar observation, that cell-free
60 spent medium can accelerate cathode driven production processes, was also described
61 for *Sporomusa sphaeroides* (14). Nevertheless, studies on other acetogens like
62 *Clostridium ljungdahlii*, *Sporomusa ovata* and *Moorella thermoacetica* presume a direct
63 interaction between the microbes and the cathode (3,6,16,17).

64 Clear evidence for direct electron transfer between cells and cathodes stems from
65 studies on cathode driven reduction processes in *Geobacter sulfurreducens* and
66 *Shewanella oneidensis*. These organisms are model species for extracellular electron
67 transfer processes to ferric iron or anodes. Hence, they thrive using a respiratory chain
68 from the cytoplasmic membrane to the cell surface. Nevertheless, if these organisms
69 were supplied with a cathode as electron donor, it was possible to observe in all cases a
70 reduction of either nitrate or fumarate as electron acceptor (11,12,13). Moreover,
71 deletion of key elements of the electron transport chain to ferric iron in *S. oneidensis*
72 disabled the import of electrons, which favors the hypothesis of a bidirectional electron
73 transport chain that can directly interact with a cathode or an anode (13). Similar
74 evidence was provided in *G. sulfurreducens*, because an uptake-hydrogenase mutant was
75 not affected in cathode-driven electron transfer coupled to the reduction of fumarate
76 (11).

77 A third class of organisms that was cultivated on cathodes are iron oxidizers. Although
78 ferrous iron is soluble, these organisms have, similarly to the above mentioned iron
79 reducers, established an extended electron transport chain to the cell surface. In this
80 case, this electron transport chain evolved for the import of electrons. Thereby, the
81 organisms omit the precipitation of oxidized iron inside the cell. So far, authors reported

82 for *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1, *Mariprofundus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus*
83 *ferrooxidans* the uptake of electrons from the cathode (18,16,17). Interestingly,
84 *R. palustris* TIE-1 has a two-protein complex in the outer membrane that is similar to
85 modules that are needed for electron export in *Shewanella* and *Geobacter* strains.
86 Deletion of these genes in *R. palustris* TIE-1 resulted in a 30% decrease of the electron
87 uptake rate compared to the wild type, underlining the importance of a direct electron
88 transfer from the cathode (18).

89 This study reports one of the first analysis of cathode driven autotrophy in microbial
90 thermophilic communities. Thermophiles are attractive for biotechnological
91 applications given that a reduction of CO₂ contents of exhaust gases from coal power
92 plants would be more effective without cooling of the CO₂ containing gas. It was our aim
93 to study the community composition as well as its physiological capabilities using 16S
94 amplicon sequencing, as well as metagenomic and metatranscriptomic analysis.
95 Furthermore, it was possible to isolate organisms from the cathode and, as an adaption
96 of Koch's postulates, re-cultivate them under similar conditions on the cathode.

97

98

99

100

101

102

103

104 **Methods**

105 Sampling site

106 All environmental samples used in this work were collected in august 2012 at different
107 hydrothermal spots on the Azoric Island São Miguel (see figure S1).

108 Electrochemical culturing conditions

109 All electrosynthesis experiments were performed in a reactor that was previously
110 described. The working electrode chamber of this bioelectrochemical reactors had a
111 volume of 2 L (9). A 16 cm² piece of graphite felt (SGL Carbon SE, Germany) served as
112 working electrode (cathode) material and a platinum gauze (0.5 x 5 cm, 1024 mesh/cm²,
113 wire 0.06 mm diameter), inserted into a porous glass tube, was used as the counter
114 electrode (anode). As a reference electrode, a saturated calomel electrode (SCE)
115 (Sensortechnik Meinsberg, Germany) was employed. For the initial enrichment, an
116 electrosynthesis (ES) minimal media containing 10 mM NH₄Cl, 8.7 mM NaCl, 0.3 mM
117 KH₂PO₄, 0.1 mM CaCl₂ and 0.012 mM MgSO₄ supplemented with Wolfe's mineral elixer
118 (DSMZ 792) was used. In the beginning 5 mM HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-
119 piperazinyl)-ethansulfonic acid) was added as a buffer to retain a pH of 7 but as the pH
120 dropped to ~3.5 and stayed stable, HEPES was not added to subsequent experiments
121 and the pH was instead adjusted to 3.5 with H₂SO₄. The reactor was connected to a
122 potentiostat (AUTOLAB, Metrohm, Netherlands) and a constant potential of -594 mV vs.
123 SCE which equals -350 mV vs. SHE was applied. The system was incubated at 60 °C and
124 continuously purged with a mixture of 80% N₂ and 20% CO₂. Initially the
125 electrosynthesis reactor was inoculated with a mixture of 24 samples from
126 hydrothermal systems from the Azoric island São Miguel. All electrochemical
127 experiments with isolated organisms were performed in media used for the isolations.
128 For *Kyrpidia* sp. this was ES-media with a pH adjusted to 6,6 and a gas mixture of 99,5%

129 CO₂ and 0.5% O₂. For the mixed culture of *Thermoplasma* sp. and *Acidianus* sp. a mineral
130 medium with pH 2.5 flushed with 80 % N₂ and 20 % CO₂ was used. A modified DSMZ
131 medium 182 containing 2 mM KNO₃ as electron acceptor, adjusted to pH 4 and
132 constantly purged with N₂/CO₂ (80:20) was used for the *Thermaerobacter*-like isolate.
133 All isolate experiments were incubated at 60 °C and the applied potential was -500 mV
134 vs. SHE.

135 Microscopic analysis

136 Catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH) of the
137 cathodes was performed as described in Pernthaler et al. with some modifications (19).
138 Fixation of the cathode material was conducted for four hours in appropriate media with
139 4% formaldehyde at 4 °C. Afterwards the cathodes were washed with PBS (138 mM
140 NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, pH 7.5) for 30 min at 4 °C. Inhibition
141 of endogenous peroxidases and permeabilization was carried out with 0.1 M HCl for
142 10 min followed by an additional permeabilization step of 10 min in 0.5% SDS in PBS.
143 Hybridization was performed at 46 °C. The probes used in this work were EUB338-I
144 ([HRP]GCTGCCTCCCGTAGGAGT, 35% formaldehyde, 28) for bacteria and Arch915
145 ([HRP]GTGCTCCCCGCCAATTCCT, 20% formaldehyde, 27) for archaea. Washing buffers
146 were pre-warmed to 48 °C and the washing lasted for 15 min at 48 °C followed by
147 another 15 min washing step with SSC (150 mM NaCl, 15 mM Na-citrate, pH 7). The
148 amplification was conducted for 30 min at 37 °C followed by two washing steps with SSC
149 at room temperature (RT). For inhibition of the horse radish peroxidase another step
150 with 0.1 M HCl for 10 min was conducted prior to hybridization with the second probe.
151 Finally, the cathodes were counterstained with DAPI (1 µg/ml) for 5 min at RT. Residual
152 dye was rinsed with ddH₂O and then with 96% ethanol. Stained cathodes were
153 subsequently viewed with a Leica DM5500B microscope (camera: Leica DFC360FX, dip-

154 in-objective 63x HXCAPO L63/090W, water immersion). Images were taken with Leica
155 LAS-AF software and images were further processed with the ImageJ software
156 (Rasband, 1997-2004) (20).

157 For scanning electron microscopy (SEM) a part of the previously fixed cathode material
158 was air dried at RT, mounted on a sample holder and then sputtered with platinum
159 before microscopy.

160 Molecular biology analysis

161 DNA isolation and 16S PCR for 454 pyro-sequencing

162 Total DNA was isolated from a piece of the graphite felt with the innuSPEED Soil DNA kit
163 (Analytic Jena, Germany) according to the manufacturer's instructions. 16S rDNA gene
164 sequences were amplified from the obtained DNA via PCR using iProof polymerase from
165 Biorad (Munich, Germany) with primers specific for bacterial (Bact_341F,
166 CCTACGGGNGGCWGCAG and Bact_805R, GACTACHVGGGTATCTAATCC;21) and archaeal
167 (Arch_915F, GTGCTCCCCGCCAATTCCT and Uni_1406R, GACGGGCRGTGTGTRCAA, 21,
168 22) sequences. The applied thermal cycling program was the following: 98 °C for
169 2.30 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 sec, 52 °C (bacteria) or 56 °C (archaea)
170 for 30 sec, 72 °C for 45 sec and a final elongation step at 72 °C for 10 min. The amplified
171 DNA was loaded on an agarose gel for verification of the amplicon sizes. PCR products
172 were purified from the gel using the WIZARD gel purification kit from Promega
173 (Mannheim, Germany) and subsequently sent to IMG/M laboratories (Martinsried,
174 Germany) for 454 pyro-sequencing on a FLX junior (Roche).

175 Amplification of total genomic DNA for Illumina sequencing

176 As there was only a limited amount of cathodic biofilm material for all analysis, the
177 genomic DNA had to be amplified with ϕ 29-polymerase before sequencing of the
178 metagenome. Total genomic DNA was amplified using the REPLI-g Single Cell kit from

179 QIAGEN (Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions for whole cells.
180 Subsequently the DNA was processed for Illumina sequencing.

181 RNA isolation and amplification for Illumina sequencing

182 To obtain the metatranscriptome of the cathodic community the total RNA was isolated
183 from a piece of the graphite felt with the RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit from
184 MOBIO (Carlsbad, USA). To gain enough material for sequencing the total RNA was first
185 amplified using the MessageAmp™-II Bacteria Kit from ambion (Life Technologies, USA)
186 and thereafter transcribed to double stranded cDNA with the SuperScript® Double-
187 Stranded cDNA Synthesis Kit from Invitrogen (Life technologies, USA). Subsequently, the
188 cDNA was processed for Illumina sequencing.

189 Bioinformatical analysis of 454 raw data

190 Identification and classification of the obtained 16S sequences was conducted using
191 QIIME, which allows the analysis of high-throughput sequencing data (23). QIIME
192 comprises a series of Python scripts for data analyses. First the raw reads were
193 demultiplexed with split_libraries.py and then trimmed using a minimum read length of
194 200 bp and an average quality score of 25. The obtained sequences were further
195 clustered into operational taxonomic units (OTU) with 97% similarity using the
196 pick_de_novo_otu.py script. A representative sequence from each OTU was
197 taxonomically classified using the RDP classifier implemented in the QIIME pipeline and
198 using the latest Greengenes database gg_12_10
199 (http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/12_10) (25,26). The
200 reads were aligned to the greengenes core reference alignment with default settings
201 using PyNAST (24). The QIIME results were imported into OriginPro for graph
202 visualisation. The 16S pyrosequencing raw data has been submitted to the xxx with
203 accession number xxx.

204 Bioinformatic analysis of the metagenome and the metatranscriptome

205 → Andreas Dötsch

206 ¹³C-bicarbonate fixation experiment

207 Subsequent to the molecular biology experiments the remaining cathode material was
208 cut into two pieces and reinserted into the electrosynthesis reactor. One part was
209 reconnected to the potentiostat and poised to -350 mV vs. SHE, while the other part was
210 not connected. The gassing with N₂/CO₂ was stopped the day after the separation of the
211 cathode and 1 g of ¹³C isotopic NaHCO₃ was added. Then parts of both cathodes were cut
212 off at different time points and cells were removed from the carbon felt by adding 1 ml
213 10 mM H₂SO₄ and shaking at 11 Hz for 40 min on a Retsch shaker (Haan, Germany).
214 500 µl of the suspensions were transferred to tin cartridges (10 x 10 mm, IVA
215 Analysentechnik, Meerbusch, Germany), frozen and then lyophilized.

216 → Wolfgang Wilcke

217 Isolation of distinct organisms

218 Several strategies were used to obtain pure cultures or enrichments from the working
219 electrodes. Microbial growth was assessed in different mineral media with varying pH
220 (2-6.6) using CO₂, O₂, SO₄²⁻ or NO₃⁻ as electron acceptor. All isolation and enrichment
221 attempts were performed at 60 °C in flasks with rubber stopper sealing to maintain an
222 atmosphere of adequate pressure. The isolation strategies led so far to one pure
223 bacterial culture and three enrichments. The isolated organism was further tested for
224 electroautotrophy.

225 *Kyrpidia* sp.

226 *Kyrpidia* sp. was isolated in the ES mineral medium that was used for the initial
227 electrosynthesis enrichment at pH 6.6 with a gaseous atmosphere of H₂/CO₂ (80:20)
228 and a small volume of air. Under these conditions *Kyrpidia* sp. uses hydrogen as electron

229 donor and oxygen as terminal electron acceptor. Carbon dioxide is the carbon source for
230 the organism.

231 Enrichments using different electron acceptors

232 The basic media used for the enrichments was a modified *Sulfolobus* medium (DSMZ
233 182) which did not contain casamino acids. The media was supplemented with Wolfe's
234 mineral elezier (DSMZ 792) and gassed with H₂/CO₂ (80:20). The pH was adjusted to 4
235 using H₂SO₄, sulfate and CO₂ therefore represented electron acceptors for each
236 approach. One sample had 100 ml of air added and another one 2 mM KNO₃.

237

238 **Results**

239 Electrotrophic growth

240 Samples from geothermal hot springs on the Azoric Island were used to inoculate
241 microbial electrochemical cells. The initial pH dropped rapidly to 3.5 most probably due
242 to the high amount of sulfuric acid in the samples. Therefore, addition of a neutral buffer
243 was avoided from then on. The potential of the working electrode was set to -350 mV vs.
244 SHE to avoid an abiotic production of hydrogen (14,16,29). During incubation of the
245 sediment samples a gradual drop in current was observed (data not shown). To
246 eliminate remaining organics and force a selection for electroautotrophic organisms, the
247 cathode and half of the liquid phase were transferred to a sterile reactor. From this time
248 on a sterile control reactor was connected to a potentiostat under equal conditions. CO₂
249 was supplied via continuous gassing with N₂/CO₂ (80:20). Figure 1 shows the
250 development of current over time in the bioelectrochemical systems. The inoculated
251 reactor reached currents down to 0.75 A/m² while the current of the sterile control was
252 never lower than 0.063 A/m² over a period of 60 days. The variations seen in the graph
253 for the inoculated system were most probably due to differences in gassing and media
254 evaporation, that was equaled by the addition of ddH₂O. The experiment was conducted
255 for an overall time period of 18 months before carbon fixation was analyzed via ¹³C
256 incorporation and parts of the cathode were removed for analytical purposes.

257 Microscopic analysis

258 Microscopic analysis was conducted to confirm that the observed current (fig.1) was
259 supported by microbial growth and activity. CARD-FISH analysis of the cathode graphite
260 fibers revealed that active microorganisms belonging to both the domain of archaea and
261 bacteria were thriving on the cathodes. Figure 2 illustrates that bacteria are dominant in
262 the sessile fraction, whereas signals for archaea were detected only to a minor extend.

263 The morphology of the electroautotrophically grown cells was investigated by SEM
264 analysis. The images show an agglomeration of cells between the graphite fibers (fig. 2)
265 and these aggregates observed in SEM are corroborated by the CARD-FISH analysis
266 (figure 2C) and are therefore not only a drying artifact. Moreover, figure 2 E reveals cells
267 of rod and cocci shaped character that are directly attached to the fibers.

268 Microbial community analysis

269 Amplicon sequencing of 16S rRNA gene fragments and subsequent 454 sequencing was
270 conducted to follow the development of the microbial community as a result of the
271 selection for growth using a cathode as electron donor. The biofilm on the cathode was
272 compared with the initial inoculum. The results shown in figure 3 and the corresponding
273 table 2 represent the relative distribution of archaeal and bacterial 16S sequences in the
274 two different samples. The corresponding raw data was uploaded to the xxx with the
275 accession number xxx. The applied experimental conditions (-350 mV vs. SHE, 60 °C,
276 pH 3.5, N₂/CO₂) lead to a selective enrichment of archaea and bacteria that are distinct
277 from the initially added inoculum. The archaeal diversity was moderate in both the
278 inoculum and the community after electrochemical enrichments but it changed
279 dramatically. With the primer pair used to amplify archaeal 16S sequences 83.9% of the
280 obtained reads for the inoculum cluster to unassigned sequences whereas more than
281 80% of the reads belong to the *Sulfolobaceae* family after the electroautotrophic
282 enrichment. The bacterial community in the inoculum is dominated by members of the
283 *Acidithiobacillaceae* (70.5%), followed by *Oxalobacteraceae* (11%), *Alicyclobacillaceae*
284 (3.9%) and *Caulobacteraceae* (1.6%). A more diverse community composition can be
285 seen in the reads obtained for bacteria after the electroautotrophic enrichment. These
286 samples were dominated mainly by *Thermoanaerobacteraceae* (36.1%) and
287 *Nitrospiraceae* (27.8%) followed by *Thermaceae* (11.7%) and *Caldiseriaceae* (2.8%).

288 While only 7.9% of the reads from the inoculum were unassigned, so were 14.8% of the
289 reads from the cathodic biofilm.

290 ¹³C-incorporation

291 Autotrophic activity was measured via the incorporation of ¹³C-labeled bicarbonate. This
292 activity was compared between cells on a cathode that was connected to a potentiostat
293 with another cathode that was not connected but in the same reactor. The analysis
294 revealed that $\delta^{13}\text{C}$ migrated only to positive values in the samples that were supplied
295 with cathodic electrons. The first samples were taken one week after the addition of ¹³C
296 bicarbonate to the electrosynthesis reactor. At that time the ¹³C content was 61‰ in the
297 sample from the cathode that was connected to the potentiostat whereas the content of
298 the non-connected one was -28‰. After seven weeks the experiment was stopped, at
299 that time the sample from the cathode attached to the potentiostat showed a $\delta^{13}\text{C}$ of
300 226‰, while the control remained rather stable at -20,1‰. The results of this
301 experiments are summarized in table S1.

302 Metagenomic analysis

303 To further assess the physiological capabilities of the organisms on the cathode and
304 simultaneously provide a database for the analysis of the metatranscriptome, the total
305 genomic DNA of the cells was amplified and subsequently sequenced. The Illumina-
306 PE100 sequencing produced 112.6 million readpairs. Using the idba-ud software (34)
307 the metagenome was assembled to 34523 contigs with an overall length of 78.3 Mbp. An
308 average contig had a length of 10884 bp. According to gene prediction with
309 MetaGeneMark the metagenome contained 99303 coding sequences in total. The
310 Illumina raw data was uploaded to xxx with accession number xxx. We attempted to use
311 the corresponding protein sequences of the metagenome also for a phylogenetic
312 analysis (tab. 5, fig. 4). The two most abundant families belong to the Firmicutes and

313 more than 50% of all protein sequences were grouped within the
314 *Thermoanaerobacteraceae* and *Peptococcaceae*. 18.6% of all sequences were attributed
315 to five families within the Archaea (*Sulfolobaceae*, *Thermoplasmataceae*,
316 *Archaeoglobaceae*, *Nitrosopumilaceae*, *Picrophilaceae*). The metagenome was screened
317 for the presence of carbon dioxide fixation pathways, potential pathways for electron
318 uptake from the cathode (proteins involved in iron oxidation/reduction, hydrogenases)
319 and potential terminal reductases. Genetic information for potential CO₂ fixation
320 pathways was searched using the KEGG database as well as a specifically designed
321 database comprising various sequences for key enzymes of each known fixation
322 pathway. The metagenome of the biofilm contains the genetic information for the Wood-
323 Ljungdahl pathway, the 3-hydroxypropionate/ 4-hydroxybutyrate pathway, the
324 dicarboxylate/4-hydroxybutyrate pathway, the reductive citric acid cycle as well as the
325 Calvin cycle. Regarding potential electron uptake mechanisms, it was sought for
326 hydrogenases, formate dehydrogenases as well as enzymes that are used by ferrous iron
327 oxidizing microorganisms. Corresponding genes for all these potential electron uptake
328 mechanisms were discovered. The search for iron oxidation mechanism revealed the
329 presence of homologous proteins to PioAB, MtrABC, rusticyanins, the Fox-proteins and
330 sulfocyanins. Moreover, periplasmic electron carriers like PccH and other cytochromes
331 were discovered. Regarding potential electron acceptors that can be used by the
332 community, we identified the genes necessary for carbonate respiration, nitrate
333 ammonification, as well as sulfate or oxygen reduction.

334 Metatranscriptomic analysis

335 The total RNA of the sessile cells was extracted, amplified, transcribed to cDNA and then
336 sequenced via the afore mentioned PE100 Illumina approach to further assess which
337 pathways and mechanisms operate in the biofilm. The raw data was uploaded to xxx

338 with accession number xxx. The sequencing revealed 20.54 million readpairs for the raw
339 data, after filtering 2 million readpairs were left.

340 The same library mentioned above containing key proteins for CO₂ fixation via one of
341 the six canonical pathways was used again to detect corresponding transcripts. The
342 results of the analysis are summarized in table 3, a detailed listing of all detected
343 proteins can be seen in table S2. Surprisingly, this search revealed that organisms using
344 the Wood-Ljungdahl-pathway, the reverse citric acid cycle, the 3-hydroxypropionate/4-
345 hydroxybutyrate cycle and the dicarboxylate/4-hydroxybutyrate cycle contribute to
346 primary production in the community. The enzyme 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase
347 participates in both the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle and the
348 dicarboxylate/ 4-hydroxybutyrate cycle. Further screening of the metatranscriptome
349 revealed 175 reads mapping to an acetyl-CoA-carboxylase which is only used in the
350 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle. Only one read mapped to a rubisco,
351 hence no evidence for the Calvin cycle acting in CO₂-fixation could be provided.
352 Consequently, transcripts for at least three CO₂-fixation pathways can be found in the
353 metatranscriptome.

354 Furthermore, the metatranscriptome showed multiple evidences for extracellular
355 electron transfer. Using RAPSEARCH2 39 out of 52 fasta sequences from the composed
356 iron oxidation database matched to the obtained RNA reads. The proteins found were
357 similar for example to FoxA, B, C from *Sulfolobus metallicus*, MtrA, B and C from
358 *Shewanella oneidensis*, protein sequences from the iron oxidation cluster of *Gallionella*
359 *capsiferriiformans* and rusticyanin and Iro from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A full
360 summary of the detected proteins, including formate-dehydrogenases and
361 hydrogenases, is listed in table 4.

362

363 Taxonomic characterization of the enrichments

364 After the complete analysis of the physiological capabilities and possible mechanisms of
365 energy generation it was another goal to isolate organisms that contribute to CO₂
366 fixation in the community. Therefore, we used two individual basic minimal media and
367 carbon dioxide as the sole carbon source. Sulfate, nitrate or oxygen was added as
368 electron acceptor while hydrogen served in all isolation attempts as electron donor. So
369 far, it was possible to isolate one individual organism (*Kyrpidia* sp.) and to have three
370 additional enrichments of varying diversity. After the third transfer, the microbial
371 diversity of the enrichments was analyzed via 454-amplicon-sequencing. The
372 amplification with the archaeal primerpair resulted in hardly any sequences (data not
373 shown), so this part focuses on the distribution of bacteria. Figure 7 and corresponding
374 table 6 show the results of the bacterial community analysis. As expected the usage of
375 different electron acceptors resulted in an enrichment of totally varying bacterial
376 species, as well in terms of diversity in the samples themselves and in between the
377 different samples. The enrichment with sulfate and CO₂ as electron acceptors had the
378 greatest diversity with 19.1% of the OTUs not to be assigned. The remaining OTUs all
379 clustered within the Clostridia. Herein 24.9% were assigned only to class level
380 Clostridia, 22% to Clostridiales, 18.7% to *Peptococcaceae* and 9.3% were assigned to
381 *Desulfoviregula*. Under microaerophilic conditions 87% of the obtained OTUs clustered to
382 *Moorella*, followed by Clostridia (3.4%), *Thermoanaerobacter* (2%) and *Halomonas*
383 (1.1%). The lowest diversity was seen within the enrichment that had 2 mM nitrate
384 added. Unfortunately, 98.2% of the OTUs were unassigned. A Shannon index of 1.08 for
385 this sample and the fact that an almost complete 16S sequence (1458 bp) could have
386 been amplified from the genomic DNA directly, confirm the expected low diversity. The

387 next cultivated relative to the prevalent enriched organism is *Thermaerobacter*
388 *subterraneus* with a sequence identity of 88% (tab 1).

389 Another approach with a minimal salt medium, related to the one used for the
390 electroautotrophic enrichment, H₂ as electron donor and CO₂ as sole carbon source
391 resulted in a pure culture of *Kyrpidia* sp. under microaerophilic conditions. The isolate
392 shows 97% sequence identity to *Kyrpidia tusciae* (tab 1).

393 Electroautotrophic experiments with isolated *Kyrpidia* sp.

394 Electroautotrophic experiments with the isolated *Kyrpidia* sp. were performed in media
395 that was used for the isolation before. Sterile medium served as a control. The applied
396 potential of the working electrode was poised to -500 mV vs. SHE to accelerate growth
397 of the organism. To maintain microaerophilic conditions, a gas mixture of 99.5% CO₂
398 and 0.5% O₂ was used in the experiments. The results for *Kyrpidia* sp. are shown in
399 figure 6. The sterile control reactor never showed currents lower than 0.03 A/m²
400 whereas a continuous drop in current, due to the consumption of electrons, in the
401 reactor inoculated with *Kyrpidia* sp. was observed throughout the experiment. By the
402 end of day 11 this was 0.438 A/m².

403

404

405

406

407 **Discussion**

408 Almost all so far reported studies on microbial electrosynthesis were performed under
409 moderate conditions at neutral pH and at mesophilic temperatures (6, 10, 39, 37). Here
410 we describe a long-term study of an extremophilic electroautotrophic growing
411 consortium that was enriched at 60 °C, a pH of 3.5 and a potential of -350 mV vs. SHE.
412 After the initial enrichment period of 18 months we used 16S community analysis,
413 metagenomics and metatranscriptomics to characterize the microbial community
414 composition. Several CO₂ fixation pathways were detected in the metagenome and
415 primary production was confirmed via ¹³C incorporation. Moreover, conceivable modes
416 for extracellular electron transfer were investigated.

417 The results of the 16S rDNA amplicon sequencing revealed that both archaea and
418 bacteria represent the electroautotrophic community. From another analysis we know
419 that there is no major difference between the community composition of the planktonic
420 and the sessile phase (data not shown). Under the assumption of an electroautotrophic
421 living, this incident points towards a somehow dynamic process where cells attach and
422 detach from the cathode to gain energy from cathodic electrons, what might be possible
423 as the culturing media is stirred by continuous gassing with N₂/CO₂. Additionally, it
424 might be possible that some organisms secrete redox-active components that may act to
425 shuttle electrons to planktonic cells. Looking at the archaeal community the applied
426 conditions led to a dominant enrichment in organisms belonging to the family of
427 *Sulfolobaceae* (81.3%). These include members that are described as autotrophic iron
428 oxidizers (*Acidianus*, *Metallosphaera*) and their enrichment confirms the hypothesis of
429 electroautotrophic growth (31,32). According to the microscopic analysis archaea
430 represent the minor fraction, while bacteria are dominant in the electroautotrophic
431 community. The same can be seen from the metagenomics data, where only 18.6%

432 archaeal proteins were detected. From the corresponding bacterial 16S rDNA analysis a
433 more diverse composition in organisms can be seen with *Thermoanaerobacteraceae*
434 representing the most abundant taxa (36.1% of the sequences) followed by
435 *Nitrospiraceae*, *Thermaceae* and *Caldiseriaceae*. Within the family of
436 *Thermoanaerobacteraceae*, Nevin et al. could show that *Moorella thermoacetica* was able
437 to use electrons with -400 mV vs. SHE for the production of mainly acetate (6).
438 *Caldanaerobacter subterraneus* is another member of the *Thermoanaerobacteraceae*
439 family that was found as part of a mixed community in a MFC operated at 80°C (33).
440 Members of the *Nitrospiraceae* perform CO₂-fixation via the reductive citric acid cycle.
441 Overall the 16S metastudies delivered no indication for an abundance of obligate
442 heterotrophic organisms, but many of them are facultative autotrophic mixotrophs.
443 Comparing the community composition in the electroautotrophic reactor to the
444 composition of organisms in the inoculum showed a selective enrichment under the
445 conditions applied.
446 Investigating the whole metagenome and metatranscriptome from the cells residing on
447 the cathode supported the indication obtained from the community composition
448 analysis, that chemolithoautotrophy represents the favored lifestyle of the
449 electrothrophically enriched consortium. Neither the 16S community analysis nor the
450 metagenomic data provide evidence for methanogens acting at the cathode of the
451 electrosynthesis reactor. This was expected as the chosen potential of -350 mV vs. SHE
452 should avoid hydrogen formation that was previously reported to start at -600 mV vs.
453 SHE at a cathode (14,29). To gain insight into possible mechanisms of electron uptake
454 from the cathode the metatranscriptome was searched for hints of iron oxidation but it
455 was also evaluated whether hydrogenases and formate dehydrogenases are
456 overrepresented. The RNA reads mapped to 39 protein sequences involved in iron

457 oxidation. Homologs to these proteins are obviously involved in obtaining electrons
458 from the graphite cathode in the enriched organisms. An involvement of hydrogen or
459 formate as electron donor, produced from hydrogenases and formate dehydrogenases,
460 could not be excluded from the transcriptomic data, but it seems not to be absolutely
461 essential for the electroautotrophic consortium. Along with this, RNAs for key proteins
462 of CO₂ fixation pathways were shown to be upregulated relative to their abundance in
463 the metagenome dataset, while proteins being typically expressed in heterotrophs were
464 not. The findings imply that the electroautotrophic community performs CO₂ fixation via
465 the Wood-Ljungdahl pathway, the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate pathway
466 and the reductive citric acid cycle. Besides the mapping of the RNA reads to key enzymes
467 of CO₂ fixation pathways, additional evidence for cathode-driven autotrophy comes from
468 an increase in $\delta^{13}\text{C}$ that was only observed in cells from the cathode that was connected
469 to the potentiostat. The isotopic effect seen in the non-connected samples corroborates
470 the metatranscriptomic data, that the Wood-Ljungdahl pathway and the reductive citric
471 acid cycle mainly contribute to microbial CO₂-fixation (35). The fact that no increase in
472 organic carbon compounds could be observed throughout the time span the experiment
473 was conducted, points towards a mixotrophic living of some organisms inside the
474 community. Primary producing microbes are converting CO₂ into reduced carbon
475 compounds from which mixotrophic organisms subsequently feed, providing that an
476 electron acceptor is accessible. Potential electron acceptors, besides the continuously
477 delivered CO₂, that were available to the microorganisms in the electrosynthesis setting
478 were sulfate and small amounts of oxygen that was formed at the anode during
479 hydrolysis. The meta-data showed that all proteins needed for dissimilatory sulfate
480 reduction and oxidative phosphorylation are present.

481 In electroautotrophic experiments conducted with the isolated *Kyrpidia* sp.
482 electroautotrophic growth was observed for the organism. *Kyrpidia* sp. was isolated
483 under microaerophilic conditions, what may be the reason that this species was only
484 minor represented in the initial electroautotrophic enrichment that had only evanescent
485 concentrations of oxygen. Given that oxygen was the limiting factor explains the change
486 in current observed in the electroautotrophic experiments with isolated *Kyrpidia* sp.
487 when using a gas mixture of 99.5% CO₂ and 0.5% O₂.

488 From a taxonomic perspective the three enrichments are promising as electroautotrophy
489 was already shown for members of the Clostridia (6, 36, 38). Nevertheless, the
490 mechanism of electron uptake in these organisms is not understood. Given that electron
491 transfer to an anode was shown for *Thermincola* sp., a member of the *Peptococcaceae*
492 (40), one can assume that representatives of this family may likewise accept electrons
493 from a cathode. The enrichment of *Moorella* sp. under microaerophilic conditions was
494 unexpected as these organisms are described as anaerobes fixing CO₂ via the Wood-
495 Ljungdahl pathway, which is sensitive to oxygen (41). Probably the enriched *Moorella*
496 sp. is aerotolerant, not using O₂ as electron acceptor, but having an advantage over the
497 strictly anaerobic sulfate-reducers enriched in the absence of oxygen. It was shown that
498 *Moorella thermoacetica* is performing CO₂-fixation via the Wood-Ljungdahl pathway in
499 an electrosynthesis setup at -400 mV vs. SHE (6). An estimation on whether the enriched
500 *Thermaerobacter* sp. strain prefers an autotrophic or heterotrophic lifestyle is
501 meaningless, as the 16S of our isolate shares only 88% sequence identity to the next
502 cultivated relative *Thermaerobacter subterraneus*. Looking at organisms related to the
503 enriched species a huge potential can be estimated concerning their being able to
504 perform electrosynthesis. In order to evaluate the performance of distinct organisms in

505 microbial electrosynthesis experiments it is fundamental to isolate individuals from the
506 three mixtures.

507 In summary this work describes an extremophilic electroautotrophic consortium in
508 terms of its microbial composition, its possible mechanisms to obtain energy from the
509 cathode and the pathways involved in CO₂ fixation. Furthermore, we supply the
510 community with metagenomic and metatranscriptomic data that will be useful for
511 future research in this field. The enrichments and the re-cultivation experiment with
512 *Kyrpidia* sp. depict organisms that might be beneficial for a better understanding of
513 microbial electroautotrophy in extremophilic organisms and electroautotrophy in
514 general.

515

516 **References**

- 517 (1) Rabaey K, Girguis P and Nielsen LK Metabolic and practical considerations on
518 microbial electrosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 22:371-377. (2011)
- 519 (2) Olah Ga, Prakash GKS and Goeppert A Anthropogenic chemical carbon cycle for a
520 sustainable future. *J am Chem Soc* 133:12881-12898. (2011)
- 521 (3) Nevin KP, Woodard TL and Franks AE, Summers ZM and Lovley DR Microbial
522 electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and
523 water to multicarbon extracellular organic compounds. *MBio* 1:e00103-e00110.
524 (2010)
- 525 (4) Lovley DR and Nevin KP Electrobiocommodities: powering microbial production
526 of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity. *Curr*
527 *Opin Biotechnol* 24:385-390. (2013)
- 528 (5) Van Eerten-Jansen MCAA, ter Heijne A, Buisman CJN, Hamelers HVM Microbial
529 electrolysis cells for production of methane from CO₂: long term performance
530 and perspectives. *Int J Energy res*, 36(6), 809-819. (2012)
- 531 (6) Nevin KP, Hensley SA, Franks AE, Summers ZM, Ou J, Woodard TL, Snoeyenbos-
532 West OL, Lovley DR Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide
533 is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Appl Environ Microbiol*
534 77 (9), 2882-2886. (2011)
- 535 (7) Thrash JC, Coates JD Review: Direct and indirect electrical stimulation of
536 microbial metabolism. *Environ Sci Technol*, 42(11):3921-3931. (2008)
- 537 (8) Rosenbaum MA, Franks AE Microbial catalysis in bioelectrochemical
538 technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl Microbiol*
539 *Biotechnol*, 98(2):509-518. (2014)
- 540 (9) Sturm-Richter K, Golisch F, Sturm G, Kipf E, Dittrich A, Beblawy S, Kerzenmacher

- 541 S and Gescher J Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via
542 heterologous production of an electron transport chain electrode interaction in
543 microbial electrochemical cells. *Bioresource technology* 186:89-96. (2015)
- 544 (10) Lohner ST, Deutzmann JS, Logan BE, Leigh J, Spormann AM Hydrogenase-
545 independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon
546 *Methanococcus maripaludis*. *ISME J* 8:1673-1681. (2014)
- 547 (11) Gregory KB, Bond DR, Lovley DR Graphite electrodes as electron donors
548 for anaerobic respiration. *Environ Microbiol* 6:596-604. (2004)
- 549 (12) Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, Franks AE, Malvankar NS, Lovley DR
550 Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic
551 coculture of anaerobic bacteria. *Science* 330:1413-1415. (2010)
- 552 (13) Ross DE, Flynn JM, Baron DB, Gralnick JA, Bond DR Towards
553 electrosynthesis in *Shewanella*: energetics of reversing the Mtr pathway for
554 reductive metabolism. *PLoS One* 6:e16649. (2011)
- 555 (14) Deutzmann JS, Sahin M, Spormann AM Extracellular enzymes facilitate
556 electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis. *mBio* 2:e00496-15.
557 (2015)
- 558 (15) Beese-Vasbender PF, Grote J-P, Garrelfs J, Stratman M, Mayrhofer KJ
559 Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine
560 lithotrophic archaeon. *Bioelectrochemistry* 102:50-55. (2015)
- 561 (16) Ishii T, Kawaichi S, Nakagawa H, Hashimoto K and Nakamura R From
562 chemolithoautotrophs to electrolithoautotrophs: CO₂ fixation by Fe(II)-oxidizing
563 bacteria coupled with direct uptake of electrons from solid electron sources
564 *Frontiers in microbiology* 6:994. (2015)
- 565 (17) Summers ZM, Gralnick JA and Bond DR Cultivation of an obligate Fe(II)-

- 566 oxidizing bacterium using electrodes. *mBio*. (2013)
- 567 (18) Bose A, Gardel EJ, Vidoudez C, Parra EA and Girguis PR Electron uptake by
568 iron-oxidizing phototrophic bacteria. *Nature communications*. (2014)
- 569 (19) Pernthaler, A, Pernthaler J, Amann R Sensitive multi-color fluorescence *in*
570 *situ* hybridisation for the identification of environmental microorganisms.
571 *Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition* 3: 711-726. (2004)
- 572 (20) Rasband W S ImageJ. Bethesda, Maryland, USA: National Institutes of
573 Health. (1997 - 2004)
- 574 (21) Herlemann DPR, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson
575 AF Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of
576 the Baltic Sea. *ISME J* 5: 1571–1579. (2011)
- 577 (22) Kubo K, Lloyd KG, Biddle JF, Amann R, Teske A, Knittel K Archaea of the
578 miscellaneous crenarchaeotal group are abundant, diverse and widespread in
579 marine sediments. *ISME J*. 6, 1949–1965, doi:10.1038/ismej.2012.37. (2012)
- 580 (23) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello
581 EK, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.
582 *Nat Methods* 7, 335–336. doi: 10. 1038/nmeth.f.303 PMID: 20383131. (2010)
- 583 (24) Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R
584 PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment.
585 *Bioinformatics* 26, 266-267. (2010)
- 586 (25) DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, *et al.*
587 Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench
588 compatible with ARB. *Appl Environ Microb* 72(7), 5069-5072. (2006)
- 589 (26) Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR Naive Bayesian classifier for rapid
590 assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ*

- 591 Microb 73(16), 5261-5267. (2007)
- 592 (27) Stahl DA and Amann R Development and application of nucleic acid probes
593 In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt & M.
594 Goodfellow (eds). Chichester, UK: Wiley. (1991)
- 595 (28) Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R and Stahl DA
596 Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry
597 for analyzing mixed microbial populations. Appl Environ Microbiol 56: 1919-
598 1925. (1990)
- 599 (29) Yates MD, Siegert M and Logan BE Hydrogen evolution catalyzed by viable
600 and non-viable cells on biocathodes. International Journal of Hydrogen Energy
601 39: 16841-16851. (2014)
- 602 (30) Li H, Opgenorth PH, Wernick DG, Rogers S, Wu TY, Higashide W, *et al.*
603 Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. Science
604 335:1596 10.1126/science.1217643. (2012)
- 605 (31) Kozubal MA, Macur RE, Korf S, Taylor WP, Ackerman GG, Nagy A, Inskeep
606 WP Isolation and distribution of a novel iron-oxidizing crenarchaeon from acidic
607 geothermal springs in Yellowstone National Park. Appl. Environ. Microbiol.
608 74:942-949. 10.1128/AEM.01200-07. (2008)
- 609 (32) Johnson DB, Hallberg KB Carbon, Iron and Sulfur Metabolism in
610 Acidophilic Micro-Organisms, Vol. 54 Bangor, UK: Academic Press, School of
611 Biological Sciences, Bangor University. (2008)
- 612 (33) Fu Q, Fukushima N, Meada H, Sato K and Kobayashi H Bioelectrochemical
613 analysis of a hyperthermophilic microbial fuel cell generating electricity at
614 temperatures above 80°C. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. (2015)
- 615 (34) Peng Y, Leung HCM IDBA-UD: A de novo assembler for single-cell and

616 metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*. (2012)

617 (35) Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hügler M, Alber
618 BE, Fuchs G. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature reviews*.
619 *Microbiology*. (2010)

620 (36) Choi O, Kim T, Woo HM, Um Y. Electricity-driven metabolic shift through
621 direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*.
622 *Scientific Reports*. (2014)

623 (37) Dopson M, Ni G, Sleutels THJA. Possibilities for extremophilic
624 microorganisms in microbial electrochemical systems. *FEMS Microbiology*
625 *Reviews*. (2015)

626 (38) Jeon BY, Jung IL, Park DH. Conversion of carbon dioxide to metabolites by
627 *Clostridium acetobutylicum* KCTC1037 cultivated with electrochemical reducing
628 power. *Advances in Microbiology*. (2012)

629 (39) Marshall CW, May HD. Electrochemical evidence of direct electrode
630 reduction by a thermophilic Gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica*.
631 *Energy and Environmental Science*. (2009)

632 (40) Ragsdale SW. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO₂
633 Fixation. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2009)

634 (41) Wrighton KC, Thrash JC, Melnyk RA, Bigi JP, Byrne-Bailey KG, Remis JP,
635 Schichnes D, Auer M, Chang CJ, Coates JD. Evidence for direct electron transfer by
636 a gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Applied and*
637 *Environmental Microbiology*. (2011)

638
639
640
641
642
643

644 **Figure legends**

645 Figure 1: Development of negative current in the inoculated electrosynthesis reactor (in
646 red) compared to a sterile control (in black). The applied potential was -350 mV vs. SHE.

647 Figure 2: (A/B) CARD-FISH images of microbial cells attached to graphite cathodes. Cells
648 were stained with probes specific for the domain of archaea (ARCH915, Alexa488,
649 green) and bacteria (EUB-I, Alexa546, red). Scale bar 20 μm .

650 Figure 3: SEM images of microorganisms on graphite cathodes. A: Agglomerations of
651 cells between the fibers; scale bar: 10 μm , B: Biofilm on a graphite fiber with rod and
652 cocci shaped cells; scale bar: 1 μm .

653 Figure 4: Microbial community analysis of the inoculum and the biofilm on the cathode.

654 Figure 4: Taxonomic distribution, corresponding to annotated proteins in the
655 metagenome.

656 Figure 5: Iron oxidation mechanisms for different microorganisms. Key proteins with
657 corresponding transcripts are highlighted in red. A *Sideroxydans lithotrophicus*. B
658 *Rhodobacter ferrooxidans*. C *Rhodopseudomonas palustris*. D *Shewanella oneidensis*. E
659 *Acidithiobacillus ferrooxidans*. F *Metallosphaera (Sulfolobales)*.

660 Figure 6: Development of negative current in electrosynthesis experiments with
661 *Kyrpidia* sp. (black) compared to a sterile control (red). The applied potential
662 was -500 mV vs. SHE.

663 Figure 7: Microbial community analysis of the three enrichment cultures.

664

665 **Description of tables:**

666 Table 1: Isolated or enriched organisms with % sequence identity to the next cultivated
667 relative.

668 Table 2: corresponding to figure 4: Distribution of different taxa in the inoculum and the
669 planktonic phase and the cathode after electrochemical incubation.

670 Table 3: Carbon dioxide fixation pathways with corresponding key enzymes and the
671 number of RNA read counts for each pathway.

672 Table 4: Electron uptake mechanisms with corresponding key proteins and the number
673 of RNA read counts for each protein.

674 Table 5: Taxonomic distribution, corresponding to annotated proteins in the
675 metagenome (corresponding to figure 4).

676

677

678

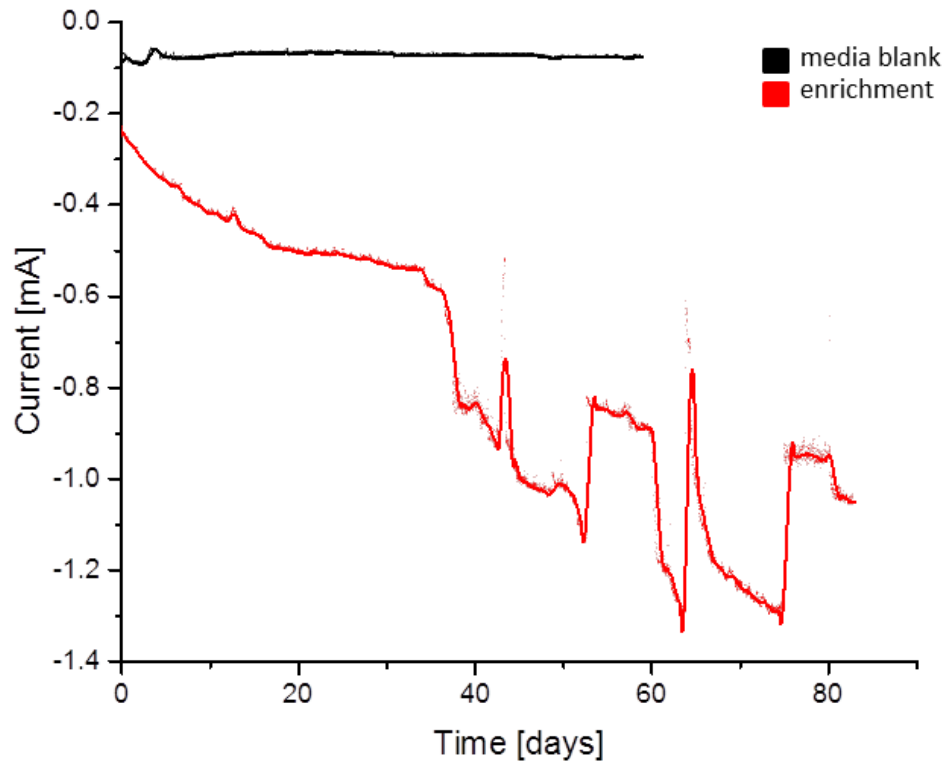
679

680

681

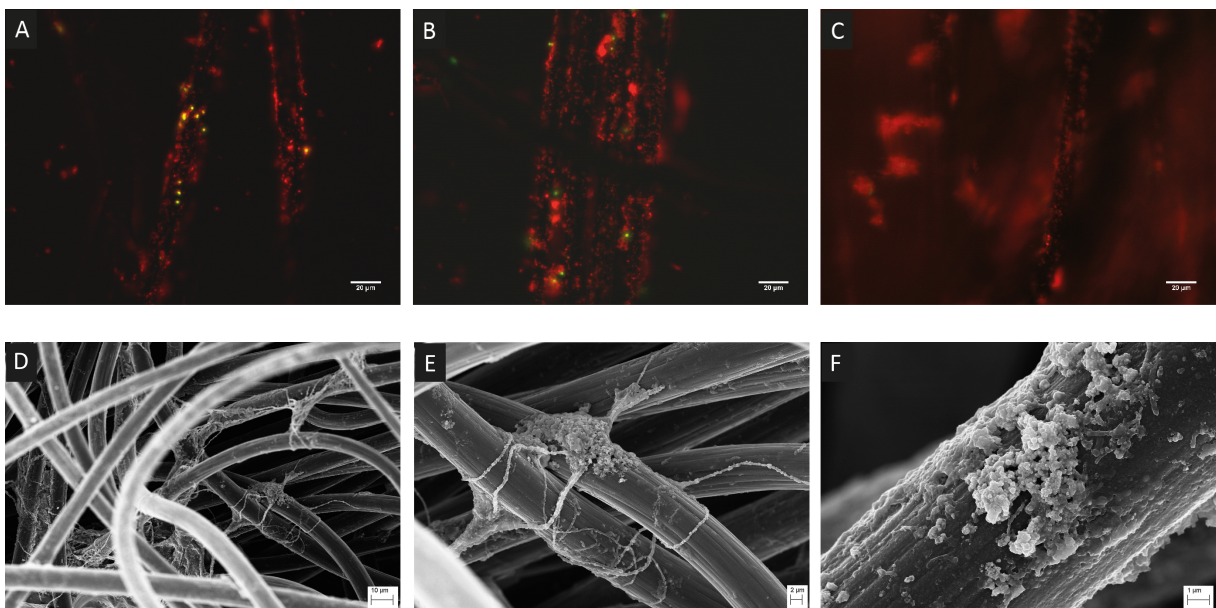
682 **Figures**

683 Figure 1:



684

685 Figure 2:



686

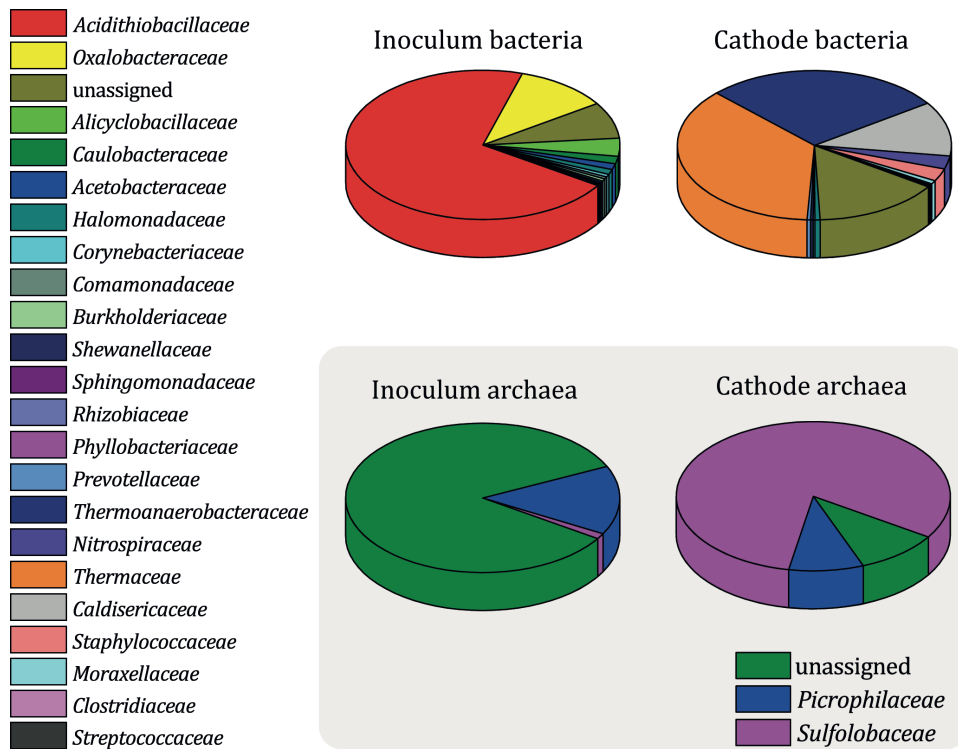
687

688

689

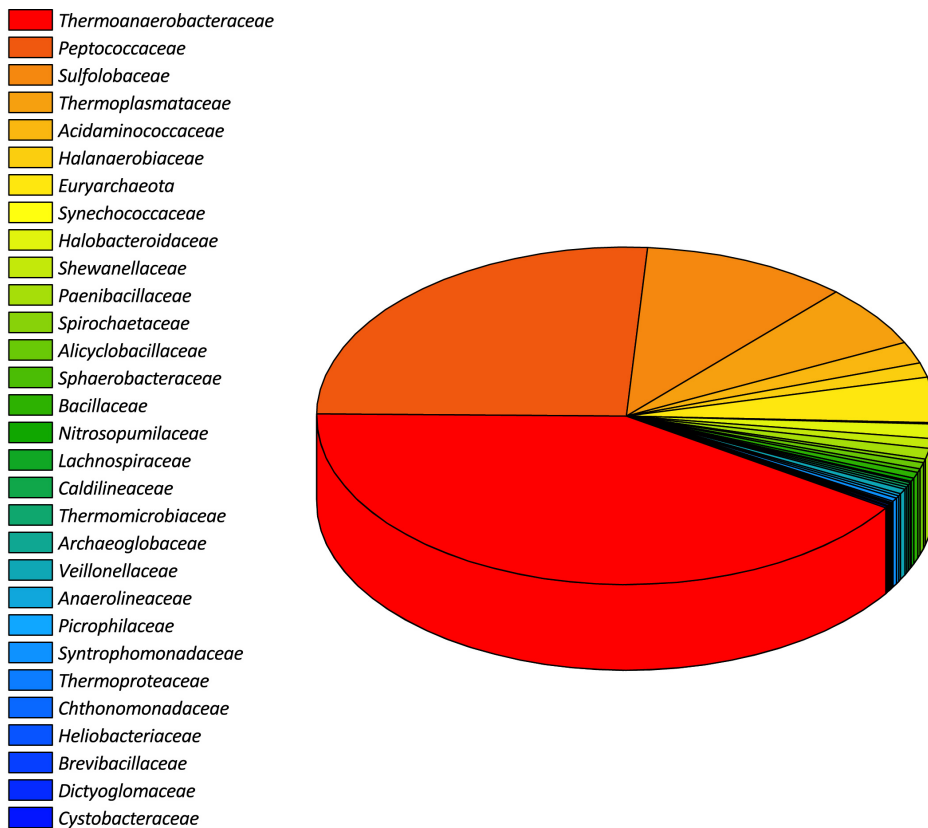
690

691 Figure 3:

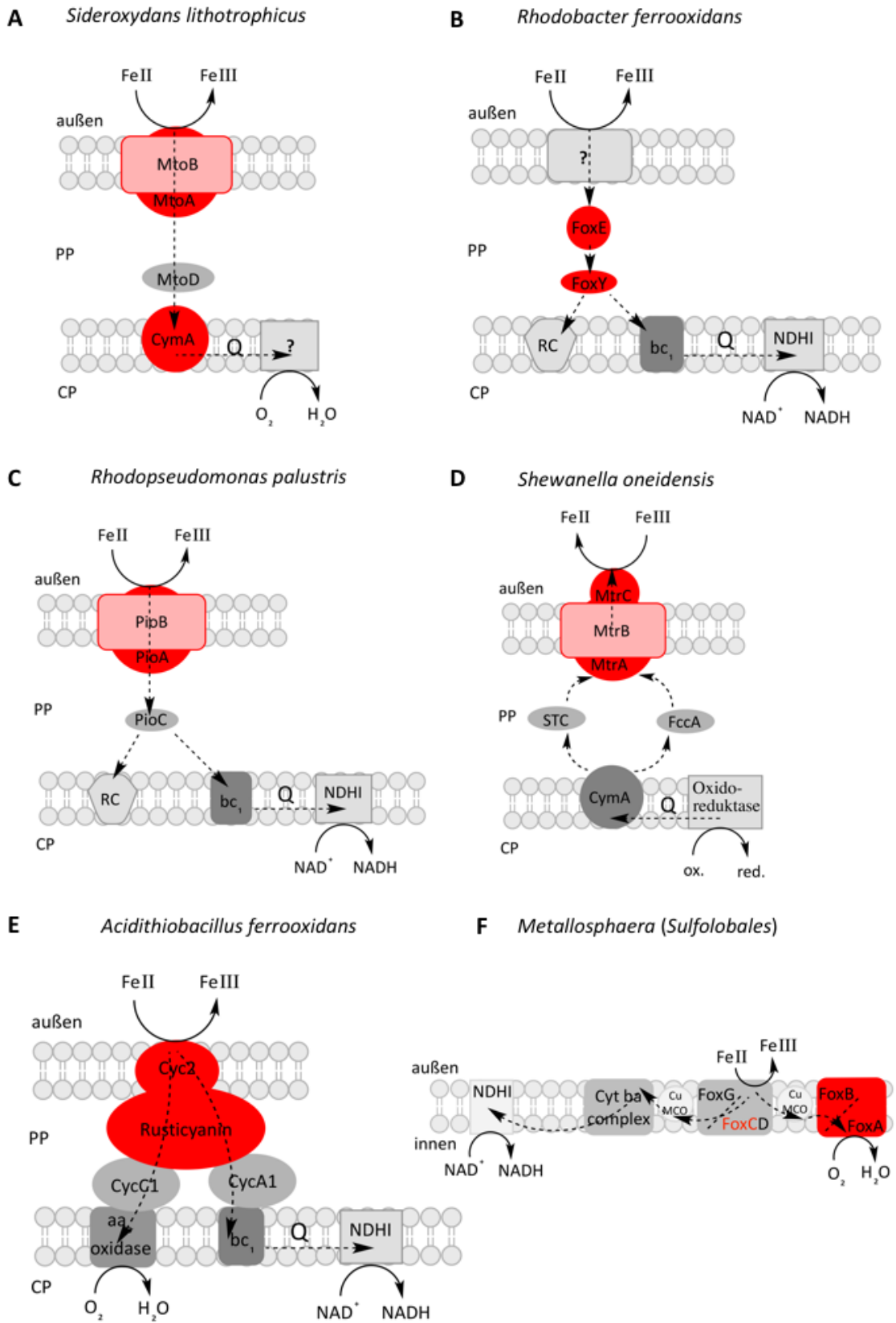


692

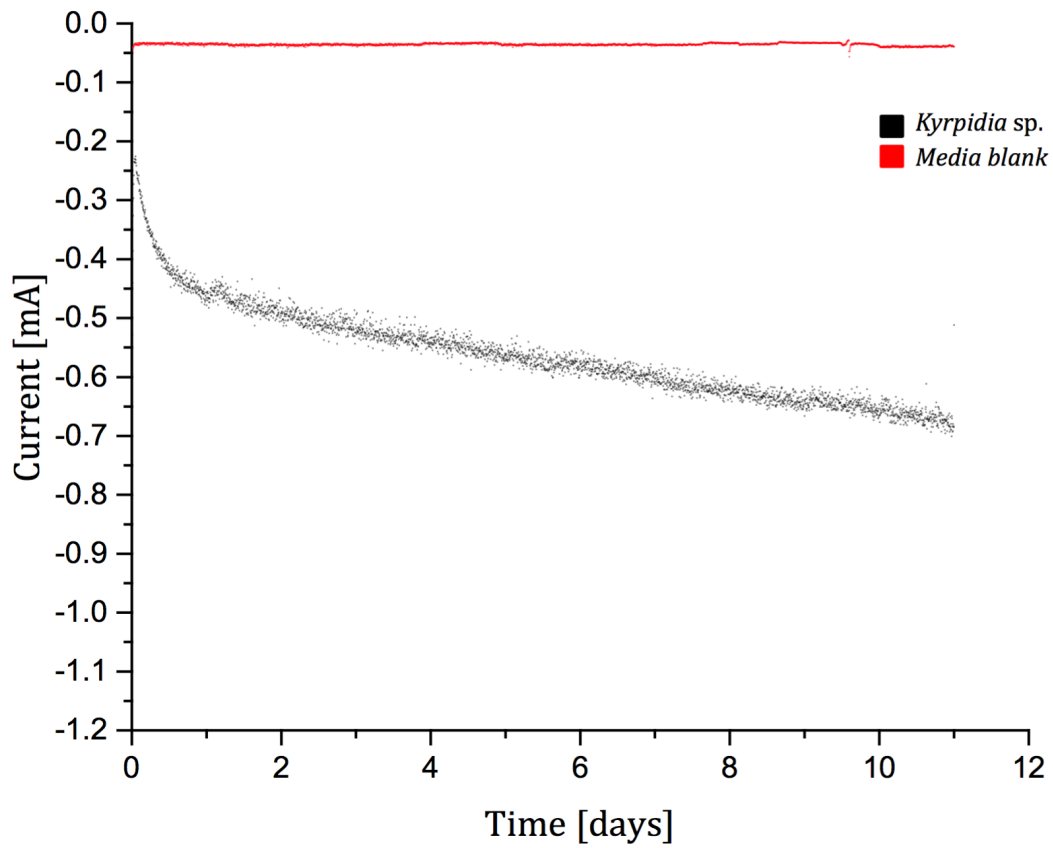
693 Figure 4:



694



698 Figure 6:



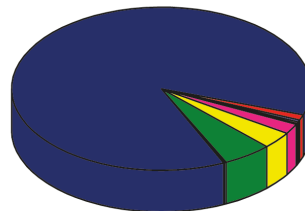
699

700 Figure7:

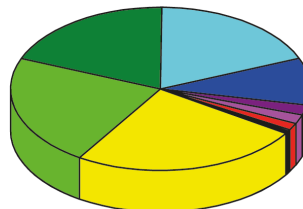
Bacteria

- *Clostridia*
- *Clostridiales*
- unassigned
- *Peptococcaceae*
- *Peptococcaceae_Desulfovirella*
- *Clostridiaceae*
- *Clostridia_other*
- *Thermoanaerobacteraceae_Moorella*
- *Alicyclobacillaceae*
- *Halomonadaceae_Halomonas*
- *Flavobacteriaceae*
- *Shewanellaceae*
- *Staphylococcaceae*
- *Thermoanaerobacteraceae_Thermoanaerobacter*

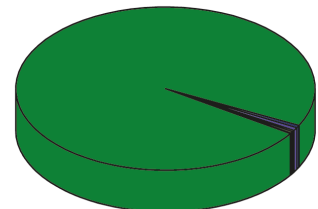
Bacteria Sauerstoff



Bacteria Sulfat



Bacteria Nitrat



701

702

703 Table 1:

| | Next cultivated relative | sequence identity | Enrichment conditions |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|--|
| <i>Kyrpidia</i> sp. | <i>Kyrpidia tusciae</i> DSM2912 | 98% (1458 bp) | pH 6 H ₂ /CO ₂ /O ₂ |
| Uncultured Firmicutes clone | <i>Thermaerobacter subterraneus</i> | 88% (1458 bp) | pH 4 H ₂ /CO ₂ , 2 mM NO ₃ ⁻ |

704

705 Table 2:

| Classification | Inoculum (%) | Cathode (%) |
|--------------------------------|--------------|-------------|
| <i>Acidithiobacillaceae</i> | 70.5 | 0 |
| <i>Oxalobacteraceae</i> | 11 | 0.2 |
| <i>Alicyclobacillaceae</i> | 3.9 | 0 |
| <i>Caulobacteraceae</i> | 1.6 | 0 |
| <i>Acetobacteraceae</i> | 1.3 | 0 |
| <i>Halomonadaceae</i> | 1.1 | 0.6 |
| <i>Corynebacteriaceae</i> | 0.6 | 0.2 |
| <i>Comamonadaceae</i> | 0.5 | 0 |
| <i>Burkholderiaceae</i> | 0.5 | 0 |
| <i>Shewanellaceae</i> | 0.4 | 0.3 |
| <i>Sphingomonadaceae</i> | 0.3 | 0 |
| <i>Phyllobacteriaceae</i> | 0.2 | 0 |
| <i>Rhizobiaceae</i> | 0.2 | 0 |
| * <i>Prevotellaceae</i> | 0 | 0.4 |
| <i>Thermoanaerobacteraceae</i> | 0 | 36.1 |
| <i>Nitrospiraceae</i> | 0 | 27.8 |
| <i>Thermaceae</i> | 0 | 11.7 |
| <i>Caldiseriaceae</i> | 0 | 2.8 |
| <i>Staphylococcaceae</i> | 0 | 2.7 |
| <i>Moraxellaceae</i> | 0 | 0.8 |
| <i>Aquificaceae</i> | 0 | 0.4 |
| <i>Clostridiaceae</i> | 0 | 0.3 |
| <i>Sulfobacillus</i> | 0 | 0.2 |
| <i>Micrococcaceae</i> | 0 | 0.2 |
| <i>Streptococcaceae</i> | 0 | 0.2 |
| <i>Enterobacteraceae</i> | 0 | 0.2 |
| Unassigned | 7.9 | 14.8 |
| <i>Sulfolobaceae</i> | 1.2 | 81.3 |
| ** <i>Picrophilaceae</i> | 14.9 | 8.8 |
| Unassigned | 83.9 | 9.9 |

706 * Reads obtained with bacteria-specific 16S primers. ** Reads obtained with archaeal-
707 specific 16S primers.

708 Table 3:

| CO₂-fixation pathway | Total RNA read counts | comment |
|--|--------------------------------------|---|
| Wood-Ljungdahl-pathway (WL) | 190 | Discrepancy between CO ₂ database and metagenome. |
| 3-hydroxypropionate/ 4-hydroxybutyrate-pathway (3HP/4HB) | 103 | Discrepancy between CO ₂ database and metagenome. Enzyme participates also in dicarboxylate/ 4-hydroxybutyrate-pathway. Metagenome mapping revealed 175 reads for acetyl-CoA-carboxylase (mainly from <i>Acidianus</i>). |
| Dicarboxylate/4-hydroxybutyrate-pathway (Dicarb/4HB) | 85 | Enzyme participates also in dicarboxylate/ 4-hydroxybutyrate-pathway. |
| Reductive Citric acid cycle (rTCA) | 140 | 16 x ATP citrate-lyase |
| Calvin Cycle | 6 | 1 x Rubisco |

709

710 Table 4:

| Electron uptake mechanism | Key protein | RNA read counts |
|---|---|------------------------|
| Formate | Formate dehydrogenase, alpha chain | 44 |
| Hydrogen | Membrane-bound NiFe-hydrogenases | 211 |
| | coenzyme F420-reducing hydrogenase | 59 |
| Direct electron transfer | FoxA (<i>Sulfolobus metallicus</i>) | 162 |
| | FoxB (<i>S. metallicus</i>) | 1 |
| | FoxC (<i>S. metallicus</i>) | 77 |
| | Iro (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>) | 3 |
| | Rusticyanin | 67 |
| | Sulfocyanin | 38 |
| | MtrA/PioA/DmsE | 53 |
| | MtrB/PioB | 224 |
| | MtrC | 8 |
| | Cytochrome c | 140 |
| | Pcch (<i>Geobacter sulfurreducens</i>) | 5 |
| Cytochrome c oxidase (<i>S. solfataricus</i>) | 38 | |

711

712 Table 5:

| Family | Genes (%) |
|--------------------------------|------------------|
| <i>Thermoanaerobacteraceae</i> | 35,1 |
| <i>Peptococcaceae</i> | 22,2 |
| <i>Sulfolobaceae</i> | 9,2 |
| <i>Thermoplasmataceae</i> | 5,1 |
| <i>Euryarchaeota</i> | 3,7 |
| <i>Acidaminococcaceae</i> | 1,8 |
| <i>Halanaerobiaceae</i> | 1,2 |
| <i>Halobacteroidaceae</i> | 1,2 |
| <i>Paenibacillaceae</i> | 0,9 |
| <i>Shewanellaceae</i> | 0,8 |
| <i>Alicyclobacillaceae</i> | 0,5 |
| <i>Bacillaceae</i> | 0,5 |
| <i>Veillonellaceae</i> | 0,4 |
| <i>Spirochaetaceae</i> | 0,3 |
| <i>Sphaerobacteraceae</i> | 0,3 |
| <i>Nitrosopumilaceae</i> | 0,3 |
| <i>Syntrophomonadaceae</i> | 0,3 |
| <i>Caldilineaceae</i> | 0,2 |
| <i>Thermomicrobiaceae</i> | 0,2 |
| <i>Archaeoglobaceae</i> | 0,2 |
| <i>Anaerolineaceae</i> | 0,2 |
| <i>Picrophilaceae</i> | 0,2 |
| <i>Synechococcus</i> | 0,1 |
| <i>Lachnospiraceae</i> | 0,1 |
| <i>Thermoproteaceae</i> | 0,1 |
| <i>Chthonomonadaceae</i> | 0,1 |
| <i>Heliobacteriaceae</i> | 0,1 |
| <i>Brevibacillaceae</i> | 0,1 |
| <i>Dictyoglomaceae</i> | 0,1 |
| <i>Cystobacteraceae</i> | 0,1 |

713

714 Table 6:

| Taxonomy | Bacteria (SO₄²⁻) | Bacteria (O₂) | Bacteria (NO₃⁻) |
|---|---|-------------------------------------|--|
| <i>Clostridia</i> | 24,9 % | 3,4 % | 0,1 % |
| <i>Clostridiales</i> | 22 % | 0 % | 0 % |
| <i>Peptococcaceae</i> | 18,7 % | 0,2 % | 0 % |
| <i>Thermoanaerobacteraceae_Desulfoviregula</i> | 9,3 % | 0,1 % | 0 % |
| <i>Clostridiaceae</i> | 2 % | 0 % | 0 % |
| <i>Clostridia_other</i> | 1,8 % | 0 % | 0 % |
| <i>Thermoanaerobacteraceae_Moorella</i> | 1,4 % | 87 % | 0 % |
| <i>Alicyclobacillaceae</i> | 0,3 % | 0 % | 0 % |
| <i>Halomonadaceae_Halomonas</i> | 0,2 % | 1,1 % | 0,5 % |
| <i>Flavobacteriaceae</i> | 0,1 % | 0,4 % | 0,6 % |
| <i>Shewanellaceae</i> | 0,1 % | 0,3 % | 0,3 % |
| <i>Staphylococcaceae</i> | 0,1 % | 0,2 % | 0,3 % |
| <i>Thermoanaerobacteraceae_Thermoanaerobacter</i> | 0 % | 2 % | 0 % |
| unassigned | 19,1 % | 5,3 % | 98,2 % |

715

1 **Supplementary information:**

2 **Figure legends**

3 Figure S1: General map of São Miguel. Filled squares show the sampling spots. ① *Termas*
4 *da Ferraria*; ② *Central Geothermica Pico Vermelho*; ③ *Caldeira Velha*; ④ *Caldeiras da*
5 *Ribera Grande*; ⑤ *Caldeiras Lagoa das Furnas*; ⑥ *Caldeiras das Furnas*.

6 Figure S2: Schematic drawing of different CO₂-fixation pathways. Key enzymes that were
7 found in the metatranscriptome are highlighted in red. A reductive citric acid cycle.

8 B 3-hydroxypropionate-bicycle C Wood-Ljungdahl-pathway D 3-hydroxypropionate/
9 4-hydroxybutyrate-pathway E Dicarboxylate/4-hydroxybutyrate-pathway

10

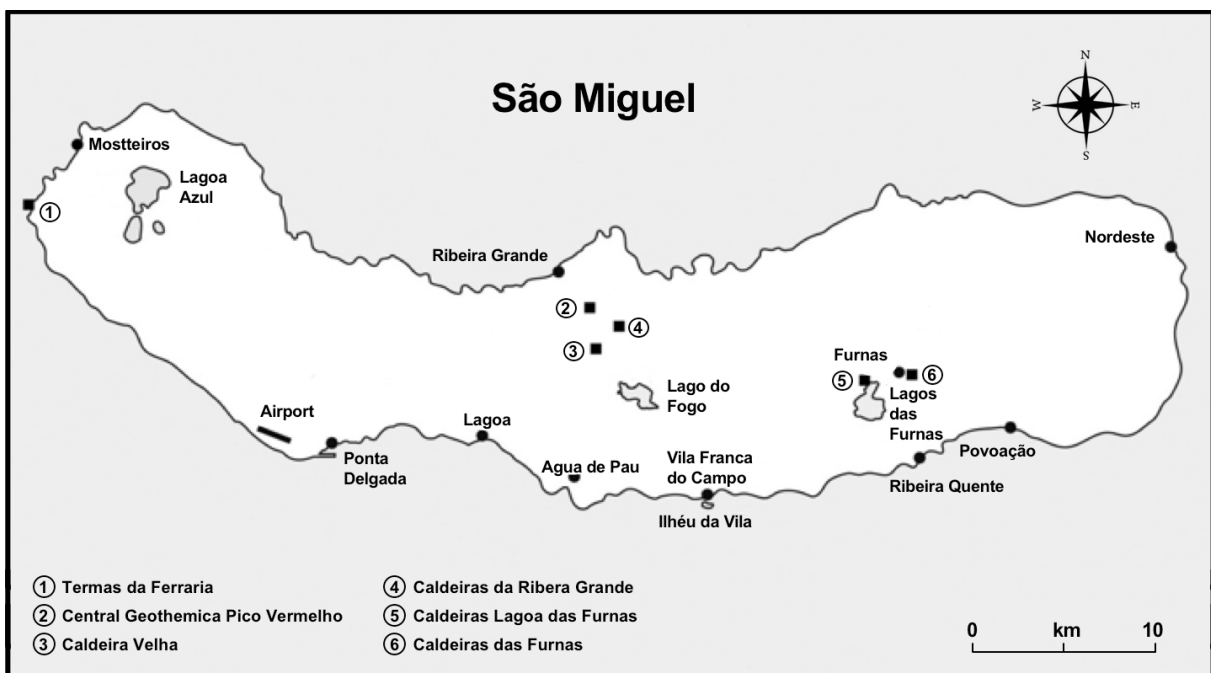
11 **Description of tables**

12 Table S1: Results of the ¹³C-incorporation experiment

13 Table S2: Detailed listing of key enzymes from CO₂-fixation pathways with
14 corresponding number of RNA-transcripts.

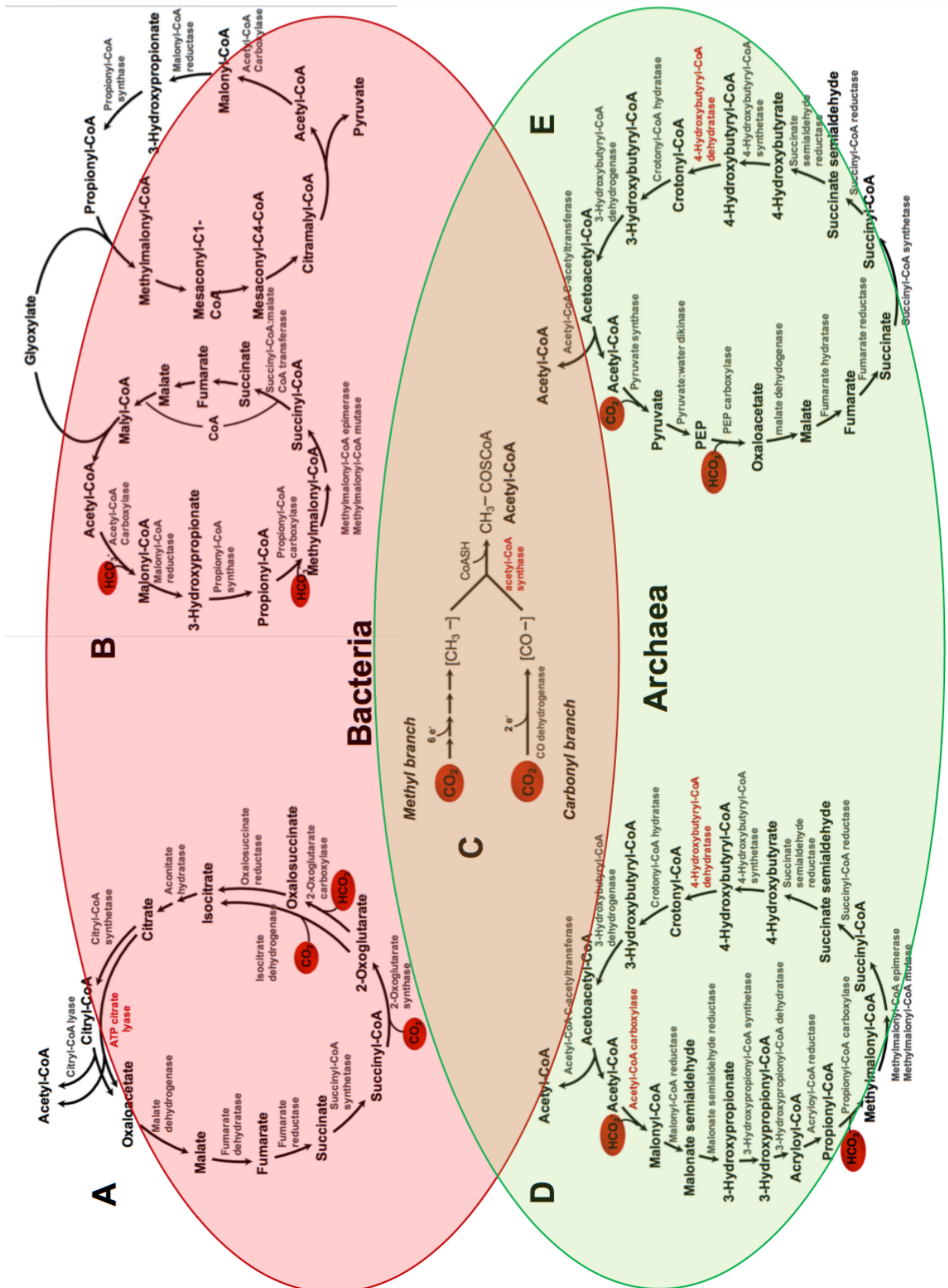
15

16 Figure S1:



17

18 Figure S2:



19

20

21 Table S1:

| Sample | Carbon content (%) | $\delta^{13}\text{C}$ (‰) |
|------------------------------------|--------------------|---------------------------|
| T ₁ (current applied) | 23.2 | -61 |
| T ₁ (no current) | 11.1 | -28.5 |
| T _{end} (current applied) | 10.5 | 226 |
| T _{end} (no current) | 4.29 | -20.1 |

22

23 Table S2:

| Protein (GI) | Number of RNA reads | CO ₂ -fixation pathway | Taxonomy from metagenome |
|---|---------------------|-----------------------------------|---|
| succinyl-CoA synthetase subunit alpha (570725076) | 93 | rTCA | |
| acetyl-CoA synthetase (500595987) | 68 | WL | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (499288428) | 33 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | <i>Acidianus/ Acidianus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (495570718) | 31 | WL | <i>Thermoplasma/ Thermoplasma</i> |
| acetyl-CoA synthetase (497101926) | 21 | WL, 3HP/4HB | <i>Sulfolobus/ Sulfolobus</i> |
| MULTISPECIES: CoA-binding domain protein (505232740) | 18 | rTCA | |
| ATP-citrate lyase/succinyl-CoA ligase (503303113) | 16 | rTCA | |
| Vinylacetyl-CoA delta-isomerase (356641489) | 14 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | <i>Vulcanisaeta/ Acidianus</i> |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (496360681) | 13 | 3HP/4HB, dicarb/4HB | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (850926382) | 13 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | |
| NAD-dependent epimerase/dehydratase:Short-chain dehydrogenase/reductase SDR (494285597) | 12 | WL | |
| acetyl-CoA synthetase (648552728) | 11 | WL | <i>Desulfotomaculum/ Desulfotomaculum</i> |
| acetyl-CoA synthetase (655968805) | 11 | WL | <i>Acetonema/ Thermococcus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (660653233) | 9 | WL, 3HP/4HB | <i>Sulfolobus/ Sulfolobus</i> |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (851188487) | 8 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | |
| acetyl-CoA synthetase (493609584) | 8 | WL | <i>Haliangium/ Desulfatibacillum</i> |

| | | | |
|--|---|------------------------|---|
| acetyl-CoA synthetase (652837222) | 6 | WL, 3HP/4HB | <i>Acidianus/ Acidianus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (648400260) | 5 | WL | <i>Acidianus/ Sulfolobus</i> |
| acetyl-CoA synthetase (501491146) | 5 | WL | |
| phosphoribulokinase (488796584) | 5 | Calvin-Zyklus | |
| ATPase (657724843) | 4 | rTCA | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (503792817) | 3 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | <i>Carboxydothemus/ Thermosinus</i> |
| ATP citrate synthase (674769257) | 3 | rTCA | |
| acetyl-CoA synthetase (646256595) | 2 | WL, 3HP/4HB | <i>Acidianus/ Acidianus</i> |
| AMP-binding enzyme (545377718) | 2 | WL | <i>Caldisphaera/ Thermococcus</i> |
| ATP citrate synthase (655805784) | 2 | rTCA | |
| ATP citrate synthase (675588977) | 2 | rTCA | |
| 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (568210153) | 1 | 3HP/4HB, Dicarb/4HB | |
| acetyl-CoA decarboxylase (493570188) | 1 | WL | |
| acetyl-CoA decarboxylase (506237093) | 1 | WL | |
| acetyl-CoA synthetase (506422366) | 1 | WL | <i>Metallosphaera/ Sulfolobus</i> |
| acyl-CoA synthetase/AMP-acid ligase (505135753) | 1 | 3HPBicyc | <i>Thermoanaerobacterium/ Carboxydothemus</i> |
| acetyl-CoA decarboxylase (503040644) | 1 | WL | |
| ATP citrate lyase (501499910) | 1 | rTCA | |
| ATP citrate synthase (503404062) | 1 | WL | |
| ribulose bisophosphate carboxylase (518331021) | 1 | Calvin-Zyklus | |
| ATP citrate lyase (499677062) | 1 | rTCA | |

Danksagung

Lieber Johannes, an einem sonnigen morgen haben sich unsere Wege in der Gerberau gekreuzt. Keine zwei Monate später fiel ich beim ersten Laborumbau bereits beinahe einer massiven Sterilbank zum Opfer. ... seitdem habe ich so einige Systec-Techniker kommen und gehen sehen ... Du hast mir die Chance gegeben in einer tollen Atmosphäre immer wieder neue Wege zu gehen (bei neuen Methoden, bei der Betreuung kleiner Projekte, wie bei abwechslungsreichen Reisen). Dein Vertrauen, deine Begeisterungsfähigkeit und die ehrliche Kommunikation waren mir dabei immer besonders wichtige Stützen. Danke für die schöne, lehrreiche Zeit und für die vielen unvergesslichen Erfahrungen!

Ein Metagenom und ein Metatranskriptom?! Mit der Unterstützung eines wissbegierigen Bioinformatikers der immer die neuesten Algorithmen zur Hand hat und einem wandelnden Lexikon für CO₂-Fixierung war es uns möglich den Mikroorganismen einige Geheimnisse zu entlocken. Mein Dank an dieser Stelle gilt Dr. Andreas Dötsch und Dr. Michael Hügler für ihre unersetzliche Hilfe bei der Auswertung!

Liebes Labor, Danke für die Unterstützung bei der Arbeit und die Abwechslung zwischendurch. Danke Sibylle fürs anfängliche an die Hand nehmen. Danke Koki für den Spaß. Danke Mimi für die gute Zusammenarbeit morgens vor 9 und die gemeinsamen Sprünge ins kalte Wasser! Danke Gunnar für Geschichten bei Zigaretten und Bier bis zur Sperrstunde und den ein oder anderen Whisky darüber hinaus ;) Danke Fredi für viele leckere Kartoffelgerichte und die technische Unterstützung. Ich hätte mir kein besseres Team wünschen können. Danke Schnubbi für Gleichgewichts- und Konditionstraining und dafür, dass du immer zur richtigen Zeit einfach da bist – mit einem Lied und einem Spruch! Liebe Stöff, du bist ziemlich schnell eine (Bastel-) Freundin geworden. Danke für den Einblick ins Pfälzer Weinsortiment und dass ich mit dir sprachliches Neuland betreten durfte. Danke Sebastian für kritischen Kaffee, tröstende Tomatensuppe, multiple Mantras und viele taugliche Tipps. Cara Francesca, grazie per ridere insieme a guardare Trash i ascoltare Marcus parlare delle Sitzbeinhöcker, e per l'oglio.

Ich danke allen Praktikanten, Bachelor-, Master-, Diplomstudis und der Lehramsel für ihre Unterstützung, bei der Bearbeitung von Teilprojekten, die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Ein großer Dank gilt all meinen Freunden für die treue Begleitung über die Zeit und den Spaß außerhalb des Laborlebens. Besonderes Danke an Bea (für soooo viel), Ela (für uns), Laura (meine Leidensgenossin), Flo (für Musik und Verständnis), Kathi (für Sterneküche beim Schreiben), Mali (für Lilly), Taschi („im russischen sagt man ...“), Mika (für die schnelle Hilfe) und der LVF (für das zweite Zuhause).

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Liebste Mutti, Liebster Paps, Danke für eure bedingungslose Unterstützung bei all meinen Entscheidungen, für das Verständnis und Vertrauen das ihr in mich habt, für eure unersetzliche Hilfe durch Rat und Tat und für das beste Zuhause. Liebster Brudi, danke für all die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse an unterschiedlichsten Orten. Mit dir Zeit zu verbringen ist immer eine schöne Abwechslung. Danke, dass ihr mein Ruhepol seid!