

Entwicklung bioelektrochemischer Systeme für die Untersuchung von elektrodenabhängigen Konversionsprozessen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von

Frederik Golitsch

aus

Villingen-Schwenningen

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.16

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass ich die folgende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle Teile, die wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KITs beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2011 bis April 2016 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe, den 31.10.2016

Frederik Golitsch

Publikationen

Fachzeitschriften

Golitsch, F., Bücking, C., and Gescher, J. (2013). Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 285–291.

Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., and Gescher, J. (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, 89–96.

Patentschriften

BUECKING CLEMENS [DE]; GOLITSCH FREDERIK [DE]; GESCHER JOHANNES [DE] - EP2706120 (A1) – 2014-03-12 - Biosensor comprising a mtr-gene construct; application number: EP20120183209 20120905.

Kongressbeiträge

Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., and Gescher, J. (2014). Heterologous production of an electron transport chain and electrode-interaction in microbial electro-chemical cells enables *Escherichia coli* to perform unbalanced fermentation.

Vortrag, Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jahrestagung 2014, 05.-08.10.2014, Dresden, Deutschland.

Golitsch, F., Bücking, C., and Gescher, J. (2013). Proof of principle for a microbial fuel cell biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes.

Vortrag, Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jahrestagung 2013, 10.-13.03.2013, Bremen, Deutschland.

Golitsch, F., Bücking, C., and Gescher, J. (2013). An engineered biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes – a proof of principle.

Posterpräsentation, 4th international microbial fuel cell conference, 01.-04.09.2013, Cairns, Australien.

Jahreskonferenz der Innovationsallianz ZeroCarbFP – Teilprogramm Additives 2 - Teilvorhaben Einsatz mikrobieller Brennstoffzellen in der Abwasseraufbereitung.

Vortrag, September 2015, Dortmund, Deutschland.

Zusammenfassung

Im Zeichen einer immer weiter voranschreitenden Klimaerwärmung, einer wachsenden Weltbevölkerung und immer knapper werdenden Ressourcen, sieht sich die Weltgemeinschaft mit einer großen Herausforderung konfrontiert. Bei der Eindämmung der globalen Erwärmung und der, mit ihr in Verbindung stehenden, Emission von Treibhausgasen, scheint vor allem die Nutzung neuer Technologien zielführend zu sein. In diesem Zusammenhang steht insbesondere die Energiegewinnung aus regenerativen Quellen im Fokus. Ein genauso wichtiges, wenn auch in der Öffentlichkeit nicht so stark wahrgenommenes, Feld ist die Bereitstellung alternativer, nicht erdölbasierter Rohstoffe für die verarbeitende Industrie. Hierbei ist die Nutzung von Abfallströmen als Ressource ein vielversprechender Ansatz. Dabei scheinen sog. bioelektrochemische Systeme ein großes Potential zu besitzen. Diese Systeme sind in der Lage, mithilfe von Mikroorganismen, chemische Energie direkt in elektrische oder elektrische direkt in chemische Energie umzuwandeln. Für die Nutzung dieser, als exoelektrogen bzw. elektrotroph bezeichnete Organismen, werden verschiedene Formen von bioelektrochemischen Systemen benötigt.

In diesem Zusammenhang wurden im ersten Teil der Arbeit zunächst drei dieser Systeme entwickelt, von denen zwei für eine definierte Untersuchung von Mikroben-Elektrodeninteraktionen vorgesehen waren. Diese werden auch als mikrobielle 3-Elektrodenzelle bezeichnet. Das dritte System sollte die Behandlung von kommunalem Abwasser an die Erzeugung von Elektrizität koppeln.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte dieses letztgenannte bioelektrochemische System in zwei Versuchsphasen charakterisiert werden. In der ersten Phase wurde im Labor dessen prinzipielle Funktionsfähigkeit mit synthetischem Abwasser untersucht. Daraufhin folgte die zweite Phase, in welcher das System in einem Klärwerk unter realitätsnahen Bedingungen betrieben wurde. In beiden Versuchsphasen wurden organische Kohlenstoffverbindungen eliminiert und in diesem Zusammenhang elektrischer Strom generiert. Dabei lag die erreichte mittlere Stromdichte in der zweiten Phase fast viermal höher als im ersten Versuchsabschnitt. Weiterhin war die absolute Eliminierung organischen Kohlenstoffs in beiden Versuchsphasen sehr verschieden, obwohl die prozentuale Eliminierungsleistung mit etwa 40 % vergleichbare Werte zeigt. Im Gegensatz dazu konnte in beiden Fällen keine oder nur eine sehr geringe Stickstoffeliminierung festgestellt werden. Folglich konnte die prinzipielle Funktionalität des

Systems nur im Bezug auf die Generierung eines elektrischen Stromes und den Abbau von organischen Kohlenstoffverbindungen gezeigt werden.

Der letzte Teil der Arbeit zielte auf eine Steigerung der Elektronenaufnahmekapazität des Nichtschwefelpurpurbakteriums *Rhodobacter sphaeroides* ab. Dadurch sollte dieser Organismus in die Lage versetzt werden, eine Kathode als einzigen Elektronendonator zu nutzen. Ein großer Vorteil von *R. sphaeroides* ist hierbei, dass er über einen vielfältigen Stoffwechsel und eine gute genetische Zugänglichkeit verfügt. Daher bietet dieser Organismus eine gute Basis für einen möglichen späteren Produktionsstamm. Um eine Verbesserung der elektrotrophen Eigenschaften bei *R. sphaeroides* zu erreichen, wurden Teile einer sog. verlängerten Elektronentransportkette des γ -Proteobakteriums *Shewanella oneidensis* in den Organismus eingebracht. Dabei sollten die beiden *c*-Typ Cytochrome CymA (cytoplasmatic membrane protein A) und STC (small tetraheme cytochrome eine entscheidende Rolle spielen, indem sie den Elektronentransport von der Zelloberfläche durch das Periplasma in den Chinonpool der Cytoplasmamembran verbessern. Zunächst wurde in diesem Zusammenhang die Expression der beiden Komponenten in *R. sphaeroides* untersucht. Dabei konnte ein Stamm generiert werden, der CymA und STC exprimiert, wohingegen in einem zweiten Stamm nur die Expression von STC nachweisbar war. Diese beiden Stämme wurden im Anschluss in einer der, zu Beginn entwickelten, mikrobiellen-3-Elektrodenzellen mit dem Wildtyp verglichen. Dabei konnte bei dem Stamm, der beide Cytochrome exprimiert, eine mehr als achtfache Steigerung der Elektronenaufnahme gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden. Auch der STC-exprimierende Stamm zeigte eine leichte Steigerung des Stromflusses von der Kathode, wobei dieser auf die Lyse von Zellen zurückgeführt werden konnte. Folglich konnte gezeigt werden, dass durch die Expression der *c*-Typ Cytochrome CymA und STC aus *S. oneidensis*, die elektrotrophen Eigenschaften von *R. sphaeroides* deutlich verbessert werden konnten.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Bioelektrochemische Grundlagen	2
1.1	Definition bioelektrochemischer Prozesse.....	2
1.2	Grundlagen für die Nutzung mikrobieller elektrochemischer Technologien	3
1.3	Extrazellulärer Elektronentransfer	4
2	Bioelektrochemische Systeme.....	13
2.1	Mikrobielle Brennstoffzellen	13
2.2	Mikrobielle Elektrosynthese	15
2.3	Weitere Konzepte von bioelektrochemischen Systemen.....	16
3	Mikrobielle Brennstoffzellen in der Abwasserbehandlung.....	18
3.1	Konventionelle Abwasserbehandlung	18
3.2	Einsatz mikrobieller Brennstoffzellen als biologische Reinigungsstufe.....	20
4	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	24
4.1	Anoxygene Photosynthese	25
5	Zielsetzung	26
II	Material und Methoden	28
1	Mikroorganismen und Plasmide.....	28
2	Chemikalien	32
3	Kultivierung von Mikroorganismen und Stammkulturhaltung	32
3.1	Kulturmedien	32
3.2	Kultivierung und Zellernte.....	41
3.3	Stammkonservierung	44
4	Molekularbiologische Methoden.....	44
4.1	DNA-Isolierung und Aufreinigung.....	44

4.2	Amplifikation von DNA	45
4.3	DNA-Quantifizierung	48
4.4	Klonierungstechniken	48
4.5	Transformationstechniken	51
4.6	Sequenzierungen	52
4.7	Generierung eines Codon-optimierten, synthetischen DNA-Fragments	53
4.8	Herstellung der verwendeten Expressionsplasmide.....	54
5	Elektrophoretische Methoden.....	61
5.1	Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen.....	61
5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	62
6	Zellaufschluss.....	64
6.1	Präparation der periplasmatischen Fraktion.....	64
6.2	Präparation der Membranfraktion.....	65
7	Bestimmung des Proteingehalts	65
8	Färbemethoden	66
8.1	Anfärben von Hämgruppen.....	66
8.2	Coomassie-Färbung	66
9	Western Blotting	67
10	Immunodetektion	68
11	Analyse der Gesamtkonzentration an organischen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen.....	69
12	Konstruktions-Werkzeuge und verwendete Materialien.....	70
13	Bioelektrochemische Systeme.....	75
13.1	BES für die Abwasserbehandlung	75
13.2	M3C für die Untersuchung der Elektrotrophie von optimierten <i>R. sphaeroides</i> -Stämmen.....	78

III	Ergebnisse	81
1	Entwicklung neuer bioelektrochemischer Systeme.....	81
1.1	Entwicklung einer vielseitig einsetzbaren mikrobiellen 3-Elektrodenzelle.....	82
1.2	Entwicklung eines BES für die Abwasserbehandlung.....	93
2	Charakterisierung des entwickelten BES für die Abwasserbehandlung	101
2.1	Charakterisierung der ersten Betriebsphase mit synthetischem Abwasser	102
2.2	Charakterisierung der zweiten Betriebsphase mit kommunalem Abwasser	107
3	Generierung und Charakterisierung eines elektrotrophen <i>R. sphaeroides</i> -Stammes. 112	
3.1	Einbringung und Expression EET-assoziiertes <i>c</i> -Typ Cytochrome in <i>R. sphaeroides</i>	113
3.2	Einfluss EET-assoziiertes <i>c</i> -Typ Cytochrome auf die bioelektrochemischen Eigenschaften von <i>R. sphaeroides</i>	120
IV	Diskussion	126
1	Entwicklung neuer bioelektrochemischer Systeme.....	126
1.1	Entwicklung einer vielseitig einsetzbaren mikrobiellen 3-Elektrodenzelle.....	126
1.2	Entwicklung eines BES für die Abwasserbehandlung.....	131
2	Charakterisierung des entwickelten BES für die Abwasserbehandlung	135
2.1	Charakterisierung der ersten Betriebsphase mit synthetischem Abwasser	135
2.2	Charakterisierung der zweiten Betriebsphase mit kommunalem Abwasser	139
3	Generierung und Charakterisierung eines elektrotrophen <i>R. sphaeroides</i> -Stammes. 142	
3.1	Einbringung und Expression EET-assoziiertes <i>c</i> -Typ Cytochrome in <i>R. sphaeroides</i>	143
3.2	Einfluss EET-assoziiertes <i>c</i> -Typ Cytochrome auf die bioelektrochemischen Eigenschaften von <i>R. sphaeroides</i>	147

V	Ausblick	152
1	Entwicklung neuer bioelektrochemischer Systeme.....	152
2	Charakterisierung des entwickelten BES für die Abwasserbehandlung	153
3	Generierung und Charakterisierung eines elektrotrophen <i>R. sphaeroides</i> -Stammes.	153
VI	Referenzen.....	155
VII	Anhang	171
1	Generierung eines Codon-optimierten, synthetischen DNA-Fragments.....	171
2	Technische Zeichnungen der entwickelten BES	179
2.1	M3C mit 2000 ml Arbeitsvolumen (Version A).....	179
2.2	M3C mit 280 ml Arbeitsvolumen (Version B)	190
3	Analysedaten des Vorklärungsablaufs (EMG).....	255
	Danksagung.....	261

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ÄM	äußere Membran
BES	bioelektrochemisches System
CAD	<i>computer aided design</i> = rechnergestützte Konstruktion
CM	Cytoplasmamembran
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
CymA	<i>cytoplasmic membrane protein A</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	extrazellulärer Elektronentransfer
EMG	Emscher Genossenschaft
FccA	<i>flavocytochrome A</i>
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
M3C	mikrobielle 3-Elektrodenzelle
MEC	mikrobielle Elektrolysezelle
MES	mikrobielle Elektrosynthese
MET	mikrobielle elektrochemische Technologie
MFC	<i>microbial fuel cell</i> = mikrobielle Brennstoffzelle
Mtr	<i>metal reducing protein</i>
	Erklärung

Abkürzung	
OmcA	<i>outer membrane cytochrome A</i>
PC	Polycarbonat
PEM	protonenpermeable Membran
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Periplasma
PTFE	Polytetraflourethylen
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHE	<i>standard hydrogen electrode</i> = Standard Wasserstoffelektrode
SND	simultane Nitrifikation und Denitrifikation
STC	<i>small tetraheme cytochrome</i>
TC	<i>total carbon</i> = Gesamtkohlenstoffgehalt
TIC	<i>Total inorganic carbon</i> = Gesamtgehalt anorganischen Kohlenstoffs
TN	<i>total nitrogen</i> = Gesamtstickstoffgehalt
TOC	<i>total organic carbon</i> = Gesamtgehalt organischen Kohlenstoffs
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der verlängerten Atmungskette von <i>S. oneidensis</i>	6
Abb. 2: Extrazellulärer Elektronentransfer auf eine Anode.	7
Abb. 3: Extrazellulärer Elektronentransfer von einer Kathode.	10
Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer mikrobiellen Brennstoffzelle. ..	13
Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer mikrobiellen Elektrosynthesezelle.	15
Abb. 6: Vereinfachtes Schema eines kommunalen Klärwerks.	18
Abb. 7: Vereinfachtes Schema für den Einsatz einer mikrobiellen Brennstoffzelle in einem kommunalen Klärwerk.	21
Abb. 8: Summenformel der beiden an der SND beteiligten Reaktionen.	23
Abb. 9: Schematische Darstellung des zyklischen Elektronentransports während der anoxygenen Photosynthese in <i>R. sphaeroides</i>	26
Abb. 10: Schema einer Fusions-PCR.	50
Abb. 11: Schema einer inversen Plasmid-PCR.	51
Abb. 12: Klonierungsstrategie a) pIND4- <i>cymA-stc</i> -His optimiert.	55
Abb. 13: Klonierungsstrategie pSCVAM- <i>cymA</i> -His _{C-terminal} - <i>stc</i> -His _{C-terminal}	57
Abb. 14: Klonierungsstrategie pSCVAM- <i>cymA-stc</i>	59
Abb. 15: Klonierungsstrategie pPUC- <i>cymA-stc</i> , pPUC- <i>cymA-stc</i> -His, pIND4- <i>cymA-stc</i> & pIND4- <i>cymA-stc</i> -His.	60
Abb. 16: Fertiggestellter Aufbau des BES zur Abwasseraufbereitung.	75
Abb. 17: Verschaltungsschema des Reaktors (3-Elektrodenmodus).	76
Abb. 18: Kompletter Versuchsaufbau des 280 ml BES mit <i>R. sphaeroides</i>	79
Abb. 19: Formeln für die Berechnung der mittleren Stromstärke über den gesamten Versuchszeitraum.	80
Abb. 20: Explosionsdarstellung des Zylinderdeckels.	82
Abb. 21: Explosionsdarstellung der Integration eines Messelements in den Zylinderdeckel. .	83
Abb. 22: Explosionsdarstellung des Arbeitselektrodenhalters.	84
Abb. 23: CAD-Modelle des Zylinderdeckels in zwei verschiedenen 3-Elektroden- Konfigurationen.	85
Abb. 24: Zusammengesetzte 2000 ml M3C (Version A) in einfacher 3-Elektroden- Konfiguration.	86

Abb. 25: Explosionsdarstellung des verbesserten Arbeitselektrodenhalters.....	87
Abb. 26: Explosionsdarstellung des verbesserten Gegenelektrodenhalters.	88
Abb. 27: Explosionsdarstellung des kompletten Gegenelektrodenkompartiments.....	89
Abb. 28: Explosionsdarstellung des Bezugselektrodenhalters.....	90
Abb. 29: Explosionsdarstellung des Zylinderdeckels mit allen Komponenten.	91
Abb. 30: Zusammengesetzte 280 ml M3C (Version B).....	92
Abb. 31: Explosionsdarstellung des Grundkörpers des BES für die Abwasserbehandlung. ...	94
Abb. 32: Schema des Aufbaus der mäanderförmigen Trennwand.....	94
Abb. 33: Explosionsdarstellung des Elektrodenhalters.....	95
Abb. 34: Explosionsdarstellung des Aufbaus einer einzelnen Mäanderschleife.	96
Abb. 35: Partielle Explosionsdarstellung des Grundkörpers mit eingebauten Elektroden.	97
Abb. 36: Explosionsdarstellung des Deckels.	99
Abb. 37: Darstellung des kompletten BES für die Abwasserbehandlung.....	99
Abb. 38: Darstellung des gesamten Aufbaus.	100
Abb. 39: Zeitlicher Verlauf der Stromdichte des Abwasser-BES (Versuchsphase I).....	103
Abb. 40: Zeitlicher Verlauf der TOC-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase I).	104
Abb. 41: Zeitlicher Verlauf der TN-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase I)..	105
Abb. 42: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes des Abwasser-BES (Versuchsphase I).....	106
Abb. 43: Zeitlicher Verlauf der Stromdichte des Abwasser-BES (Versuchsphase II).	107
Abb. 44: Zeitlicher Verlauf der TOC-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase II).	108
Abb. 45: Zeitlicher Verlauf der TN-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase II).	109
Abb. 46: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes des Abwasser-BES (Versuchsphase II).	110
Abb. 47: Vergleich der absoluten und prozentualen Werte der mittleren TOC-Eliminierung in den beiden Versuchsphasen.	111
Abb. 48: Expressionsmuster der Membran- und der Periplasmafraktionen von <i>R. sphaeroides</i> WT, pIND4 <i>cymA-stc</i> (JG963) & pIND4 <i>cymA-stc</i> -His (JG964) unter chemoorganoheterotrophen Bedingungen.	114
Abb. 49: Hämgruppenfärbung der Membran- (a) und der Periplasmafraktionen (b) von <i>R. sphaeroides</i> WT, pIND4 <i>cymA-stc</i> (JG963) & pIND4 <i>cymA-stc</i> -His (JG964) unter photoorganoheterotrophen Bedingungen.	116

Abb. 50: Westernblot der Membran- und der Periplasmafraktionen von <i>R. sphaeroides</i> WT, pIND4 <i>cymA-stc</i> (JG963) & pIND4 <i>cymA-stc</i> -His (JG964) unter photoorganoheterotrophen Bedingungen.	117
Abb. 51: Expressionsmuster der Membran- und der Periplasmafraktionen von <i>R. sphaeroides</i> WT, pPUC <i>cymA-stc</i> (JG965) & pPUC <i>cymA-stc</i> -His (JG966) unter photoorganoheterotrophen Bedingungen.	119
Abb. 52: Erreichte mittlere Stromdichte von <i>R. sphaeroides</i> WT (JG582), pIND4- <i>cymA-stc</i> (JG963) & pPUC- <i>cymA-stc</i> -His (JG966) im Vergleich zur Medienkontrolle in einer M3C.....	121
Abb. 53: Zeitlicher Verlauf des Betrages der Stromdichte von <i>R. sphaeroides</i> WT (JG582), pIND4- <i>cymA-stc</i> (JG963) und pPUC- <i>cymA-stc</i> -His (JG966) in einer M3C.	122
Abb. 54: Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte von <i>R. sphaeroides</i> WT (JG582), pIND4- <i>cymA-stc</i> (JG963) und pPUC- <i>cymA-stc</i> -His (JG966) in einer M3C.	123
Abb. 55: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes von <i>R. sphaeroides</i> WT (JG582), pIND4- <i>cymA-stc</i> (JG963) und pPUC- <i>cymA-stc</i> -His (JG966) in einer M3C.....	124
Abb. 56: Modell der CymA & STC abhängigen Elektrotrophie in <i>R. sphaeroides</i>	150

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.	28
Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.	30
Tab. 3: Zusammensetzung der Medien zur aeroben Kultivierung verschiedener Stämme.....	33
Tab. 4: Zusammensetzung der 100-fach konzentrierten Spurenelementlösung für <i>R. sphaeroides</i>	33
Tab. 5: Zusammensetzung der Vitaminlösungen für <i>R. sphaeroides</i>	34
Tab. 6: Zusammensetzung des Kulturmediums für <i>G. sulfurreducens</i>	36
Tab. 7: Zusammensetzung der der 100-fach konzentrierten NB-Spurenelemente.	37
Tab. 8: Zusammensetzung der 1000-fach konzentrierten Selenit-Wolframat-Lösung	37
Tab. 9: Zusammensetzung der 100-fach konzentrierten GS-Vitaminlösung.	38
Tab. 10: Zusammensetzung des Eisencitrat-Mediums	39
Tab. 11: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers (abgewandelt nach DIN 11733)...	40
Tab. 12: Zusammensetzung des RS-PLA-Mediums.	41
Tab. 13: Zusammensetzung des Resuspensionspuffers.	43
Tab. 14: Zusammensetzung des „Quick-xDNA-Preparation“ Puffers.....	45
Tab. 15: Als Primer verwendete Oligonukleotide.....	46
Tab. 16: Standard-PCR-Ansätze.	47
Tab. 17: Thermocycler-Standardprotokolle.	47
Tab. 18: Zusammensetzung der Standard-Restriktions- und Ligationsansätze.	49
Tab. 19: Fusions-PCR-Ansätze.	50
Tab. 20: Zusammensetzung des Agarosegel-Elektrophorese-Puffers.....	61
Tab. 21: Zusammensetzung des Trenngels 15 % (w/v), Volumina für 4 Gele.	62
Tab. 22: Zusammensetzung des Sammelgels 4 % (w/v), Volumina für 4 Gele.....	63
Tab. 23: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamid-Elektrophorese-Puffer.	64
Tab. 24: Zusammensetzung der Bradford-Reagenz.	66
Tab. 25: Zusammensetzung der Lösungen zur Hämgruppen-Färbung eines SDS-Gels.....	67
Tab. 26: Zusammensetzung der Blotting-Puffers.	67
Tab. 27: Zusammensetzung der Immunodetektions-Waschlösungen.....	69
Tab. 28: Für die feinmechanische Verarbeitung verwendete Rohmaterialien.	71
Tab. 29: Für die BES verwendete Fertigungskomponenten.	72

I Einleitung

Bedingt durch eine immer weiter voranschreitende Globalisierung, befindet sich die Weltgemeinschaft in einer äußerst herausfordernden Situation. So sieht sie sich mit einem fortschreitenden Klimawandel, einer wachsenden Weltbevölkerung und immer knapper werdenden fossilen Ressourcen konfrontiert (International Energy Agency, 2013; IPCC, 2013; United Nations ESA Population Division, 2015). Für die Eindämmung der globalen Erwärmung und die mit ihr verbundenen Emission von Treibhausgasen, scheint vor allem die Nutzung neuer Technologien zielführend zu sein. Neben einer Optimierung der Energieeffizienz bestehender Prozesse, werden vor allem massive Investitionen im Bereich der regenerativen Energiegewinnung benötigt, um das von der UN gesetzte Ziel der Beschränkung der Erderwärmung um 1,5 - 2 °C im Vergleich zum vorindustriellen Zeitalter zu erreichen (International Energy Agency, 2015; United Nations FCCC, 2015).

Abseits der Wasser-, Wind- und Solarenergie spielen auch biotechnologische Verfahren eine zunehmend wichtigere Rolle. So wurden beispielsweise 2011 schon 10,6 % der gesamten elektrischen Energie aus regenerativen Quellen mittels Biomasse gewonnen. Weiterhin wurden 2 % des Kraftstoffbedarfs im Straßenverkehr durch Biotreibstoffe gedeckt (International Energy Agency, 2013). Die Bereitstellung von alternativen Rohstoffquellen für die verarbeitende Industrie ist ein weiterer wichtiger Aspekt. Bisher basieren die verwendeten Grundprodukte, wie Kunststoffe, weitgehend auf fossilen Ressourcen. Das Konzept von sogenannten Bioraffinerien scheint hierbei ein vielversprechender Ansatz für die Herstellung von Plattformchemikalien zu sein. Neben bekannten Fermentationsprozessen sollen hierbei auch neue Verfahren, die Substanzen wie Lignin oder Öle aus Algen nutzen, zum Einsatz kommen (Jong *et al.*, 2011).

Eine weitere bisher kaum genutzte Ressource sind Abfallströme wie z.B. Abwasser oder CO₂ aus verschiedenen Produktionsprozessen. Für deren Nutzung scheinen sogenannte bioelektrochemische Systeme (BES) ein großes Potential zu besitzen (Liu *et al.*, 2004; Nevin *et al.*, 2010). Im Folgenden sollen die verschiedenen Konzepte, deren genaue Funktionsweise und die bisherige Nutzung dieser Systeme erläutert werden. Weiterhin wird auf die bekannten chemischen, wie biologischen Prozesse und die in diesem Zusammenhang nutzbaren Mikroorganismen eingegangen.

1 Bioelektrochemische Grundlagen

1.1 Definition bioelektrochemischer Prozesse

Die Verknüpfung biologischer und elektrochemischer Prozesse wird in der Regel unter dem Begriff Bioelektrochemie oder Bioelektrokatalyse zusammengefasst. Für eine Abgrenzung zur konventionellen Elektrochemie spielt dabei das biologische Element eine Schlüsselrolle. Zahlreiche dieser Prozesse und Anwendungen wurden in den letzten Jahrzehnten entwickelt. Ein großes Feld basiert dabei auf der Adhäsion von DNA und Antikörpern (DNA-Protein-Elektrochemie) oder von Enzymen (Enzym-Elektrochemie) an Elektrodenoberflächen (Schröder *et al.*, 2015). Diese Methodik ermöglicht eine sehr große Bandbreite an neuen Applikationen, die unter anderem in der medizinischen Diagnostik oder der Analyse von Lebensmitteln und Umweltproben zur Anwendung kommen (Higson, 2012; Verma & Bhardwaj, 2015). Neben diesen, vor allem im Bereich der Biosensorik angesiedelten, Verfahren wurden auch weitere Technologien, wie die sogenannte enzymatische Biobrennstoffzelle, entwickelt (Rasmussen *et al.*, 2016). Ein weiteres großes Anwendungsfeld ist die mikrobielle-Elektrochemie, welche die Interaktion zwischen Mikroorganismen und Elektronenleitern beschreibt. Bei diesen Elektronenleitern kann es sich zum einen um natürlich vorkommende, leitfähige Verbindungen, wie beispielweise Metalloxide oder zum anderen um Metall- oder Kohlenstoffelektroden handeln (Nealson & Saffarini, 1994; Tender *et al.*, 2002; Friedman *et al.*, 2013). Eine Übertragung von Elektronen zwischen Mikroorganismus und Elektronenleiter kann dabei prinzipiell in beide Richtungen erfolgen (Richter *et al.*, 2012; Ilbert & Bonnefoy, 2013; Wang & Ren, 2013).

Für die Nutzung der zuvor beschriebenen bioelektrochemischen Anwendungen sind BES entscheidend. Mit diesen Systemen ist es möglich die Elektronen, die bei den unterschiedlichen Reaktionen übertragen werden, für verschiedene Anwendungen wie z.B. Biosensoren nutzbar zu machen. Ein weiterer wichtiger Teilbereich der BES sind die sog. mikrobiellen elektrochemischen Technologien (METs), welche die zuvor beschriebenen mikrobiellen, elektrochemischen Prozesse nutzen (Logan & Rabaey, 2012). Die in dieser Arbeit beschriebenen BES sind alle im Bereich dieser Technologien angesiedelt. Daher soll im folgenden Abschnitt auf die entscheidenden elektrochemischen, wie auch die mikrobiellen Voraussetzungen, im Detail eingegangen werden.

1.2 Grundlagen für die Nutzung mikrobieller elektrochemischer Technologien

Die grundlegende Voraussetzung für die Nutzung von METs ist die zuvor beschriebene Interaktion eines Mikroorganismus mit einer Elektrode.

Diese kann dabei entweder von kapazitiver oder faradayscher Natur sein. Im ersten Fall wird die Doppelschichtkapazität der Elektrode durch das Anlagern oder Ablösen von Zellen verändert. Durch die Umlagerung von Wassermolekülen und Ionen entsteht dabei ein ladungsausgleichender, kapazitiver Stromfluss. Faradaysche Prozesse hingegen beschreiben alle Redox-Reaktionen und molekularen Spezies, die am sogenannten extrazellulären Elektronentransport (EET, siehe 1.3) beteiligt sind. (Schröder *et al.*, 2015). Diese setzen sich zum einen aus den sogenannten pseudokapazitiven Prozessen, die auf die superkapazitiven Eigenschaften von *c*-Typ Cytochrom-reichen Biofilmen zurückzuführen sind, und zum anderen aus der eigentlichen mikrobiellen Elektrokatalyse zusammen (Malvankar *et al.*, 2012b).

Die mikrobielle Elektrokatalyse beschreibt den Prozess der Beschleunigung und Vereinfachung von elektrochemischen Reaktionen durch den EET von Mikroorganismen. Meistens wird diese Eigenschaft als mikrobieller Biokatalysator bezeichnet (Nevin *et al.*, 2010; Rosenbaum & Franks, 2014). Strenggenommen ist diese Definition jedoch unzutreffend, da Mikroorganismen einen Teil der verfügbaren Energie für ihren eigenen anabolen, wie katabolen Stoffwechsel benötigen. Somit sind diese direkt an der Reaktion beteiligt und gehen nicht unverändert aus ihr hervor (Schröder, 2007). Ein großer Vorteil der mikrobiellen Elektrokatalyse ist, dass viele elektrochemische Reaktionen ohne den Einsatz von konventionellen Edelmetallkatalysatoren ablaufen können. Deren Hauptprobleme sind, neben den hohen Anschaffungskosten und der begrenzten Verfügbarkeit, vor allem die Deaktivierung der katalytischen Oberfläche durch vielfältige Prozesse wie z.B. Vergiftung oder Faulung (Argyle & Bartholomew, 2015). Das mikrobielle System hingegen regeneriert sich fortlaufend selbst. Der Prozess der mikrobiellen Elektrokatalyse kann auf zwei Weisen angewandt werden: Zum einen für die anaerobe Oxidation von organischen Kohlenstoffverbindungen und zum anderen für die Reduktion oxidierter Verbindungen wie CO₂ (Nevin *et al.*, 2010; Rosenbaum & Franks, 2014). Diese Eigenschaften ermöglichen eine breite Anwendung in unterschiedlichen BES.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Interaktion von Mikroorganismen mit einer Elektrode ist das Elektrodenpotential, welches bei vielen BES-Anwendungen gezielt vorgegeben wird.

Hierbei ist darauf zu achten, dass das gewählte Potentialfenster auf die physiologischen Voraussetzungen des jeweiligen Mikroorganismus abgestimmt ist. Zu hohe Potentiale bei anodischen, oder zu niedrige Potentiale bei kathodischen Anwendungen, könnten so physiologisch wichtige Moleküle schädigen (Schröder *et al.*, 2015).

Den METs sind viele Systeme wie beispielweise die mikrobielle Brennstoffzelle (MFC = microbial fuel cell) oder die mikrobielle Elektrosynthesezelle (MES) zuzuordnen. Viele dieser Technologien wurden in letzter Zeit in der Literatur als BES beschrieben (Oliveira *et al.*, 2013; Keith *et al.*, 2014; Rosenbaum & Franks, 2014). Obwohl dieser Begriff eigentlich alle Systeme für bioelektrochemische Messungen inklusive der METs umfasst (siehe 1.1), scheint er jedoch für die generelle Nomenklatur besser geeignet zu sein. So beschreibt die Bezeichnung System in der Regel eine physikalische Apparatur, wohingegen Technologie eher das Gesamtbild umfasst. Aus diesem Grund werden alle im Folgenden beschriebenen METs als BES bezeichnet.

1.3 Extrazellulärer Elektronentransfer

Bei der zuvor beschriebenen mikrobiellen Elektrokatalyse spielt der extrazelluläre Elektronentransfer eine entscheidende Rolle. Um diesen genauer zu beschreiben, muss zunächst auf die zugrundeliegenden Voraussetzungen eingegangen werden.

Mikroorganismen sind, wie alle Lebewesen, auf die Gewinnung von Energie für diverse Stoffwechsellleistungen angewiesen. Dabei sind sie im Stande eine Vielzahl von Energiequellen zu verwenden. Neben organischen Verbindungen wie Kohlenhydraten, sind sie auch in der Lage anorganische Verbindungen wie Wasserstoff oder Licht zu nutzen. Die Konservierung der Energie kann dabei mittels Atmung, Photosynthese oder Gärung erfolgen (Fuchs & Schlegel, 2014). Für den EET sind dabei vor allem die Elektronentransportketten-abhängigen Prozesse von Bedeutung. Ein Grundprinzip dabei ist die Übertragung von Elektronen von einem Elektronendonator mit niedrigem Redoxpotential auf einen Elektronenakzeptor mit höherem Redoxpotential. Über die vorliegende Potentialdifferenz ist es möglich an einer Membran (i.d.R. die Cytoplasmamembran) über mehrere Reaktionsschritte einen Ionengradienten zu erzeugen. Dieser wird primär zur ATP-Synthese, aber auch für den aktiven Membrantransport oder die Zellmotilität, genutzt (Anraku, 1988). Die überwiegende Anzahl an Mikroorganismen nutzt dabei Elektronendonoren (z.B. organische Verbindungen, Wasserstoff, Sulfide, Ammonium) und -akzeptoren (z.B. Sauerstoff, Nitrat, Sulfat, CO₂), die in der Lage sind frei in der Zelle zu diffundieren. Folglich

können alle Redoxreaktionen im Zellinneren ablaufen. Weiterhin gibt es Organismen, die für ihre Energiegewinnung auch unlösliche Substanzen, wie Mineralien oder Elektroden nutzen können (Kato, 2015). In diesem Fall spielen sogenannte verlängerte Elektronentransportketten eine entscheidende Rolle. Sie ermöglichen einen Austausch von Elektronen zwischen den intrazellulären, redoxaktiven Elementen und den außerhalb der Zelle befindlichen, unlöslichen Elektronenakzeptoren bzw. -donoren über die Zellmembran(en) hinweg. (Schröder *et al.*, 2015). Dieser Prozess wird als EET beschrieben, wobei zwischen einem direkten und einem indirekten Prozess unterschieden wird (Gralnick & Newman, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2011). Da Elektroden auch als Elektronenakzeptoren oder -donoren dienen können, soll in Folgendem auf die verschiedenen Formen des EETs an Anoden und Kathoden eingegangen werden.

1.3.1 Direkter extrazellulärer Elektronentransfer auf Anoden

Die Nutzung von unlöslichen Elektronenakzeptoren wie Metalloxiden für die Energiekonservierung, ist ein in der Natur häufig anzutreffender Prozess. Man spricht dabei auch von der sogenannten dissimilatorischen Metallreduktion (Nealson & Saffarini, 1994; Nealson *et al.*, 2002). Diese Form der anaeroben Atmung ist weit verbreitet und konnte bei einer großen Anzahl von Bakterien und Archaea nachgewiesen werden (Lovley *et al.*, 2004). Die am besten untersuchten Organismen in diesem Zusammenhang sind *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis* MR-1 (Lovley & Phillips, 1988; Myers *et al.*, 1988). Diese beiden Proteobakterien sind in der Lage, neben anderen Elektronenakzeptoren, Fe(III)- und Mn(IV)-Verbindungen über eine verlängerte Atmungskette an die Zelloberfläche zu reduzieren (Lloyd, 2003). Der dieser Reaktion zugrundeliegende Prozess soll im Folgenden am Beispiel der dissimilatorischen Metallreduktion von *S. oneidensis* erläutert werden (Abb. 1).

Entscheidend für den Transport von Elektronen an die Zelloberfläche von *S. oneidensis* ist die Überwindung des Periplasmas und der äußeren Membran. Hierbei spielen überwiegend *c*-Typ Cytochrome eine wichtige Rolle. Diese Proteine verfügen über einen oder mehrere kovalent gebundene Häm-Co-Faktoren und sind dadurch in der Lage Elektronen aufzunehmen und wieder abzugeben (Shi *et al.*, 2007). Weiterhin weisen diese Cytochrome ein recht breites und ähnliches Redoxpotentialfenster auf, durch welches eine weitgehend bidirektionale Übertragung von Elektronen zwischen diesen unterschiedlichen Cytochromen möglich zu sein scheint (Ross *et al.*, 2011).

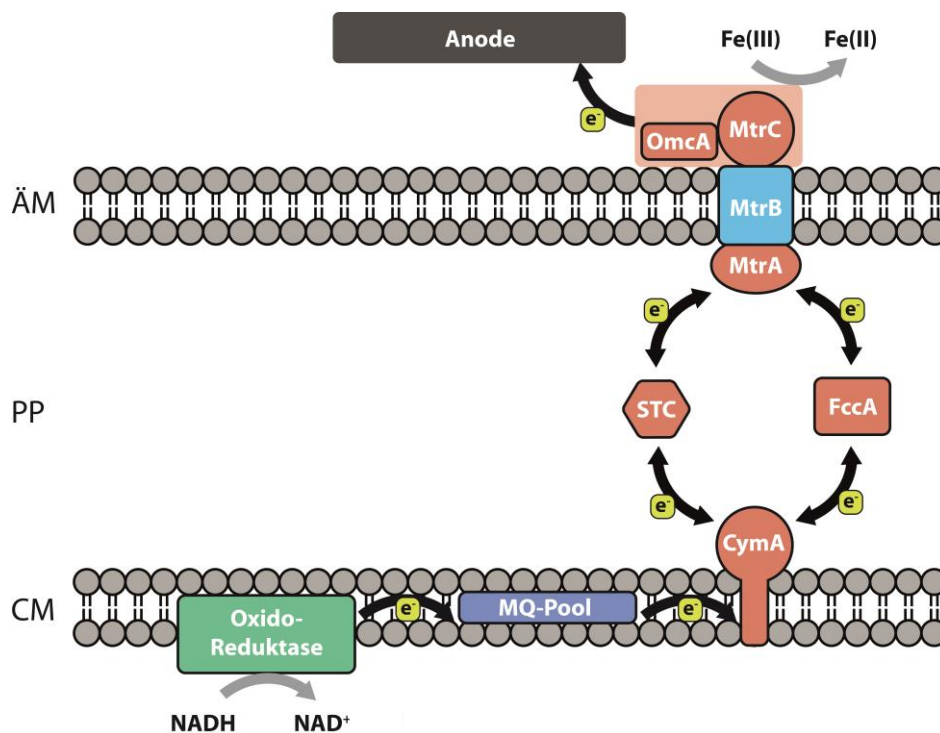


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der verlängerten Atmungskette von *S. oneidensis*. Die Elektronen aus der Oxidation von NADH fließen in der Cytoplasmamembran (CM) über den Menachinonpool auf CymA. Dieses *c*-Typ Cytochrom ist in der Lage die Elektronen auf weitere Cytochrome im Periplasma (PP) wie STC und FccA zu übertragen. Durch diese erfolgt der Elektronentransfer auf den MtrCAB-Komplex in der äußeren Membran (ÄM). An der Zelloberfläche werden die Elektronen durch die terminalen Reduktasen MtrC und OmcA auf einen unlöslichen Elektronenakzeptor wie Fe(III)-Oxide oder eine Anode übertragen. Weiterhin können einige dieser Elektronentransfer-Reaktionen bidirektional ablaufen.

Das erste essentielle Protein dieser verlängerten Atmungskette ist das Tetrahäm-Cytochrom CymA (cytoplasmatic membrane protein A). Im ersten Schritt werden die Elektronen aus dem, über die NADH-Dehydrogenase versorgten, Menachinon-Pool auf CymA übertragen. Dieses integrale Membranprotein stellt hierbei den zentralen Eintrittspunkt für die Elektronen ins Periplasma dar, was über eine CymA-Deletionsmutante von *S. oneidensis* nachgewiesen werden konnte (Myers & Myers, 2000). CymA ist dabei in der Lage eine Vielzahl von periplasmatischen *c*-Typ Cytochromen zu reduzieren (Schwalb *et al.*, 2002; Schuetz *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2013). Dabei spielen das Tetrahäm-Cytochrom STC (small tetraheme cytochrome) und die Fumaratreduktase FccA (flavocytochrome C) eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine *S. oneidensis*-Mutante, bei der die für STC und FccA kodierenden Gene deletiert waren, kaum noch in der Lage war Fe(III)-Citrat wie auch DMSO oder Nitrat als Elektronenakzeptor zu nutzen (Sturm *et al.*, 2015). Weiterhin gehören diese beiden Cytochrome zu den am häufigsten vertretenen periplasmatischen Proteinen von

S. oneidensis (Fonseca *et al.*, 2013). Daher scheinen STC und FccA eine entscheidende Rolle bei der Verteilung von Elektronen im Periplasma zu spielen. Ein weiteres wichtiges periplasmatisches Protein ist das Decahäm-Cytochrom MtrA (metal reducing protein A) (Pitts *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine MtrA-Deletionsmutante von *S. oneidensis* immer noch in der Lage war Nitrat, Nitrit, DMSO, TMAO, Thiosulfat und Sulfat zu reduzieren. Eine Reduktion von Fe(III)-Citrat und MnO₂ war hingegen kaum mehr zu detektieren, was auf eine zentrale Funktion von MtrA bei der Metallreduktion hinweist (Beliaev *et al.*, 2001; Bretschger *et al.*, 2007). Weiterhin ist MtrA bei der Übertragung von Elektronen aus dem Periplasma zur Zelloberfläche über den MtrCAB-Komplex beteiligt. Neben MtrA spielen hierbei das β -Fassprotein MtrB (metal reducing protein B) und das Decahäm-Cytochrom MtrC (metal reducing protein C) eine Schlüsselrolle. MtrB durchspannt die äußere Membran und bindet jeweils ein MtrA und ein MtrC-Molekül, wodurch ein Komplex im 1:1:1-Verhältnis vorliegt (Ross *et al.*, 2007). Das Prinzip der Elektronenübertragung von MtrA auf MtrC und somit zur Zelloberfläche ist noch nicht vollständig aufgeklärt. MtrB scheint hierbei jedoch eine essentielle Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass einerseits ohne ein funktionelles MtrAB-Modul keine Übertragung von Elektronen zur Zelloberfläche stattfinden kann und andererseits die korrekte Lokalisation von MtrC gestört ist (Beliaev & Saffarini, 1998; Myers & Myers, 2002). Abschließend werden die Elektronen durch die terminalen Reduktasen MtrC und OmcA (outer membrane cytochrome A) auf einen Elektronenakzeptor wie z.B. Fe(III)-Citrat übertragen. Hierbei scheint vor allem MtrC eine wichtige Rolle für die Fe(III)-Reduktion zu spielen (Hartshorne *et al.*, 2007).

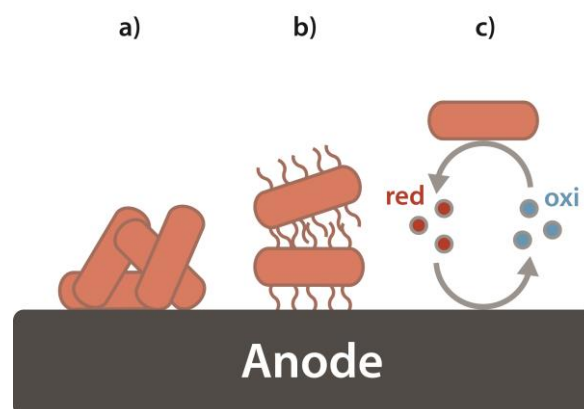


Abb. 2: Extrazellulärer Elektronentransfer auf eine Anode. a) Direkter EET über redoxaktive Proteine an der Zelloberfläche; b) Direkter EET über Zellfortsätze; c) Indirekter EET über Redoxshuttles.

OmcA hingegen scheint eher für die Mn(IV)-Reduktion wichtig zu sein (Myers & Myers, 2001; C. Bücking *et al.*, 2010). Da die genaue Interaktion von OmcA mit dem MtrCAB-Komplex noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann jedoch ein Einfluss von OmcA auf die Fe(III)-Reduktion nicht ausgeschlossen werden. Da diese terminale Reduktion eher von unspezifischer Natur ist, können die Elektronen neben Metalloxiden auch auf andere unlösliche Akzeptoren wie Anoden übertragen werden (Abb. 2a).

Eine weitere Form des direkten EETs auf unlösliche Elektronenakzeptoren beruht auf leitfähigen Zellfortsätzen, die eine Interaktion über eine Distanz von mehreren Zelldurchmessern ermöglichen sollen (Abb. 2b). Diese sogenannten „Nanowires“ konnten sowohl bei *G. sulfurreducens*, als auch bei *S. oneidensis* beobachtet werden (Reguera *et al.*, 2005; Gorby *et al.*, 2006). Obwohl beide Fortsätze eine weitgehend analoge Funktion aufweisen, sind sie in ihrem Aufbau sehr verschieden. Bei *S. oneidensis* handelt es sich wahrscheinlich um eine mit dem Periplasma in Kontakt stehende Ausstülpungen der äußeren Membran. Der Elektronentransfer erfolgt in diesem Fall wie schon im vorigen Abschnitt beschrieben über mehrere Cytochrome (Pirbadian *et al.*, 2014).

Bei *G. sulfurreducens* scheint es sich hingegen um Typ IV Pili-Strukturen zu handeln (Lovley & Malvankar, 2015). Hierbei werden momentan zwei Modelle kontrovers diskutiert, die die Leitfähigkeit dieser Strukturen erklären könnten. Das erste beruht auf an der Oberfläche der Pili lokalisierte Cytochrome, über welche die Elektronen mittels eines sog. multistep-electron-hopping-Mechanismus entlang der Pilusachse übertragen werden können (Snider *et al.*, 2012; Bonanni *et al.*, 2013). Das zweite Modell beschreibt eine metallartige Leitfähigkeit der Pili, die auf einer speziellen Struktur des Piliproteins PilA von *G. sulfurreducens* beruhen könnte. Dabei sollen überlappende pi-pi-Orbitale aromatischer Aminosäuren einen Elektronentransfer über längere Distanzen ermöglichen (Vargas *et al.*, 2013; Malvankar *et al.*, 2015). Beide Modelle sind nach wie vor Gegenstand der Forschung, wobei durch mehrere Studien eher die Theorie der metallartigen Leitfähigkeit bekräftigt wird. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass der Abstand der Cytochrome zueinander für eine direkte Übertragung von Elektronen eigentlich zu groß ist und Pili, deren Cytochrome denaturiert worden sind, keine signifikante Abnahme der Leitfähigkeit aufwiesen (Malvankar *et al.*, 2011; Malvankar *et al.*, 2012c).

1.3.2 Indirekter extrazellulärer Elektronentransfer auf Anoden

Beim indirekten EET (Abb. 2c) werden die Elektronen nicht direkt von der Zelle auf den unlöslichen Elektronenakzeptor, sondern zunächst auf redoxaktive, organische Verbindungen übertragen. Diese sogenannten Elektronenshuttles können dann mittels Diffusion zu weiter entfernten Metalloxiden oder Anoden gelangen und diese reduzieren. Dabei werden die Verbindungen selbst wieder reoxidiert und diffundieren schließlich zur Zelloberfläche zurück. Dort können sie anschließend erneut Elektronen aus der Atmungskette aufnehmen (Lovley *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006). Der Ursprung dieser Substanzen kann dabei exo- oder endogener Natur sein. Ein wichtiger exogener Vertreter dieser Verbindungen sind Huminstoffe, die den Hauptanteil an organischen Verbindungen in vielen Böden ausmachen (Jiang & Kappler, 2008). Des Weiteren scheinen auch endogene Verbindungen wie z.B. Flavine als Elektronenshuttle dienen zu können (Marsili *et al.* 2008a). Der gezielte Einsatz dieser Elektronenshuttle erfolgt auch zunehmend in BES-Anwendungen, wobei hierbei auch synthetische Verbindungen wie Metylenblau Verwendung finden (Weber *et al.*, 2006; Sturm-Richter *et al.*, 2015). Ein Vorteil des indirekten EETs ist, dass die interagierende Elektrodenfläche durch deren Einsatz virtuell vergrößert werden kann.

Generell werden Mikroorganismen, die Elektronen über einen direkten oder einen indirekten EET über endogene Elektronenshuttles auf eine Anode übertragen können, auch als exoelektrogene Mikroorganismen bezeichnet (Logan, 2009).

Grundsätzlich spielen Biofilme bei beiden Formen des EETs eine wichtige Rolle. Ihre Ausbildung ist unter Mikroorganismen weit verbreitet und birgt eine große Zahl an Vorteilen wie z.B. eine verbesserte Anlagerung an Oberflächen oder eine erhöhte Toleranz gegenüber Störfaktoren (Fuchs & Schlegel, 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Biofilme für den EET über längere Distanzen von Bedeutung sind. Bei *Geobacteraceae* enthaltenden Biofilmen scheinen die zuvor erwähnten Pilusstrukturen für eine elektrische Leitfähigkeit der gesamten Struktur zu sorgen (Malvankar *et al.*, 2012a). Bei *S. oneidensis* scheint der indirekte EET im Gegensatz zu *G. sulfurreducens* eine wichtigere Rolle zu spielen (Straub & Schink, 2003; Kotloski & Gralnick, 2013). In diesem Zusammenhang weisen Biofilme mehrere Vorteile auf: Die Diffusionsgeschwindigkeit der Elektronenshuttle zwischen den Zellen und einem Elektronenakzeptor ist vergleichsweise hoch, wenngleich der Verlust von Shuttlemolekülen aus dem Biofilm heraus im vertretbaren Rahmen bleibt. Weiterhin ist innerhalb des Biofilms ein direkter EET für die zum Elektronenakzeptor in unmittelbarer Nähe befindlichen Zellen möglich (Renslow *et al.*, 2013).

1.3.3 Direkter extrazellulärer Elektronentransfer von Kathoden

Trotz einer stark steigenden Anzahl an Studien über die mikrobielle Interaktion mit Kathoden ist das Bild über den genauen Ablauf des Elektronentransfers bisher unvollständig (Rosenbaum *et al.*, 2011). Daher soll im Folgenden auf die bisher bekannten Wege und möglichen Theorien für einen EET von einer Kathode eingegangen werden. Einige dieser Prozesse scheinen dabei Mechanismen zu nutzen, die auch beim EET auf Anoden eine Rolle spielen.

Der eindeutige Nachweis für einen direkten Elektronentransfer von einer Kathode (Abb. 3a) konnte bisher nur für *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis* erbracht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Organismen mit einer Kathode als einzigen Elektronendonator in der Lage waren Fumarat (*G. sulfurreducens* & *S. oneidensis*) und Nitrat (*G. sulfurreducens*) zu reduzieren (Gregory *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2011). Weiterhin führte eine Deletion einzelner Elemente der verlängerten Atmungskette dazu, dass die Fumarat-Reduktion in *S. oneidensis* unter den beschriebenen Bedingungen nicht mehr möglich war. Daher scheint der in 1.3.1 beschriebene Elektronentransport in diesem Organismus in beide Richtungen möglich zu sein (Ross *et al.*, 2011). Wie in Kapitel 1.3.4 genauer beschrieben, kann auch Wasserstoff abiotisch an einer Kathode generiert werden. Um bei *G. sulfurreducens* die Nutzung von Wasserstoff als alternativen Elektronendonator auszuschließen, wurde die Fumarat-Reduktion bei einer Hydrogenase-Deletionsmutante bestimmt.

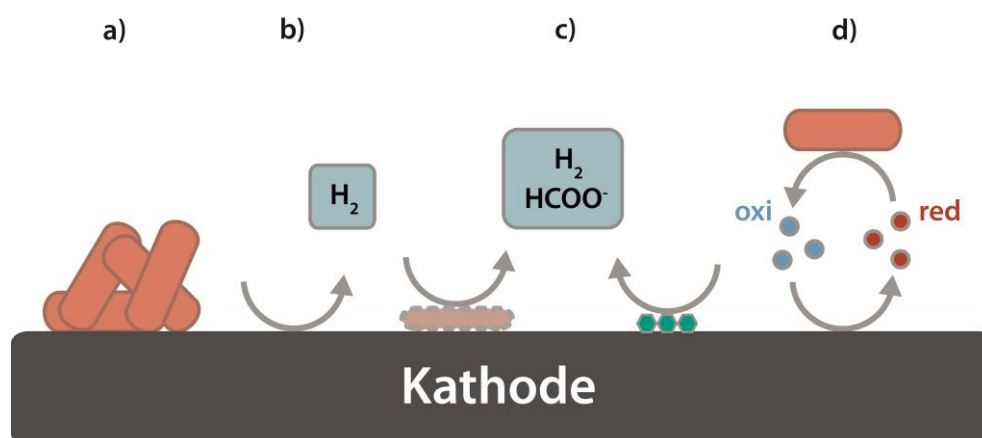


Abb. 3: Extrazellulärer Elektronentransfer von einer Kathode. a) direkter EET über redoxaktive Proteine; b) indirekter EET durch abiotische Wasserstoffbildung; c) indirekter EET durch Biomolekül-abhängige Wasserstoff- oder Formiatbildung; d) indirekter EET über Redoxshuttles.

Da diese keine Abweichung vom Verhalten des Wildtyps zeigte, kann auch in diesem Fall von einem direkten EET ausgegangen werden (Gregory *et al.*, 2004). Dieser scheint im Gegensatz zu *S. oneidensis* jedoch über einen anderen Mechanismus, als die Elektronenübertragung auf eine Anode abzulaufen (Strycharz *et al.*, 2011).

Die nichtphylogenetische Gruppe der Eisenoxidierer wird ebenfalls mit der Eigenschaft des direkten EETs von einer Kathode in Verbindung gebracht. Ein sehr gut untersuchter Vertreter dieser Gruppe ist das nichtschwefel-Purpurbakterium *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. Dieser Organismus ist in der Lage Fe(II)-Verbindungen unter phototrophen Bedingungen als Elektronendonator zu nutzen (Jiao *et al.*, 2005). Verantwortlich dafür ist das *pio*-Operon, welches für das *c*-Typ Cytochrom PioA, das äußere Membran-Protein PioB und das HiPiP (high potential iron sulfur protein) PioC kodiert. Dabei zeigen PioA und PioB eine Homologie zu MtrA bzw. MtrB und spielen beim Transfer von Elektronen von Fe(II) ins Periplasma von *R. palustris* TIE-1 eine entscheidende Rolle. PioC scheint für die Übertragung der Elektronen ins Photosystem verantwortlich zu sein (Jiao & Newman, 2007; Bird *et al.*, 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Organismus auch in der Lage ist Elektronen von einer Kathode zu beziehen. Dabei scheint das *pio*-Operon zumindest einen Einfluss auf die Elektronenaufnahme von *R. palustris* TIE-1 zu haben, da dessen Deletion zu einer Reduktion von dieser um 30 % führte (Bose *et al.*, 2014).

Neben diesen Organismen wurden noch weitere beschrieben, die zu einem direkten EET von einer Kathode fähig sein sollen. So scheinen *Mariprofundus ferrooxydans* und *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sowie die acetogenen Bakterien *Clostridium ljungdahlii* und *Moorella thermoacetica* ebenfalls zu diesem Prozess in der Lage zu sein (Nevin *et al.*, 2010; Nevin *et al.*, 2011; Summers *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2015).

1.3.4 Indirekter extrazellulärer Elektronentransfer von Kathoden

In vielen Arbeiten, die sich mit dem EET von einer Kathode auf einen Organismus beschäftigen, stellt sich die Frage, ob dieser tatsächlich direkt oder doch über andere Wege stattfindet. Hierbei wird insbesondere die kathodische Wasserstoffproduktion als Ursache für ein mikrobielles Wachstum diskutiert (Lovley & Nevin, 2013; Lohner *et al.*, 2014).

Obwohl das Redoxpotential E° einer rein chemischen Wasserstoffbildung ($2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$; in neutraler, wässriger und anoxischer Umgebung) bei -414 mV gegenüber einer Standard Wasserstoffelektrode (SHE) liegt, wird für eine abiotische Wasserstoffgeneration an einer Graphitkathode mindestens ein Potential von -1000 mV vs. SHE benötigt (Abb. 3b) (Batlle-

Vilanova *et al.*, 2014; Deutzmann *et al.*, 2015). Dieses Überpotential kann jedoch durch eine Interaktion der Kathode mit Mikroorganismen oder zellfreiem, zuvor mit diesen Organismen inkubiertem, Medium drastisch gesenkt werden. So produzierten mit inaktivierten Zellen und Zellextrakten inkubierte Kathoden, bei einem Potential von -600 mV vs. SHE, ähnliche Mengen an Wasserstoff, wie jene, die mit lebenden Zellen versehen waren (Yates *et al.*, 2014).

Eine entscheidende Rolle bei diesem Biomolekül-abhängigen Prozess (Abb. 3c) scheinen vor allem Enzyme wie Hydrogenasen oder Formiat-Dehydrogenasen zu spielen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der methanogene Organismus *Methanococcus maripaludis* in der Lage war, bei einem Kathodenpotential von -600 mV vs. SHE Methan zu produzieren. Bei einer Hydrogenase-Deletionsmutante konnten jedoch nur noch 10 % der beim WT gemessenen Methanmenge nachgewiesen werden. Folglich scheint die Kathoden-abhängige Methanproduktion dieses Organismus weitgehend Hydrogenase-abhängig zu sein (Lohner *et al.*, 2014). Weiterhin wurde in einer Anschlussstudie zellfreies Medium, in welchem zuvor der WT kultiviert wurde, untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese zelllosen Ansätze ähnliche Stromstärken, wie jene mit Zellen generierten. Eine nähere Analyse des Mediums ergab, dass es freie, Oberflächen-adhäsive Hydrogenasen und sogar Formiat-Dehydrogenasen enthielt. Es konnte gezeigt werden, dass allein durch diese Enzyme im Vergleich zur abiotischen Kontrolle eine 22-mal höhere Wasserstoff- und 57-mal höhere Formiatbildung erfolgte. Im Gegensatz dazu waren die messbaren Wasserstoff- und Formiatmengen in den WT-Zellkulturversuchen verschwindend gering. Jedoch konnte stattdessen eine hohe Methanbildung beobachtet werden. Daher scheint der durch diese Enzyme produzierte Wasserstoff und das Formiat als eigentlicher Elektronendonator für die Methanbildung von *M. maripaludis* zu dienen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Versuchen mit dem homoacetogenen Organismus *Sporomusa sphaeroides* gemacht. Auch hier konnte die Wasserstoffbildung durch zuvor mit Zellen inkubiertem, zellfreiem Medium gesteigert werden (Deutzmann *et al.*, 2015).

Neben den schon beschriebenen Formen des indirekten EETs, gibt es weiterhin die von Elektronenshuttle abhängige Elektrodeninteraktion (Abb. 3d). Ein Vorteil hierbei scheint zu sein, dass auch nicht zum direkten EET befähigte Organismen eine Kathode als Elektronendonator nutzen können. Als exogene Substanzen wurden bisher AQDS, Methylviologen und Neutralrot genutzt (Park & Zeikus, 1999; Aulenta *et al.*, 2008; Hatch & Finneran, 2008; Steinbusch *et al.*, 2010; Harrington *et al.*, 2015). Des Weiteren konnte gezeigt

werden, dass auch endogene Substanzen wie z.B. Phenazine, Flavine, Vitamin B12 oder DNA als Elektronen-Shuttle eine Rolle spielen könnten (Freguia *et al.*, 2010; Venkataraman *et al.*, 2010; Rosenbaum *et al.*, 2011).

Generell werden Mikroorganismen, die Elektronen zur Reduktion eines terminalen Elektronenakzeptors von einer Kathode beziehen können (direkter, wie indirekter EET) als elektrotrophe Mikroorganismen bezeichnet (Lovley, 2011).

2 Bioelektrochemische Systeme

2.1 Mikrobielle Brennstoffzellen

Die mikrobielle Brennstoffzelle stellt das am besten untersuchte und älteste BES dar. Die ersten Beobachtungen bezüglich einer Generierung von Elektrizität mittels Mikroorganismen wurden schon vor über 100 Jahren dokumentiert (Potter, 1911). Dennoch begann die erste genauere Untersuchung dieses Forschungsfeldes erst ab den 1960er Jahren durch das NASA-Raumfahrtprogramm (Canfield *et al.*, 1963). Ab der Jahrtausendwende nahm schließlich die Anzahl an Publikationen und somit auch das Forschungsinteresse in diesem Themenbereich stark zu und es wurden seitdem eine große Anzahl an MFC-Anwendungen in verschiedenen Bereichen beschrieben (Wang & Ren, 2013). Im Folgenden soll zunächst die prinzipielle Funktionsweise einer MFC erläutert werden (Abb. 4).

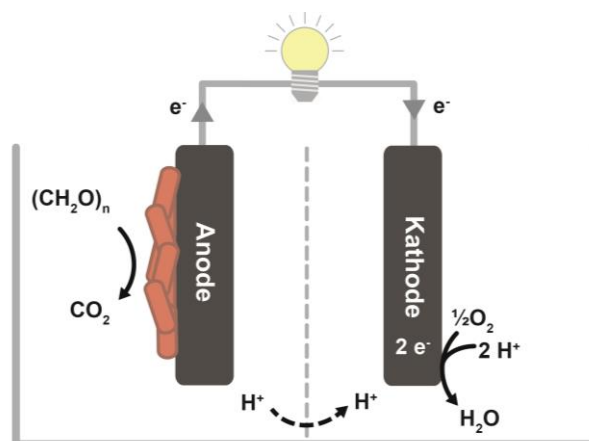


Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer mikrobiellen Brennstoffzelle.

Der grundlegende Aufbau einer MFC besteht aus zwei räumlich getrennten Kammern, in denen jeweils ein Teil einer Redoxreaktion abläuft. Im anoxischen Anodenkompartiment findet als erste Teilreaktion eine Oxidation von organischen Substanzen zu Acetat oder CO_2

statt. Die dabei freigesetzten Elektronen werden über die in den Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 beschriebenen Transfermechanismen auf eine Anode übertragen, welche über einen elektrischen Widerstand mit der Kathode verbunden ist. Weiterhin werden bei diesem Prozess Protonen generiert, die über einen Separator, wie z.B. eine protonenpermeable Membran (PEM), in das oxische Kathodenkompartiment migrieren können. An der Kathode findet die zweite Teilreaktion statt, bei der Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Logan *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2007). Um die Elektronenbilanz der Gesamtreaktion auszugleichen, müssen die Elektronen von der Anode zur Kathode fließen. Dadurch wird ein elektrischer Stromfluss erzeugt.

Neben diesem klassischen Aufbau, wurden auch weitere Formen von MFCs wie z.B. die Sediment-MFC entwickelt. Diese Systeme nutzen die natürliche Potentialdifferenz zwischen dem anoxischen Sediment und einer darüber liegenden, oxischen Wasserschicht für die Generierung eines elektrischen Stroms. Dabei werden die im Sediment vorhandenen organischen Verbindungen von exoelektrogenen Mikroorganismen oxidiert, wobei die Elektronen, wie schon beschrieben, über die sich im Sediment befindliche Anode zur im Wasser lokalisierten Kathode fließen und dort Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Reimers *et al.*, 2001; Lovley, 2006). Diese Art von MFCs besitzen vor allem ein großes Potential für die Stromversorgung von fernab der Küste gelegenen, marinen Messstationen (Tender *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2011). Eine weitere Form der Sediment-MFCs sind die Remediations-MFCs. Hierbei wird die Anode in ein, mit organischen Schadstoffen kontaminiertes, Sediment eingebracht (Huang *et al.*, 2011). Durch die Verfügbarkeit eines nicht verbrauchbaren Elektronenakzeptors, kann die anaerobe Oxidation dieser Substanzen um ein Vielfaches beschleunigt werden. Als positiver Nebeneffekt wird dabei noch elektrischer Strom erzeugt (Wang & Ren, 2013).

Weiterhin wurde eine große Vielfalt an sog. photosynthetischen MFCs oder mikrobiologischen Solarzellen beschrieben. Das grundlegende Prinzip fast aller dieser Konzepte kann in vier Schritte unterteilt werden: Zunächst erfolgt die Erzeugung organischer Substanzen durch phototrophe Organismen. Diese Verbindungen werden anschließend in das Anodenkompartiment transportiert, wo im Anschluss deren Oxidation durch exoelektrogene Organismen erfolgt. Wie bei allen anderen MFCs fließen die Elektronen zur Kathode, wo die Reduktion von Sauerstoff stattfindet (Strik *et al.*, 2011). Diese Art von MFCs sind die einzigen BES, die nicht auf externe Elektronendonoren angewiesen sind und als eigentliche Energiequelle Licht nutzen. Als grundlegendes Problem gilt jedoch deren geringe Leistungsdichte (Wang & Ren, 2013).

Die mit Abstand am häufigsten beschriebene Form dieser Systeme, sind die MFCs zur Abwasserbehandlung. Deren verschiedene Bauformen und Anwendungen werden in Abschnitt 3.2 im Detail erläutert.

2.2 Mikrobielle Elektrosynthese

Die mikrobielle Elektrosynthese stellt ein noch recht neues Forschungsfeld im Bereich der BES dar. Sie beschreibt die mikrobielle Produktion von organischen Kohlenstoffverbindungen durch die Nutzung einer Kathode als Elektronendonator. Prinzipiell handelt es sich dabei um eine Umkehrung der Reaktionen in einer MFC.

In Abbildung 5 ist die Funktionsweise einer MES-Zelle dargestellt. Dabei werden die beiden Elektroden zunächst durch eine externe Spannungsquelle polarisiert. Dadurch erfolgt an der Anode die Spaltung von Wasser in Sauerstoff und Protonen, welche über einen Separator in den Kathodenraum migrieren können. Die dabei freigesetzten Elektronen fließen zur Kathode, wo sie über die in Abschnitt 1.3.3 und 1.3.4 beschriebenen Transfermechanismen auf die Mikroorganismen im Kathodenkompartiment übertragen werden. Anschließend werden diese Elektronen innerhalb der Organismen auf einen terminalen Elektronenakzeptor übertragen, wobei auch Zellenergie konserviert wird (Rabaey & Rozendal, 2010). Diese terminalen Elektronenakzeptoren können neben CO_2 auch höher reduzierte Verbindungen sein. Als Beispiele für eine kathodenabhängige CO_2 -Reduktion sind hierbei acetogene MES-Prozesse, oder die sogenannte Elektromethanogenese zu nennen. (Cheng *et al.*, 2009; Nevin *et al.*, 2010; Nevin *et al.*, 2011; Siegert *et al.*, 2015). Weiterhin gibt es zunehmend mehr Studien die eine sogenannte Elektrofermentation beschreiben.

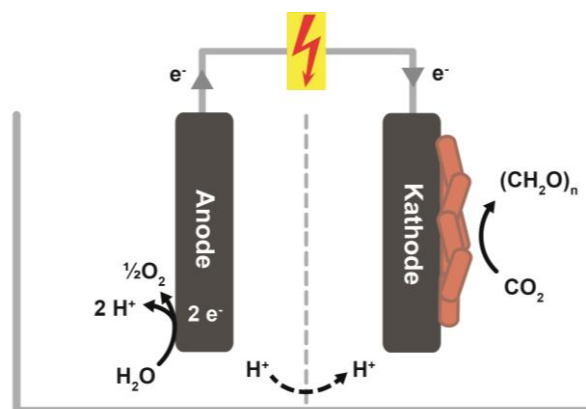


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer mikrobiellen Elektrosynthesezelle.

Dabei sollen die metabolischen Redoxbeschränkungen in Fermentationsprozessen durch die Interaktion mit Elektroden überwunden werden. Kathodische Prozesse, bei denen es durch Bereitstellung zusätzlicher Elektronen zu einer Verschiebung der Gärungsbilanz zu höher reduzierten Verbindungen kommt, können dabei auch der MES zugeordnet werden (Rabaey & Rozendal, 2010; Moscoviz *et al.*, 2016).

Grundsätzlich beschreibt die MES eine Form der Konversion von elektrischer in chemische Energie, wodurch diese auch als Speichertechnologie für regenerativ erzeugten Strom dienen könnte. Betrachtet man die Effizienz dieser Reaktion, konnte gezeigt werden, dass ca. 80 % der kathodischen Elektronen in chemischen Verbindungen wiederzufinden sind (Nevin *et al.*, 2011; Nie *et al.*, 2013). Trotz dieser vielversprechenden Ansätze sind allerdings noch große Hürden für eine großtechnische Umsetzung von MES-Prozessen zu nehmen. Neben den ingenieurstechnischen Herausforderungen, scheint vor allem ein besseres Verständnis des EETs zur weiteren Absenkung des Energieeintrages von Bedeutung zu sein. Hierbei könnte vor allem die Herstellung direkter Elektronentransferwege durch genetische Manipulation von Mikroorganismen einen großen Beitrag leisten (Lovley & Nevin, 2013).

2.3 Weitere Konzepte von bioelektrochemischen Systemen

Neben den beiden beschriebenen BES gibt es weitere Systeme, die teilweise dieselben Elektrodenprozesse nutzen. Die sogenannte mikrobielle Elektrolysezelle (MEC = microbial electrolysis cell) stellt dabei eine Mischform einer MFC und einer abiotischen Elektrolysezelle oder einer MES-Zelle dar. Dabei fließen die Elektronen der mikrobiellen Anodenreaktion ebenfalls zur Kathode. Deren Potential wird jedoch durch die Zwischenschaltung einer externen Spannungsquelle auf ein Niveau abgesenkt, bei welchem eine abiotische bzw. biotische Erzeugung von Wasserstoff, Wasserstoffperoxid oder Methan erfolgen kann (Cheng & Logan, 2007; Cheng *et al.*, 2009; Rozendal *et al.*, 2009). Dabei wird durch die Anodenreaktion der benötigte, zusätzliche Eintrag an elektrischer Energie für die Kathodenreaktion reduziert.

Weitere Systeme sind die sogenannten mikrobiellen Entsalzungszellen. Hierbei wird eine dritte, mit Salzwasser gefüllte Kammer zwischen das Anoden- und das Kathodenkompartiment einer MFC bzw. MEC eingefügt. Dabei ist die Anode über eine anionen- und die Kathode über eine kationenpermeable Membran von der Entsalzungskammer getrennt. Durch die beiden Elektrodenreaktionen werden Protonen an der Anode generiert und an der Kathode verbraucht. Für den Ladungsausgleich migrieren in der

Folge die im Salzwasser enthaltenen Anionen (z.B. Cl^-) zur Anode und die Kationen (z.B. Na^+) zur Kathode, wodurch dieses entsalzt wird (Cao *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2010).

Für die grundlegende Erforschung nahezu aller BES-Prozesse spielen weiterhin die potentialkontrollierten, mikrobiellen 3-Elektrodenzellen (M3C = microbial 3-electrode cell) eine entscheidende Rolle. Mit diesen Zellen ist es möglich mithilfe eines Potentio- oder Galvanostaten, das Elektrodenpotential oder den Stromfluss, von oder auf eine Elektrode kontrolliert einzustellen (Rosenbaum *et al.*, 2011). Dabei werden jeweils eine Arbeits-, eine Bezugs- und eine Gegenelektrode genutzt (siehe Kapitel II Abb. 17). Durch die Definition der Bedingungen an der Arbeitselektrode (Potential, Stromrichtung und interagierende Mikroorganismen) kann diese entweder als Anode oder als Kathode betrieben werden. Im Folgenden soll kurz auf die Arbeitsweise eines Potentiostaten eingegangen werden: Dieser misst zunächst die Potentialdifferenz zwischen der Bezugs- und der Arbeitselektrode (RE = reference electrode gegen. WS = working sense) und bestimmt so die Abweichung vom, durch die Steuerung voreingestellten, Arbeitselektrodenpotential. Als Bezugselektroden werden hierbei in der Regel Ag/AgCl- oder Kalomel-Elektroden eingesetzt. Anschließend wird die Gegenelektrode (CE = counter electrode) so polarisiert, dass sich das Potential der Arbeitselektrode (WE = working electrode) wieder dem voreingestellten Wert angleicht. Dieser Regelkreis wird in sehr engen zeitlichen Abständen wiederholt und dabei die elektrische Stromstärke und die Stromrichtung erfasst (positive Werte: WE \rightarrow CE; negative Werte: CE \rightarrow WE) (Metrohm Autolab B.V, 2011). Die Angabe der gemessenen Elektrodenpotentiale sollte dabei immer gegenüber dem einer SHE erfolgen, da dies eine direktere Einordnung der an den Elektroden stattfindenden Redoxprozesse ermöglicht. Dabei werden die gemessenen Potentiale gegenüber den Bezugselektroden auf Werte gegenüber einer SHE umgerechnet (Potentialdifferenzen: Ag/AgCl [KCl gesättigt] = -196 mV vs. SHE; Kalomel [SCE; KCl gesättigt] = -244 mV vs. SHE; (Sawyer *et al.*, 1995)).

Der große Vorteil der M3Cs ist, dass die Prozesse an einer Anode bzw. einer Kathode unter definierten Bedingungen untersucht werden können. Daher sind diese Systeme bei der Erforschung sehr vieler bioelektrochemischer Fragestellungen von großer Bedeutung (Rosenbaum *et al.*, 2011). Als Beispiel sind hierbei auch spezielle mikrobielle elektrochemische Sensorsysteme zu nennen. Mit diesen ist es möglich die Konzentration eines bestimmten Analyten über korrespondierende, durch genetisch veränderte exoelektrogene Mikroorganismen erzeugte, elektrische Signale zu bestimmen (Golitsch *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2014).

3 Mikrobielle Brennstoffzellen in der Abwasserbehandlung

3.1 Konventionelle Abwasserbehandlung

Um die Einsatzmöglichkeiten von MFCs in der Abwasserbehandlung genauer erläutern zu können, soll im Folgenden zunächst eine Übersicht über den konventionellen Abwasserreinigungsprozess gegeben werden.

Neben rein industriellen Abwässern spielt in Deutschland vor allem die Reinigung von kommunalem Abwasser (ca. 152 Millionen Einwohnerwerte) eine entscheidende Rolle (DWA, 2016). Prinzipiell setzt sich dieses aus Einleitungen von Haushalten (häusliches Abwasser), Gewerbe und der indirekten Einleitung von Industriebetrieben (betriebliches Abwasser) zusammen. Weiterhin kann es zum Teil zur zusätzlichen Einleitung von Regenwasser kommen (Mischwasser) (MKULNV NRW, 2012).

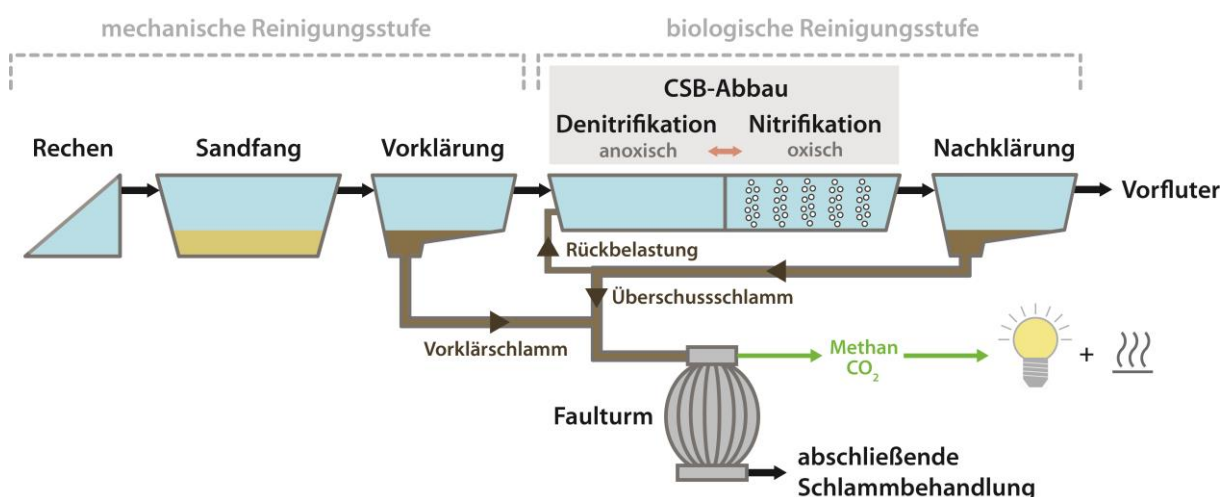


Abb. 6: Vereinfachtes Schema eines kommunalen Klärwerks. In der mechanischen Reinigungsstufe erfolgt zunächst die Entfernung grober und nicht gelöster Bestandteile des Abwassers über drei Stufen (Rechen, Sandfang & Vorklärung). Auf diese folgt die biologische Reinigungsstufe, die einen anoxischen und oxischen Teil umfasst. In diesem Schritt erfolgt die Entfernung von organischen Kohlenstoff- (CSB = chemischer Sauerstoffbedarf) und Stickstoffverbindungen (Denitrifikation & Nitrifikation) aus dem Abwasser. In der Nachklärung wird der erzeugte Belebtschlamm abgetrennt und zum kleineren Teil der biologischen Stufe wieder zugeführt (Rückbelastung), oder als Überschussschlamm mit dem Vorklärschlamm in den Faulturm gepumpt. Das gereinigte Abwasser des Überlaufs kann anschließend dem Vorfluter zugeführt werden. Im Faulturm erfolgt eine Fermentation des Schlamms, bei der Biogas (CH₄ & CO₂) entsteht. Dieses kann zur Erzeugung von elektrischer Energie und Prozesswärme genutzt werden.

In Abbildung 6 ist der vereinfachte Aufbau eines Klärwerks für kommunales Abwasser gezeigt. Der Reinigungsprozess lässt sich dabei in drei bis vier Reinigungsschritte aufteilen: In der mechanischen Reinigungsstufe werden zunächst über eine Anordnung von Rechen sehr grobe Bestandteile des Abwassers wie Äste, Laub oder Steine entfernt. Darauf folgt der Sandfang, in welchem sich grobe Bestandteile wie Sand oder Glasscherben absetzen können und meistens auch Öle und Fette abgeschieden werden. Im Vorklärbecken wird die Fließgeschwindigkeit des Abwassers stark vermindert, wodurch ungelöste Stoffe wie Fäkalien sedimentieren können. Der so entstandene Primärschlamm wird im Anschluss der Schlammbehandlung zugeführt. In der darauffolgenden biologischen Reinigungsstufe erfolgt im sog. Belebtschlammverfahren eine weitestgehende Entfernung von löslichen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen durch Mikroorganismen.

Dieser Prozess ist prinzipiell in einen oxischen und einen anoxischen Teil gegliedert. Unter oxischen Bedingungen wird zunächst ein Großteil der organischen Kohlenstoffverbindungen zu CO_2 oxidiert. Weiterhin erfolgt eine Nitrifikation, bei welcher das beim Abbau der organischen Verbindungen freigesetzte Ammonium zu Nitrat oxidiert wird. Im zweiten, anoxischen Teil wird durch die Denitrifikation das im Abwasser enthaltene Nitrat und Nitrit zu molekularem Stickstoff reduziert. Dabei erfolgt eine weitere Oxidation von organischen Kohlenstoffverbindungen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass verschiedene Verfahren mit simultaner, vor- oder nachgeschalteter Denitrifikation entwickelt wurden. Da im Belebtschlammverfahren sehr viel Biomasse gebildet wird, muss diese im Anschluss aus dem behandelten Abwasser wieder entfernt werden. Dies geschieht im Nachklärbecken, in welchem der Belebtschlamm durch Sedimentation abgetrennt wird. Dieser wird anschließend zum Großteil ebenfalls der Schlammbehandlung zugeführt und zum kleineren Teil als sog. Rückbelastung wieder in das Belebtschlammbecken gepumpt. In der abiotisch-chemischen Reinigungsstufe werden, durch Zugabe von Chemikalien in verschiedenen Bereichen des Reinigungsprozesses, die Flockungs- und Präzipitationseigenschaften des Abwassers verbessert. Dies dient vor allem der Entfernung von Phosphor, um einer Eutrophierung von Gewässern vorzubeugen. Weiterhin kann auf diesem Wege auch eine Desinfektion des behandelten Abwassers oder eine Entfernung unerwünschter Substanzen durch starke Oxidations- oder Reduktionsmittel erfolgen. Als weitere abiotische Methoden sind zudem noch die Filtration sowie die Behandlung mit UV-Licht zu nennen.

Nach dem Durchlaufen aller Reinigungsschritte wird das gereinigte Abwasser in der Regel in ein Fließgewässer, den sog. Vorfluter, eingeleitet. Die während der Abwasserbehandlung

generierten Schlämme werden der Schlammbehandlung zugeführt. Dabei werden diese zunächst eingedickt und, falls vorhanden, anschließend in einen Faulurm gepumpt. Dort wird in einem komplexen, anaeroben Fermentationsprozess zum einen die Schlammmenge reduziert und zum anderen ein Faulgas, das überwiegend Methan und CO₂ enthält, erzeugt. Letzteres wird üblicherweise zur Generierung von Elektrizität und Wärme, und somit zur Effizienzsteigerung der Gesamtanlage, genutzt. In einem abschließenden Schritt werden die Schlämme entwässert und entweder in der Landwirtschaft verwendet oder zunehmend einer thermischen Verwertung zugeführt (Stuetz, 2009).

Für die Durchführung der beschriebenen Prozesse gibt es eine Vielzahl von technischen Verfahren, die, abhängig von den am Standort herrschenden Bedingungen, zum Einsatz kommen. Dabei sind die ca. 10000 kommunalen Kläranlagen in Deutschland für ungefähr 20 % des Stromverbrauchs der Kommunen verantwortlich. Ein Großteil dieser Energie wird dabei für die Belüftung in der biologischen Stufe verwendet (je nach Anlagentyp 50-80 %) (Fricke, 2009). Dieser Bereich bietet daher für die Optimierung der Energieeffizienz dieser Anlagen großes Potential. Hierbei können MFCs möglicherweise in der Zukunft einen großen Beitrag leisten.

3.2 Einsatz mikrobieller Brennstoffzellen als biologische Reinigungsstufe

Der Einsatz einer MFC zur Reinigung von Abwasser wurde erstmals im Labormaßstab durch die Nutzung einer Einkammer-MFC demonstriert. Als Substrat für die, an diesem Prozess beteiligten, Mikroorganismen diente dabei der Vorklärbeckenablauf eines kommunalen Klärwerks (Liu *et al.*, 2004). In zahlreichen nachfolgenden Studien wurden die untersuchten MFCs ebenfalls mit diesem, für die biologische Reinigungsstufe vorbehandelten, Abwasser beschickt (Liu & Logan, 2004; Zuo *et al.*, 2008; Keith *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016). Da es mithilfe von MFCs möglich ist Kohlenstoff- wie Stickstoffverbindungen aus dem Abwasser zu entfernen, können diese somit auch als alternative biologische Reinigungsstufen angesehen werden (Abb. 7). Im Folgenden soll eine Übersicht über die bisherigen Konzepte und die Herausforderungen dieser Systeme gegeben werden.

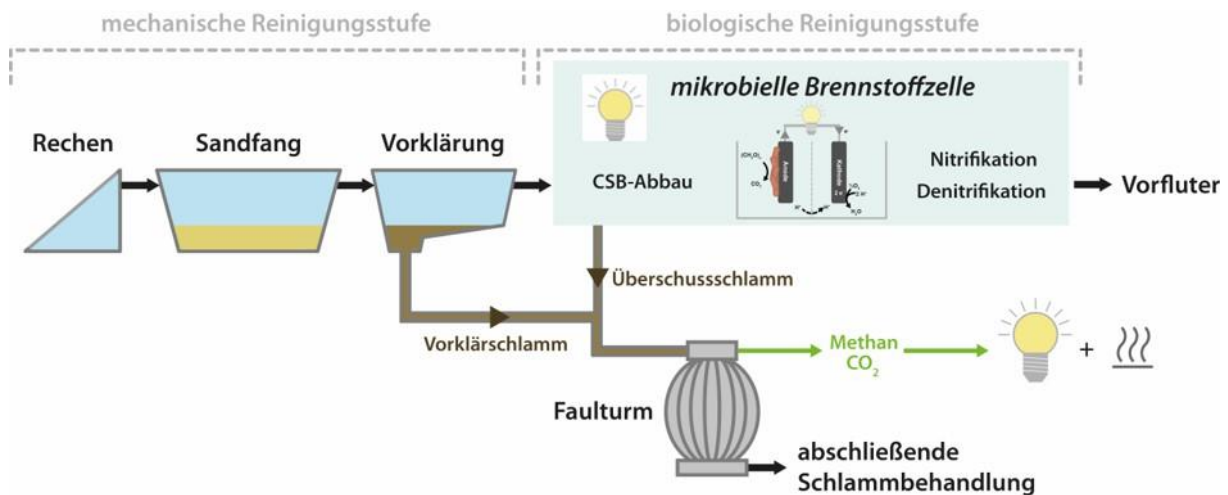


Abb. 7: Vereinfachtes Schema für den Einsatz einer mikrobiellen Brennstoffzelle in einem kommunalen Klärwerk. In der mechanischen Reinigungsstufe erfolgt zunächst die Entfernung grober und nicht gelöster Bestandteile des Abwassers über drei Stufen (Rechen, Sandfang & Vorklärung). Auf diese folgt die biologische Reinigungsstufe, die nun vollständig aus einer MFC besteht. In diesem Schritt erfolgt die Entfernung von organischen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen aus dem Abwasser. Während dieses Prozesses wird zusätzlich elektrische Energie produziert. Das dabei gereinigte Abwasser kann anschließend dem Vorfluter zugeführt werden. Der weiterhin entstehende Überschussschlamm wird mit dem Vorklärschlamm in den Faulturm gepumpt. Im Faulturm erfolgt eine Fermentation des Schlammes, bei der Biogas entsteht. Dieses kann zur Erzeugung von elektrischer Energie und Prozesswärme genutzt werden.

3.2.1 MFC-Konzepte in der Abwasserreinigung

Bisher wurden für den Einsatz von MFCs in der Abwasserreinigung verschiedene Bauformen verwendet. Der erste prinzipielle Unterschied in diesem Zusammenhang ist die Konzeption des Reaktionsraumes. Hierbei können der Anoden- und Kathodenraum über einen Separator, oder auch ohne Abtrennung, in Kontakt zueinanderstehen. Als Separatoren kamen bisher hauptsächlich ionenselektive Membranen aus Nafion[®], Fumion[®] und weiteren Materialien zum Einsatz (Rozendal *et al.*, 2008; Keith *et al.*, 2014; Christgen *et al.*, 2015). Neben diesen ionenselektiven Separatoren wurde auch die Nutzung gröbenselektiver Materialien wie z.B. Mikrofiltrationsmembranen oder grobporiger Filter aus Keramik, Nylon oder Glasgewebe untersucht (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013a; Winfield *et al.*, 2016). Dabei zeigen die beiden Grundkonzepte z.T. gegensätzliche Vor- und Nachteile: Ein separatorfreier Aufbau hat den Vorteil einer hohen Ionentransferrate, einer grundlegend einfachen Konfiguration und vergleichsweise niedriger Kosten. Dem gegenüber stehen eine Verringerung der bioelektrochemischen Reaktion der Anode durch Sauerstoff und ein hoher Innenwiderstand durch den benötigten größeren Elektrodenabstand (Liu *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006). Weiterhin wird durch die erhöhte Verfügbarkeit von Substrat an der Luftkathode, vor allem

im Abwasser, das Wachstum von nicht zur Kathodenreaktion beitragenden Mikroorganismen begünstigt. Dies kann zu einer schnellen Deaktivierung der Kathode führen (Tartakovsky & Guiot, 2006).

Der grundlegende, große Vorteil beim Einsatz eines Separators ist die Reduktion der Sauerstoff- und Substratdiffusion zwischen den beiden Kompartimenten, was zu einer Vermeidung der zuvor beschriebenen Probleme führt (Liu *et al.*, 2005). Dem gegenüber stehen verschiedene Nachteile wie z.B. Faulungsprozesse, was vor allem bei Abwasser-MFCs problematisch ist. Dabei wird die Ionenpermeabilität stark verringert, was zu einer Verminderung der MFC-Leistung über die Zeit führt (Xu *et al.*, 2012). Weiterhin kommt es beim Einsatz von Separatormembranen zu einer ungünstigen Verschiebung des pH-Gleichgewichts, was zu einem Abfall der Zellspannung führt (Rozendal *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Rozendal *et al.*, 2007). Neben diesen Problemen stellen vor allem die vergleichsweise hohen Kosten, insbesondere von Membranen, eine große Hürde für den großtechnischen Einsatz von Separatoren dar. Daher steht die Erforschung und Weiterentwicklung dieser Materialien nach wie vor im Fokus (Daud *et al.*, 2015; Pasternak *et al.*, 2016).

Weitere Unterschiede in der Bauform von Abwasser-MFCs kann man im Bereich der Elektroden finden. Diese unterscheiden sich sowohl anhand ihrer Form und Anordnung sowie ihrer Materialien. So werden meist flache, bürstenförmige oder gepackte Elektroden verwendet, die aus massiven, porösen oder gewobenen Werkstoffen bestehen können. Im Bereich der Anoden wurden bisher vor allem kohlenstoffbasierte Materialien wie z.B. Graphit verwendet, die in verschiedenen Formen verarbeitet und modifiziert werden können (Wei *et al.*, 2011; Hiegemann *et al.*, 2016). Weiterhin finden auch immer mehr Kompositmaterialien, wie z.B. mit Graphen oder Nanopartikeln beschichtete Trägermaterialien Verwendung. Ziel ist dabei eine hohe Leitfähigkeit mit möglichst großer Oberfläche und Biokompatibilität zu verbinden. Als Kathoden dienen meist modifizierte Kohlenstoffwerkstoffe, wobei die Reduktion des Überpotentials der Sauerstoffreaktion von entscheidender Bedeutung ist. Dabei werden oft Edelmetalle wie Platin, aber auch zunehmend unedle Metalle wie z.B. Nickellegierungen oder Nanopartikel aus verschiedenen Metallen verwendet. Weiterhin finden auch Biokathoden mit Edelstahl als Trägermaterial vermehrt Verwendung (Hernández-Fernández *et al.*, 2015).

Neben diesen konzeptionellen Einflussgrößen gibt es noch weitere Parameter, die für die Leistung einer Abwasser-MFC entscheidend sind. Eine große Rolle spielt hierbei die Leitfähigkeit des Abwassers, welche in sehr großen ohmschen Verlusten resultieren kann. Da

vor allem kommunale und gelegentlich auch industrielle Abwässer Leitfähigkeiten im Bereich von nur 1 mS/cm aufweisen, ist deren Einfluss auf die elektrische Gesamtleistung des Systems beträchtlich (Rozendal *et al.*, 2008).

Für den Einsatz einer MFC in der Abwasserreinigung sind jedoch nicht nur die elektrische Leistung, sondern vor allem auch der Abbau von organischen Kohlenstoff- und von Stickstoffverbindungen entscheidend. Der Anodenprozess läuft dabei unter anoxischen Bedingungen ab, wobei in der Regel ein Abbau eines Großteils des organischen Kohlenstoffs erfolgt. Ohne Sauerstoff können jedoch die meist in reduzierter Form vorliegenden Stickstoffverbindungen wie z.B. Ammonium nicht nitrifiziert werden. In vielen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Eliminierung von Stickstoffverbindungen unter der Beteiligung einer Biokathode möglich ist (Kim *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013b). Die Nitrifikation erfolgt hierbei über im Kathodenbiofilm befindliche, jedoch nicht mit der Kathode in elektrischem Kontakt stehende Nitrifizierer wie z.B. *Nitrosomonas europaea*. Diese Organismen nutzen dabei den für die kathodische Reduktionsreaktion zugeführten Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Kim *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2012). In diesem Fall dient die Kathode also nicht als Elektronendonator, sondern als mechanische Struktur für die Anlagerung dieser Organismen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben löslichen Verbindungen auch eine Kathode als Elektronendonator für die Denitrifikation in einer MFC dienen und elektrische Leistung generiert werden kann (Gregory *et al.*, 2004; Clauwaert *et al.*, 2007). An einer Biokathode kann somit theoretisch eine simultane Nitrifikation und Denitrifikation (SND, siehe Abb. 8) erfolgen, wobei viele Parameter wie z.B. der Anteil an gelöstem Sauerstoff einen großen Einfluss auf die elektrische und die Eliminierungsleistung haben (Zhang *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang wurden bisher einige technische Lösungsansätze wie z.B. Einkammer-MFCs mit Luftkathode oder Mehrkammersysteme mit indirekter Belüftung entwickelt (Virdis *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Neben diesen direkten SND-Ansätzen wurde weiterhin auch ein der Anode nachgeschalteter Anammox-Prozess beschrieben, welcher eine kathodenunabhängigen SND ermöglicht (Ali & Okabe, 2015).



Abb. 8: Summenformel der beiden an der SND beteiligten Reaktionen. Die Elektronen in Formel (2) können von einer Kathode oder einem löslichen Elektronendonator stammen.

4 *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides ist ein α -Proteobakterium, welches der nichtphylogenetischen Gruppe der Nichtschwefelpurpurbakterien angehört. Es wurde erstmals 1907 von Molisch beschrieben, wobei die Nomenklatur dieses Bakteriums im Laufe der Zeit mehrmals verändert wurde (weit verbreitetes Synonym: *Rhodopseudomonas sphaeroides*) (Molisch, 1907; van Niel, 1944; Imhoff *et al.*, 1984). Wie viele Vertreter dieser Gruppe, zeichnet sich dieser Organismus durch einen sehr vielseitigen Metabolismus aus. Die Gewinnung von Zellenergie kann hierbei über anoxygene Photosynthese (siehe Kapitel 4.1), aber auch mittels anaerober sowie aerober Atmung oder Gärung erfolgen. Unter phototrophen Stoffwechselbedingungen kann der Organismus sowohl organische Kohlenstoffverbindungen wie organische Säuren (Photoorganoheterotrophie), als auch Wasserstoff (Photolithoautotrophie) als Elektronendonator nutzen. Im Fall der Photolithoautotrophie dient CO₂ als Kohlenstoffquelle, welches bei *R. sphaeroides* über den Calvinzyklus fixiert wird (Gibson & Tabita, 1993). In der Natur ist dieser Organismus vor allem in Binnengewässern und Sedimenten anzutreffen. Dabei ist er in der Lage bei sehr geringen Lichtintensitäten von ca. 1 % des Sonnenlichts Energie zu konservieren (Cartron *et al.*, 2014) Weiterhin kann *R. sphaeroides* auch Licht vom höherwelligen, sichtbaren Bereich bis in den nahen Infrarotbereich für die Photosynthese nutzen. Verantwortlich hierfür sind spezielle Lichtsammelkomplexe (LH 1 & LH 2), die Bakteriochlorophyll *a* und Carotinoide enthalten. Diese Komplexe stehen über den LH 1-Komplex in direktem Kontakt mit dem photosynthetischen Reaktionszentrum (Cogdell *et al.*, 2004). Darüber hinaus bildet *R. sphaeroides* sog. intracytoplasmatische Membranen, um die Oberfläche für die an der Photosynthese beteiligten Elemente in der Zelle zu vergrößern (Verméglio *et al.*, 2016).

Des Weiteren ist dieser Organismus in der Lage elementaren Stickstoff zu fixieren oder unter stickstofflimitierten, photoheterotrophen Bedingungen Wasserstoff zu generieren (Dixon & Kahn, 2004; Redwood *et al.*, 2009). Letztere Eigenschaft wurde für erste bioelektrochemische Experimente mit *R. sphaeroides* genutzt. Hierbei wurde in einer sog. photo-bioelektrochemischen Zelle der durch den Organismus generierte Wasserstoff direkt an einer Platinanode oxidiert und somit ein elektrischer Strom erzeugt (Rosenbaum *et al.*, 2005). Eine weitere Eigenschaft von *R. sphaeroides* ist die Synthese komplexer Moleküle, wie z.B. Häm-Proteine oder Vitamin B12 (Verméglio & Joliot, 1999; Gray & Escalante-Semerena, 2009).

Das Genom des in dieser Arbeit verwendeten *R. sphaeroides*-Stamms WS8N besitzt eine Größe von insgesamt 4,42 Mbp, welches sich aus zwei Chromosomen (CI 3,14 Mbp & CII

0,97 Mbp) und zwei Plasmiden (0,20 & 0,11 Mbp) zusammensetzt (Porter *et al.*, 2011). Aufgrund des vielfältigen Metabolismus dieses Organismus ist eine sensible Regulierung der einzelnen Stoffwechselwege notwendig. Die Expression der Photosynthesemaschinerie wird beispielsweise abhängig von der Sauerstoffkonzentration und der Lichtintensität reguliert. Neben Hauptregulatoren wie dem PrrBCA-System, welches in etwa 20 % der gesamten Genexpression involviert ist, gibt es weitere Operons, die die Expression einzelner Teile dieser Maschinerie steuern (Mackenzie *et al.*, 2007; Metz *et al.*, 2012). So erfolgt z.B. die posttranskriptionale Regulation des Lichtsammelkomplexes LH II über das *puc*-Operon, welches unter oxischen Bedingungen reprimiert wird (Lee *et al.*, 1989; Gomelsky & Kaplan, 1995). Generell zeichnet sich *R. sphaeroides* durch eine gute genetische Zugänglichkeit aus, welche durch neue, induzierbare molekularbiologische Werkzeuge weiter verbessert wird (Ind *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Eigenschaft und der einfachen Kultivierbarkeit, dient *R. sphaeroides* bis heute als Modellorganismus zur Untersuchung der anoxygenen Photosynthese.

4.1 Anoxygene Photosynthese

In Folgendem soll der vereinfachte Ablauf der anoxygenen Photosynthese bei *R. sphaeroides* dargestellt werden (Abb. 9): Das sog. spezielle Paar (P_{865} = Bakteriochlorophyll *a* Dimer) wird über die Absorption eines Photons mithilfe der beiden Lichtsammelkomplexe LH 1 und LH 2 in einen angeregten Zustand versetzt (P_{865}^*). Dadurch wird es zu einem starken Reduktionsmittel, welches ein Elektron auf ein weiteres Bakteriochlorophyll *a* überträgt (Ladungstrennung). Dieses Elektron wird über Bakteriopheophytin und ein Ubichinon (Q_A) auf ein weiteres Ubichinonmolekül übertragen, welches nun ein Semichinon (Q_B^-) bildet. Das oxidierte P_{865} wird durch Cytochrom c_2 reduziert und erneut angeregt, wodurch ein weiteres Elektron auf das Semichinon übertragen wird. Das so generierte Ubichinol wird in der Folge über ein Eisenschwefelcluster und die Cytochrome b und c_1 des bc_1 -Komplexes oxidiert und die Elektronen auf das Cytochrom c_2 übertragen. Dabei werden Protonen vom Cyto- ins Periplasma übertragen. Der generierte Protonengradient kann einerseits zur ATP-Synthese und andererseits für die Reduktion von $NAD(P)^+$ über eine rückläufige Elektronentransportkette verwendet werden (Verméglio & Joliot, 1999; Fuchs & Schlegel, 2014).

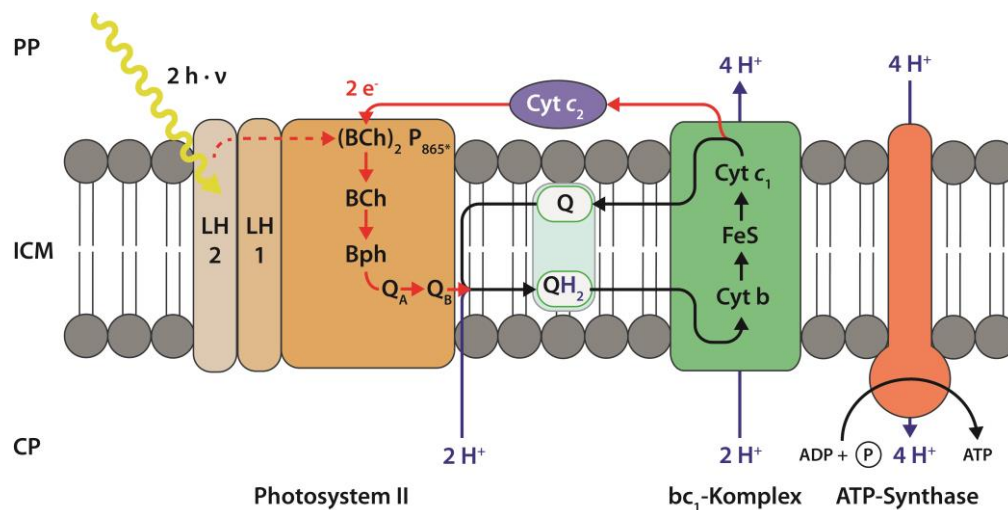


Abb. 9: Schematische Darstellung des zyklischen Elektronentransports während der anoxygenen Photosynthese in *R. sphaeroides*. Das spezielle Paar ((BCh)₂) wird über die Lichtsammelkomplexe (LH 1 & LH2) durch ein Photon ($h \cdot \nu$) in einen angeregten Zustand versetzt (P865*) und überträgt ein Elektron auf ein weiteres Bakteriochlorophyll (BCh). Über Bakteriopheophytin (BPh) und zwei Ubichinone (Q_A & Q_B) werden nach wiederholter Anregung zwei Elektronen in Form von Ubichinol (QH₂) in den Chinonpool der intracytoplasmatischen Membran (ICM) übertragen. Der bc₁-Komplex überträgt die Elektronen über Eisenschwefelcluster (FeS) und zwei Cytochrome (Cyt c₁ & Cyt b) auf Cytochrom c₂ (Cyt c₂). Dieses reduzierte Cytochrom c₂ dient nun als Elektronendonator für das spezielle Paar. Bei diesem Prozess werden Protonen (H⁺) vom Cytoplasma (CP) ins Periplasma (PP) übertragen. Über den so erzeugten Protonengradienten kann über die ATP-Synthase ATP generiert werden.

Aufgrund des fehlenden Wasserspaltungskomplexes ist *R. sphaeroides* unter phototrophen Bedingungen auf alternative Elektronendonoren wie z.B. H₂S angewiesen. Diese werden oxidiert und die Elektronen meist auf der Stufe der Chinone oder der Cytochrome in die Elektronentransportkette eingeschleust (Madigan *et al.*, 2009; Fuchs & Schlegel, 2014).

5 Zielsetzung

Die Ziele dieser Arbeit sind in drei Abschnitte aufgegliedert. Im ersten Teil der Arbeit sollten zunächst drei verschiedene BES konzipiert und entwickelt werden. Zwei dieser Systeme zielten dabei auf die detaillierte Untersuchung der Interaktion verschiedener exoelektrogener wie elektrotropher Organismen mit Elektroden aus verschiedenen Materialien ab. Von großer Wichtigkeit war hierbei Versuchsaapparaturen zu entwickeln, die ein sehr breites Spektrum an bioelektrochemischen Experimenten ermöglichen. Dies sollte durch eine große Variabilität im Bereich des Arbeitsvolumens, der Elektrodenart und -anordnung sowie der Beprobung erreicht werden. Weiterhin wurde ein BES speziell für die Behandlung von kommunalem

Abwasser entwickelt. Hierbei stand das Erreichen einer hohen Reinigungsleistung bei gleichzeitigem Einsatz möglichst günstiger und robuster Materialien im Mittelpunkt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte das zuvor beschriebene BES zur Abwasserbehandlung näher charakterisiert werden. Dabei standen vor allem die Eliminierung von organischen Kohlenstoffverbindungen und die dabei erzeugten elektrischen Ströme im Fokus. Dies sollte sowohl unter Labor- wie auch unter realen Bedingungen im Feldversuch untersucht werden, um erste Erkenntnisse über die prinzipielle Funktions- und Leistungsfähigkeit des Systems zu erhalten.

Im dritten Teil der Arbeit sollte das Nichtschwefelpurpurbakterium *R. sphaeroides* durch molekularbiologische Modifikationen in die Lage versetzt werden, eine Kohlenstoffkathode als einzigen Elektronendonator zu nutzen. Dabei stand zunächst die Einbringung und Expression von *c*-Typ Cytochromen aus *S. oneidensis* in den Zielorganismus im Mittelpunkt. Durch diese Elemente sollte die Aufnahme von Elektronen von einer Kathode im Vergleich zum Wildtyp signifikant verbessert werden. Zum Nachweis dieser These sollten die jeweilige Stämme von *R. sphaeroides* in einem der, im ersten Abschnitt beschriebenen, BES untersucht werden

II Material und Methoden

1 Mikroorganismen und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgelistet. Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stammnummer	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz/Quelle
JG22	<i>Escherichia coli</i> DH5 α Z1	<i>aci^q</i> , <i>PN25-tetR</i> , <i>Sp^R</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>), <i>Phi80</i> <i>lacZΔM15</i>	(Lutz & Bujard, 1997)
JG109	<i>E. coli</i> K12	F λ - <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	DSMZ DSM-Nr.: 498
JG144	<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , M^+ integriertes RP4::2-Tc:: Mu::Km Tn7 Tp ^r Sm ^r λ pir	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993)
JG816	<i>E. coli</i> K12 pIND4- <i>cymA-stc</i> -His optimiert	JG109 / pIND4- <i>cymA-stc</i> -His- optimiert	diese Arbeit
JG874	<i>E. coli</i> DH5 α Z1 pPUC- <i>cymA-stc</i> -His optimiert	JG22 / pPUC- <i>cymA-stc</i> -His- optimiert	diese Arbeit
JG949	<i>E. coli</i> Emscher Genossenschaft (EMG)-Isolat	Wildtyp	nicht veröffentlicht, bereitgestellt von S. Epple
JG957	<i>E. coli</i> S17-1 λ pir pIND4- <i>cymA-stc</i>	JG144 / pIND4- <i>cymA-stc</i>	diese Arbeit

Stammnummer	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz/Quelle
JG958	<i>E. coli</i> S17-1 λ pir pIND4- <i>cymA-stc</i> -His	JG144 / pIND4- <i>cymA-stc</i> -His	diese Arbeit
JG959	<i>E. coli</i> S17-1 λ pir pPUC- <i>cymA-stc</i>	JG144 / pUC- <i>cymA-stc</i>	diese Arbeit
JG960	<i>E. coli</i> S17-1 λ pir pPUC- <i>cymA-stc</i> -His	JG144 / pPUC <i>cymA-stc</i> -His	diese Arbeit
JG582	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> WS8N	Wildtyp	(Sokkett <i>et al.</i> , 1990)
JG963	<i>R. sphaeroides</i> WS8N pIND4- <i>cymA-stc</i>	JG582 / pIND4- <i>cymA-stc</i>	diese Arbeit
JG964	<i>R. sphaeroides</i> WS8N pIND4- <i>cymA-stc</i> -His	JG582 / pIND4- <i>cymA-stc</i> -His	diese Arbeit
JG965	<i>R. sphaeroides</i> WS8N pPUC- <i>cymA-stc</i>	JG582 / pPUC- <i>cymA-stc</i>	diese Arbeit
JG966	<i>R. sphaeroides</i> WS8N pPUC- <i>cymA-stc</i> -His	JG582 / pPUC- <i>cymA-stc</i> -His	diese Arbeit
JG7	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Wildtyp	(Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999)
JG948	<i>S. putrefaciens</i> EMG-Isolat	Wildtyp	nicht veröffentlicht, bereitgestellt von S. Epple
JG407	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	Wildtyp	DSMZ DSM-Nr.: 12127

Stammnummer	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz/Quelle
JG950	<i>Enterococcus faecium</i> EMG-Isolat	Wildtyp	nicht veröffentlicht, bereitgestellt von S. Epple
JG951	<i>Clostridium</i> sp. EMG-Isolat	Wildtyp	nicht veröffentlicht, bereitgestellt von S. Epple
JG953	<i>Bacteroides</i> sp.	Wildtyp	nicht veröffentlicht, bereitgestellt von S. Epple
JG954	<i>Romboutsia</i> sp.	Wildtyp	nicht veröffentlicht, bereitgestellt von S. Epple

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Nummer	Name	relevanter Genotyp	Referenz/Quelle
1	pIND4	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , repA, <i>lacI</i> , P _{lac}	(Ind <i>et al.</i> , 2009)
2	pSCVAM	KanR, R6K Origin	(Förster, 2014)
3	pIND4- <i>cymA-stc</i> -His- optimiert	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , repA, <i>lacI</i> , P _{lac} , <i>cymA</i> _{His-Tag} (N-terminal), <i>stc</i> _{His-Tag} (C-terminal) Codon-optimiert	diese Arbeit
4	pPUC- <i>cymA-stc</i> -His- optimiert	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , repA, P _{PUC} , <i>cymA</i> _{His-Tag} (N-terminal), <i>stc</i> _{His-Tag} (C-terminal) Codon-optimiert	diese Arbeit

Nummer	Name	relevanter Genotyp	Referenz/Quelle
5	pSCVAM- <i>cymA</i> -His _{N-terminal} - <i>stc</i> -His _{C-terminal}	KanR, R6K Origin <i>cymA</i> _{His-Tag (N-terminal)} , <i>stc</i> _{His-Tag (C-terminal)} Codon-optimiert	diese Arbeit
6	pSCVAM- <i>cymA</i> -His _{N+C-terminal} - <i>stc</i> -His _{C-terminal}	KanR, R6K Origin <i>cymA</i> _{His-Tag (N+C-terminal)} , <i>stc</i> _{His-Tag (C-terminal)} Codon-optimiert	diese Arbeit
7	pSCVAM- <i>cymA</i> - <i>stc</i> -His _{C-terminal}	KanR, R6K Origin <i>cymA</i> , <i>stc</i> _{His-Tag (C-terminal)} Codon-optimiert	diese Arbeit
8	pSCVAM- <i>cymA</i> -His _{C-terminal} - <i>stc</i> -His _{C-terminal}	KanR, R6K Origin <i>cymA</i> _{His-Tag (C-terminal)} , <i>stc</i> _{His-Tag (C-terminal)} Codon-optimiert	diese Arbeit
9	pSCVAM- <i>cymA-stc</i>	KanR, R6K Origin <i>cymA</i> , <i>stc</i> Codon-optimiert	diese Arbeit
10	pIND4- <i>cymA-stc</i>	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , repA, <i>lacI</i> , P _{lac} , <i>cymA</i> , <i>stc</i> Codon-optimiert	diese Arbeit
11	pPUC- <i>cymA-stc</i>	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , repA, P _{PUC} , <i>cymA</i> , <i>stc</i> Codon-optimiert	diese Arbeit
12	pIND4- <i>cymA-stc</i> -His	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , repA, <i>lacI</i> , P _{lac} , <i>cymA</i> _{His-Tag (C-terminal)} , <i>stc</i> _{His-Tag (C-terminal)} Codon-optimiert	diese Arbeit

Nummer	Name	relevanter Genotyp	Referenz/Quelle
13	pPUC- <i>cymA-stc</i> -His	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , repA, P _{PUC} , <i>cymA</i> _{His} -Tag (C-terminal), <i>stc</i> _{His} -Tag (C-terminal) Codon-optimiert	diese Arbeit

2 Chemikalien

Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Nippon Genetics (Düren), Roche Diagnostics (Mannheim), SERVA (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Difco (Augsburg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

3 Kultivierung von Mikroorganismen und Stammkulturhaltung

3.1 Kulturmedien

Alle verwendeten Komplexmedien und Puffer wurden mit desionisiertem Wasser (dH₂O), alle Minimalmedien, Spuren- und Vitaminlösungen mit zweifach deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt. Falls nötig, wurden diese zusätzlich durch Autoklavieren (121 °C, 1 bar Überdruck, 20 min, VE-150 & DE-23, Systec, Linden) oder Filtrieren (Spritzenfilter, Porengröße 0,22 µm, Sarstedt, Nümbrecht) sterilisiert. Falls nötig, wurden den Medien nach der Sterilisation Antibiotika und ggf. Induktoren in den benötigten Konzentrationen zugesetzt. Für die Herstellung von Kulturplatten, wurden die jeweiligen Medien vor dem Autoklavieren mit 2 % Agar versehen.

3.1.1 Medien für aerobe Kulturen

Die für die aerobe Stammkultivierung verwendeten Medien sind in Tab. 3 dargestellt. Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte, mit Ausnahme von Stamm JG949, in LB-Medium. Die Kultivierung von *S. oneidensis* und der EMG-Isolate von *E. coli*, *S. putrefaciens* und *Enterococcus faecium* wurde in SOB-Medium durchgeführt. Zur aeroben Anzucht von *R. sphaeroides* wurde RS-OH-Medium (OH = organo-heterotroph) verwendet. Diesem

wurden nach dem Autoklavieren 10 ml/l der in Tab. 4 gezeigten Spurenelementlösung, 10 ml/l der Vitamin- und 1 ml/l Vitamin B12-Lösung (Tab. 5) unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

Tab. 3: Zusammensetzung der Medien zur aeroben Kultivierung verschiedener Stämme.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
LB-Medium		
Baktotrypton	10 g	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	5 g	8,6 mM
SOB-Medium		
Baktotrypton	20 g	2 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	0,58 g	1,0 mM
KCl	0,19 g	2,5 mM
RS-OH-Medium		
K ₂ HPO ₄	3,48 g	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	3,78 mM
L-Glutaminsäure	0,1 g	0,68 mM
L-Asparaginsäure	0,04 g	0,3 mM
NaCl	0,5 g	8,6 mM
Nitritotriessigsäure	0,2 g	1,0 mM
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	0,3 g	1,22 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,034 g	0,2 mM
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	0,002 g	7 µM
Succinat	4,0 g	33,9 mM
pH-Wert = 7,0		

Tab. 4: Zusammensetzung der 100-fach konzentrierten Spurenelementlösung für *R. sphaeroides*.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
Na ₂ -EDTA	3,0 g	8,06 mM
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	1,1 g	3,96 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19 g	0,8 mM
ZnCl ₂	0,042 g	0,31 mM
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g	0,18 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,018 g	0,07 mM
H ₃ BO ₃	0,3 g	4,85 mM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002 g	0,01 mM
MgCl ₂ x 4 H ₂ O	0,05 g	0,25 mM

Tab. 5: Zusammensetzung der Vitaminlösungen für *R. sphaeroides*.

Substanz	Einwaage pro Liter
Vitaminlösung (100-fach konzentriert)	
4-Aminobenzoesäure	4 mg
Biotin	1 mg
Nicotinsäure	10 mg
Ca-DL-Panthenat	5 mg
Pyrodoxin-HCl	15 mg
Thiamin-Cl	10 mg
Vitamin B12-Lösung (1000-fach konzentriert)	
Vitamin B12	100 mg

3.1.2 Medien für anaerobe Kulturen

Die Herstellung aller sauerstofffreien Medien und Lösungen erfolgte, falls nicht anders angegeben, wie im Folgenden dargestellt:

a) Medien für strikt-anaerobe Mikroorganismen wurden durch Aufkochen und anschließendes Begasen anaerobisiert. Nach dem Lösen der thermisch stabilen Komponenten wurde zunächst der gewünschte pH-Wert eingestellt. Daraufhin wurden die Medien in Laborflaschen (Volumen: 100 – 2000 ml, DURAN, Mainz) gefüllt, jeweils mit einem Magnetrührstab (Roth) versehen und mit einem Gummistopfen verschlossen. Auf einem Magnet-Heizrührer (MR-Hei-Standard, Heidolph, Schwabach) wurden diese anschließend unter Rühren erhitzt und für 5 min aufgeköcht. Zum Druckausgleich wurden dabei zwei Einwegkanülen in den Stopfen eingebracht. Durch diesen Schritt sollte sämtlicher Sauerstoff entfernt werden. Nach erfolgtem Aufkochen wurden die Kanülen wieder entfernt und die Medien unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden sie mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch (80/20, Air Liquide, Düsseldorf), zur Regenerierung des enthaltenen Carbonat-Puffersystems, 30 min unter Rühren begast und danach autoklaviert. Die so behandelten Medien wurden unter sterilen Bedingungen mit den noch fehlenden Bestandteilen komplementiert und der pH-Wert nachjustiert.

b) Bei Medien für fakultativ-anaerobe Mikroorganismen und thermisch stabilen Lösungen wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden die verschiedenen Komponenten wie oben beschrieben gelöst und der pH-Wert eingestellt. Die Lösungen wurden abgefüllt und danach, in einem vier minütigen Zyklus von Stickstoffbegasung (Reinheit = 99,9 %, Air Liquide) und Anlegen eines Vakuums, weitgehend von Sauerstoff befreit (abhängig vom Flaschenvolumen 15-20 Wiederholungen). Anschließend erfolgte die Sterilisation durch Autoklavieren und die Komplementierung mit den noch fehlenden Bestandteilen.

c) Thermisch instabile Lösungen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt und anschließend mittels Filtration sterilisiert. Die Entfernung des Sauerstoffs erfolgte wie in Abschnitt b) beschrieben unter sterilen Bedingungen.

Bei Bedarf wurden die fertiggestellten Lösungen unter sterilen, anaeroben Bedingungen in kleinere Volumina überführt. Dabei wurden die Spenderflaschen über sterile Einwegkanülen mit zuvor anaerobisierten und sterilisierten Empfängerflaschen gekoppelt. Durch Anlegen eines Überdrucks mit sterilgefiltertem Stickstoff bzw. N₂/CO₂-Gasgemisch wurde das jeweilige Medium in die Empfängerflasche gepresst.

Tab. 6: Zusammensetzung des Kulturmediums für *G. sulfurreducens*.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
KH ₂ PO ₄	0,42 g	3 mM
K ₂ HPO ₄	0,22 g	1 mM
NH ₄ Cl	0,2 g	4 mM
KCl	0,38 g	5 mM
NaCl	0,36 g	6 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,21 g	1 mM
NaHCO ₃	1,80 g	21 mM
Na ₂ CO ₃	0,5 g	5 mM
CaCl ₂ * 6H ₂ O	0,04 g	10 mM
Na-Acetat	4,1 g	50 mM
Fumarsäure	11,6 g	100 mM
NB-Spurenelement-Lösung (Tab. 7)	10 ml	-
Selenit-Wolframat-Lösung (Tab. 8)	1 ml	-

pH-Wert = 7,2, aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren

Komplementieren

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
GS-Vitaminlösung (Tab. 9)	10 ml	-
10 % (w/v) Hefeextrakt-Lösung	10 ml	0,1 % (w/v)
0,5 M Cystein-Lösung	2 ml	1 mM
0,2 M Na-Ascorbat-Lösung	1 ml	0,2 mM

Die anaerobe Kultivierung von *G. sulfurreducens* erfolgte in dem in Tab. 6 dargestellten Medium. Die Herstellung des Mediums erfolgte dabei wie in Abschnitt a) beschrieben. Die dabei verwendeten Spurenelement- und Selenit-Wolframat-Lösungen sind in Tab. 7 bzw. Tab. 8 dargestellt.

Das Medium wurde nach dem Autoklavieren wie in Tab. 6 unten dargestellt, mit sterilen, anaeroben Lösungen (Vitamine siehe Tab. 9) komplementiert und der pH-Wert mit 1 M NaOH-Lösung final auf 7,2 eingestellt.

Tab. 7: Zusammensetzung der der 100-fach konzentrierten NB-Spurenelemente.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
Nitriloessigsäure*	2,14 g	11,2 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1 g	0,5 mM
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 g	1,1 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,17 g	0,7 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g	0,7 mM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,3 g	1,8 mM
AlK(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,005 g	0,01 mM
H ₃ BO ₃	0,005 g	0,08 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,11 g	0,5 mM
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	0,11 g	0,4 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,2 g	0,6 mM

* pH-Wert mit KOH auf 6,5 einstellen

Tab. 8: Zusammensetzung der 1000-fach konzentrierten Selenit-Wolframat-Lösung

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
NaOH	2,14 g	11,2 mM
Na ₂ SeO ₃	0,1 g	0,5 mM
Na ₂ WO ₄ x 2H ₂ O	0,3 g	1,1 mM

Tab. 9: Zusammensetzung der 100-fach konzentrierten GS-Vitaminlösung.

Substanz	Einwaage pro Liter
4-Aminobenzoessäure	5 mg
Biotin	2 mg
Folsäure	2 mg
Liponsäure	5 mg
Nicotinsäure	5 mg
Ca-DL-Panthenat	5 mg
Pyrodoxin-HCl	10 mg
Riboflavin	5 mg
Thiamin-Cl	5 mg
Vitamin B12	0,1 mg

Das Eisencitrat-Medium zur Kultivierung von *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp. und *Romboutsia* sp. wurde wie in Tab. 10 beschrieben weitgehend gemäß Abschnitt a) hergestellt. Ein Unterschied hierbei war, dass das Eisencitrat zunächst durch Aufkochen in 200 ml ddH₂O gelöst und anschließend mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 titriert wurde. Die im Folgenden verwendeten Spurenelement- und Selenit-Wolframat-Lösungen sind in Tab. 7 bzw. Tab. 8 dargestellt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium wie in Tab. 10 unten dargestellt, mit sterilen, anaeroben Lösungen (Vitamine siehe Tab. 9) komplementiert. Weiterhin wurden bei den für *Clostridium* sp. und *Bacteroides* sp. verwendeten Medien noch 100 ml einer 20 %igen, anaeroben, sterilen Glucose-Lösung zugegeben (2 % Endkonzentration) und der pH-Wert mit 1 M NaOH-Lösung final auf 7,2 eingestellt.

Für die Beschickung des zur Abwasserbehandlung entworfenen BES-Reaktors (siehe Kapitel III, Abschnitt 1.2), wurde in Betriebsphase I das in Tab. 11 dargestellte synthetische Abwasser verwendet. Dieses Medium basiert auf der DIN EN ISO-Norm 11733 (synthetisches Abwasser 2; CSB 400 mg/l) und wurde, bezüglich seiner Leitfähigkeit und des Kohlenstoffgehalts, an die in der Betriebsphase II vorherrschenden Bedingungen angepasst.

Tab. 10: Zusammensetzung des Eisencitrat-Mediums.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
Eisencitrat → in 200 ml ddH ₂ O aufkochen, pH-Wert = 7	9,8 g	40 mM
KH ₂ PO ₄	0,42 g	3 mM
K ₂ HPO ₄	0,22 g	1 mM
NH ₄ Cl	0,2 g	4 mM
KCl	0,38 g	5 mM
NaCl	0,36 g	6 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,21 g	1 mM
NaHCO ₃	1,80 g	21 mM
Na ₂ CO ₃	0,5 g	5 mM
Na-Lactat (50 % v/v)	4,48 g	20 mM
Na-Acetat	0,82 g	10 mM
Na-Propionat	0,42 g	4,4 mM
NB-Spurenelement-Lösung (Tab. 7)	10 ml	-
Selenit-Wolframat-Lösung (Tab. 8)	1 ml	-

aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren

Komplementieren

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
GS-Vitaminlösung (Tab. 9)	10 ml	-
10 % (w/v) Hefeextrakt-Lösung	10 ml	0,1 % (w/v)
0,5 M Cystein-Lösung	2 ml	1 mM
0,2 M Na-Ascorbat-Lösung	1 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 ml	0,4 mM

Für die Herstellung wurden alle Komponenten in 20-facher Konzentration in 1 l dH₂O gelöst und der pH-Wert, wegen der zusätzlich zugesetzten Säuren, auf 7,0 eingestellt. Die fertige Lösung wurde anschließend in einen 20 l Glasbehälter überführt, welcher mit Trinkwasser auf

ein Endvolumen von 20 l aufgefüllt wurde. Danach wurde dieser mit einem Gummistopfen verschlossen, welcher mit einem Gaseinleitungs-, einem Abgas- und einem Entnahmerohr versehen war. Nach erfolgtem Autoklavieren wurde das so hergestellte synthetische Abwasser mit, durch einen Sterilfilter geleitetem, Stickstoff kontinuierlich begast.

Tab. 11: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers (abgewandelt nach DIN 11733).

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
Pepton	692 mg	0,07 %
Fleischextrakt	138 mg	0,01 %
Glucose x H ₂ O	19 mg	10 µM
NH ₄ Cl	23 mg	430 µM
KH ₂ PO ₄	16 mg	118 µM
NaCl	486 mg	8,3 mM
NaHCO ₃	294 mg	3,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	32 mg	180 µM
Bernsteinsäure	65 mg	550 µM
Na-Propionat	23 mg	293 µM
Na-Acetat	42 mg	512 µM
Fe(III)Cl ₃ x 6 H ₂ O	40 mg	150 µM

pH-Wert = 7,0

Für die Herstellung anaerober Kulturen von *R. sphaeroides* wurde das in Tab. 3 gezeigte RS-OH- bzw. das in Tab. 12 dargestellte RS-PLA-Medium verwendet. Das für eine photoorgano-heterotrophe Kultivierung verwendete RS-OH-Medium wurde dabei wie in Abschnitt b) beschrieben hergestellt, anaerobisiert und sterilisiert. Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml/l der in Tab. 4 gezeigten Spurenelementlösung, 10 ml/l der Vitamin- und 1 ml/l der Vitamin B12-Lösung (Tab. 5) unter sterilen Bedingungen zugesetzt und der pH-Wert mit 1 M NaOH-Lösung final auf 7,0 eingestellt.

Für eine photo-litho-autotrophe Kultivierung wurde das RS-PLA-Medium (PLA = photo-litho-autotroph) verwendet. Dieses wurde aufgrund des enthaltenen Carbonat-Puffersystems, wie in Abschnitt a) beschrieben, hergestellt, anaerobisiert und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml/l der in Tab. 4 gezeigten Spurenelementlösung, 10 ml/l der Vitamin- und 1 ml/l der Vitamin B12-Lösung (Tab. 5) unter sterilen Bedingungen zugesetzt und der pH-Wert mit 1 M HCl-Lösung final auf 7,0 eingestellt.

Tab. 12: Zusammensetzung des RS-PLA-Mediums.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
K ₂ HPO ₄	0,35 g	2 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	3,8 mM
NaCl	0,5 g	8,6 mM
NaHCO ₃	1,8 g	21 mM
Na ₂ CO ₃	0,5 g	5 mM
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	0,3 g	1,22 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,034 g	0,2 mM
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	0,002 g	7 µM
pH-Wert = 7,0		

3.2 Kultivierung und Zellernte

Das Wachstum der verschiedenen Flüssigkulturen wurde durch Messung der Trübung verfolgt. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm, $\lambda = 650$ nm (*R. sphaeroides*) oder $\lambda = 655$ nm (*Clostridium*, *Bacteroides* & *Romboutsia*) mit einem Spectronic Genesys 20 Photometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Alle hergestellten Vorkulturen wurden entweder mit einer Einzelkolonie von der jeweiligen Kulturplatte (fakultativ anaerobe Stämme) oder direkt mit einer Gefrierkultur (strikt anaerobe Stämme) in einer sauerstofffreien Atmosphäre (Vinyl Clove Box, COY Lab Products, Grass Lake, USA) inokuliert.

Die Herstellung der Kulturen für die initiale Inokulierung des, zur Abwasserbehandlung entworfenen, MFC-Reaktors wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden aerobe Vorkulturen der EMG-Isolate JG949 (*E. coli*), JG948 (*S. putrefaciens*), JG950 (*Enterococcus faecium*) und des Laborstammes JG7 (*S. oneidensis*) in kleinen Volumina SOB-Medium (3-5 ml, Reagenzröhrchen mit Deckel) hergestellt. Diese wurden in Schüttelinkubatoren bei 150 U/min und 30 °C (JG7 & JG948) bzw. 37 °C (JG949 & JG950) über Nacht inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden im Anschluss je Stamm mehrere Erlenmeyerkolben, die ein Gesamtvolumen von 2000 ml SOB-Medium aufwiesen, mit einer OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Diese Kulturansätze wurden, wie zuvor beschrieben, erneut über Nacht (ü. N.) inkubiert.

Des Weiteren wurden anaerobe Vorkulturen der EMG-Isolate JG951 (*Clostridium* sp.), JG953 (*Bacteroides* sp.), JG954 (*Romboutsia* sp.) und des Laborstammes JG407 (*G. sulfurreducens*) in den jeweiligen Medien (Abschnitt 3.1.2) in anaeroben Kulturröhrchen (10 ml; Dunn Labortechnik, Asbach) hergestellt. Diese wurden in Brutschränken stehend bei 30 °C (JG407) bzw. 37 °C (JG951, JG953 & JG954) ü. N. inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurde im Anschluss je Stamm eine Laborflasche, die jeweils 2000 ml des entsprechenden anaeroben Mediums enthielt, mit einer OD₆₅₅ von 0,05 inokuliert. Diese Kulturansätze wurden, wie zuvor beschrieben, erneut ü. N. im Brutschrank inkubiert.

Nach erfolgter Kultivierung wurden alle in den beiden vorherigen Abschnitten beschriebenen Kulturen auf Eis heruntergekühlt und schrittweise bei 4 °C und 8983 g abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden jeweils in 10 ml synthetischem Abwasser (Tab. 11) unter sterilen Bedingungen resuspendiert und bis zur vorgesehenen Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Die Kultivierung der sonstigen, in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme erfolgte, falls nicht anders beschrieben, aerob in LB-Medium. Je nach Verwendung wurden kleine (3-5 ml, Kulturröhrchen mit Deckel) oder größere Volumina (Erlenmeyerkolben) hergestellt. Bei Bedarf wurden die Kulturen mit Antibiotika versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Schüttelinkubator (150 U/min). Abhängig von der weiteren Verwendung wurden die Kulturansätze, nach verschiedenen Zeitpunkten, in unterschiedlichen Maßstäben mittels Zentrifugation geerntet.

Die Herstellung der verwendeten *R. sphaeroides*-Kulturen wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden für alle anaeroben Kulturansätze aerobe Vorkulturen in Erlenmeyerkolben hergestellt, die jeweils 250 ml RS-OH-Medium (Tab. 3) enthielten. Bei Bedarf wurden diese mit Antibiotikum versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C im Schüttelinkubator bis eine

OD₆₅₀ von 0,3 bzw. 0,6 (aerobe Kulturen) erreicht war. Daraufhin wurden die Kulturansätze bei 4 °C und 9000 g für 5 min abzentrifugiert und einmal in 250 ml des in

Tab. 13 13 dargestellten Puffers unter sterilen Bedingungen gewaschen. Die Pellets der aerob kultivierten Zellen (chemoorganoheterotroph) wurden direkt für den Zellaufschluss und die folgende Expressionsanalyse (siehe Abschnitt 6) verwendet, oder zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Zellpellets aller anderen *R. sphaeroides*-Stämme wurden zur weiteren Kultivierung (photoorganoheterotroph) in Puffer resuspendiert und in jeweils 250 ml anaerobes RS-OH-Medium überführt. Dieses war ggf. mit Antibiotikum und Induktor versehen.

Tab. 13: Zusammensetzung des Resuspensionspuffers.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
K ₂ HPO ₄	0,35 g	2 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	3,8 mM
NaCl	0,5 g	8,6 mM
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	0,3 g	1,22 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,034 g	0,2 mM

pH-Wert =7,0

Diese Kulturansätze wurden in einem Schüttelinkubator bei 30 °C und 150 U/min inkubiert und mit Breitband-LED-Licht (Leuchtmittelabstand 20 cm, LED Star Classic A, OSRAM, München) bestrahlt. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₅₀ von 0,6 weiterkultiviert und anschließend bei 4 °C und 9000 g für 5 min abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde auf zwei unterschiedliche Weisen weiterverwendet: Zum einen wurde es, wie oben beschrieben, direkt für den Zellaufschluss weiterverwendet oder durch Einfrieren konserviert. Zum anderen wurde es als Inokulum für die Elektrotrophie-Experimente verwendet. Hierbei wurden die Zellen einmal in 250 ml eisgekühltem Resuspensionpuffer, unter sterilen Bedingungen, gewaschen und anschließend in 3-5 ml Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 280 ml RS-PLA-Medium mit einer OD₆₅₀ von 0,5 inokuliert und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3 Stammkonservierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden als Gefrierkulturen in mindestens doppelter Ausführung konserviert. Für die strikt anaeroben Mikroorganismen wurden zusätzliche Gefrierkulturen für die Reaktivierung angesetzt. Hierfür wurde jeweils eine dichte Kultur ($OD > 1,5$) mit 5 % (v/v) DMSO oder Glycerin versetzt und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C und in flüssigem Stickstoff eingelagert. Um Bakterien aus den Gefrierkulturen zu reaktivieren, wurden entweder einige Zellen aus dem jeweiligen Röhrchen herausgekratzt und auf einer Agarplatte ausgestrichen oder ggf. die komplette Gefrierkultur in Medium aufgenommen.

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 DNA-Isolierung und Aufreinigung

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernacht-Kulturen von transformierten *E. coli* Zellen mit einem kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungskit (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben präpariert. DNA-Fragmente, die mittels PCR (**P**olymerase **c**hain **r**eaction = Polymerase Kettenreaktion) hergestellt (siehe 4.2) worden waren, wurden zunächst auf ein Agarosegel geladen, um die Fragmentlänge der Amplifikate zu detektieren (siehe Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen). Die DNA-Stränge wurden mit UV-Licht (302 nm) visualisiert und die Banden von Interesse mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden anschließend mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Überprüfung von Restriktionsreaktionen (siehe 4.4.1) wurden jeweils nur 5 µl Reaktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen. Entsprach das Fragment der erwarteten Größe, wurde der restliche Restriktionsansatz direkt mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um die Effizienz der Colony-PCR zu erhöhen, wurden die Zellen vorbehandelt. Dafür wurde je eine Kolonie in 20 µl des in Tab.14 aufgeführten „Quick-xDNA-Preparation“ Puffer (Charette & Cosson, 2004) resuspendiert, mit 1 µl ProteinaseK (Konzentration 20 mg/ml) versehen und für 5 min inkubiert. Danach wurde die ProteinaseK durch 5-minütiges inkubieren bei 95 °C inaktiviert und der Ansatz für 1 min bei 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand diente als PCR-Matrize.

Tab. 14: Zusammensetzung des „Quick-xDNA-Preparation“ Puffers.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
KCl	3,73 g	50 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,51 g	2,5 mM
NP40	4,5 g	0,45% (w/v)
Tris (pH=8,3)	1,21 g	10 mM
Tween 20	4,5 g	0,45% (w/v)

4.2 Amplifikation von DNA

Die PCR wurde für die gezielte Amplifikation von Genen oder einzelnen DNA-Fragmenten eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in einem Thermocycler (C1000, S1000, MJMini, Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Methode wurde zur präparativen Vervielfältigung von DNA, sowie zur analytischen Kontrolle von Klonen oder hergestellten Fragmenten eingesetzt. Die Oligonukleotide, die dabei als Primer eingesetzt wurden, sind in Tab. 15 dargestellt und wurden jeweils auf eine Arbeitskonzentration von 2 pmol/μl verdünnt.

Für die analytischen Kontrollen wurde eine gebrauchsfertige Lösung (MangoMix, Bioline, Luckenwalde) verwendet. Diese enthält eine modifizierte Form der Taq DNA-Polymerase, der eine 5'→3' Exonucleaseaktivität fehlt. Für die Herstellung von zum Klonieren benötigten Fragmenten, wurde eine Pfu-Polymerase (iProof, Biorad, München) verwendet. Diese verfügt über eine zusätzliche „proof reading“ Aktivität, wodurch das Auftreten von Mutationen während der PCR verringert werden sollte.

Die Zusammensetzungen der Standard-PCR-Ansätze sind in Tab. 16 dargestellt. Dabei wurde für mehrere PCR-Reaktionen, die den gleichen Ansatz erforderten, eine größere Menge in einem Reaktionsgefäß (Mastermix) hergestellt.

Tab. 15: Als Primer verwendete Oligonukleotide.

interne Nummer	Name des Primers	Sequenz (5' → 3')
573	pSCVAM_for_New	GCCGAAATCGGCAAAATCC
574	pSCVAM_rev	GGGCTTACATGGCGATAGC
1058	pIND4_for	CATTTCCCCGAAAAGTGCC
1059	pIND4_rev	ATTGGGATATATCAACGGTG
1763	<i>cymA-stc_for</i>	ATACAGCCATGGCCCATCAC
1764	<i>cymA-stc_rev</i>	CTAATTAAGCTTCAGTGATGGTGATG
1876	<i>puc</i> -Promotor_for	CACGCAGATAGAATTTCGATGCCCGGATGGCTGC
1877	<i>puc</i> -Promotor_rev	GGCACGTAGCCATGGAGCCGAGCCACGGGGTC
1884	pPUC_test_for	TCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTTCGC
1885	pPUC_test_rev	CACGACCCCGACACGATG
2022	insert_rev_pMQ150 _cymA_sTC	TTGGTGTTGCGCGCACTCTCCATGACGTCATAGGTTGTCAT ATATTTTCATATTCTCACCAATAAAAAACGC
2052	<i>cymA</i> -His-c- term_for	CACCATCATCACCACCATTGATGTAGTATGAGGAGAAATTA AC
2053	<i>cymA</i> -His-c- term_rev	ATGGTGGTGATGATGGTGGCCCTTCGGATAGGGG
2054	<i>cymA</i> -no-His- Tag_for	AGTGCAGCCATGGGCAACTGGCGCGCC
2061	pPUC- <i>cymA</i> - <i>sTC</i> _seq_for	TCTTCGGTGGCATGGCG
2062	pSCVAM- <i>cymA</i> _for	AACTGGCGCGCCCTGTTC
2063	pSCVAM- <i>cymA</i> _rev	GCCCATGGCTGCACTATC
2064	pSCVAM- <i>sTC</i> _for	TGAAGCTTGTATGCAAATCG
2065	pSCVAM- <i>sTC</i> _rev	TTTCTTCAGCACCGAGGC

Tab. 16: Standard-PCR-Ansätze.

analytische-PCR (MangoMix)	präparative-PCR (iProof) (50 µl)
7,5 µl „ready to use“ MangoMix	10 µl 5X GC-iProof-Puffer
3,75 µl forward Primer (2 pmol/µl)	1 µl iProof-Polymerase
3,75 µl reverse Primer (2 pmol/µl)	1 µl dNTPs
Matrize: x µl DNA-Lösung (ca. 2 ng)	1,5 µl DMSO
	12,5 µl forward Primer (2 pmol/µl)
	12,5 µl reverse Primer (2 pmol/µl)
	Matrize: x µl DNA-Lösung (ca. 2 ng)
	Der Ansatz wurde mit ddH ₂ O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt und gemischt.

Als Matrize wurden dabei DNA-Lösungen verwendet, die entweder aufgereinigte Plasmid-DNA oder mittels der „Quick-Cell-Lysis“-Methode (siehe 4.2) gewonnene DNA enthielten. Deren DNA-Konzentration wurde bestimmt (siehe 4.3) und pro Reaktion eine Gesamt-DNA-Menge von ca. 2 ng eingesetzt. Tab. 17 zeigt die Thermocycler-Standardprotokolle für beide Polymerasen, die für alle PCR-Reaktionen benutzt wurden.

Tab. 17: Thermocycler-Standardprotokolle.

Phase	analytische PCR (MangoMix)		präparative-PCR iProof	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	95 °C	5:00 min	98 °C	2:30 min
Denaturierung	95 °C	0:30 min	98 °C	0:10 min
Annealing der Primer	55-60 °C	0:30 min	55-60 °C	0:30 min
Elongation	72 °C	1 min/kb	72 °C	0:30 min/kb
finale Elongation	72 °C	10:00 min	72 °C	10:00 min
kühlen	12 °C	unendlich	12 °C	unendlich

Als Denaturierungstemperatur wurden 95 °C für die Taq-Polymerase und 98 °C für die iProof DNA-Polymerase gewählt. Die Annealing-Temperatur wurde entsprechend der optimalen Anlagerungstemperatur des jeweiligen Primerpaares angepasst. Die Elongationszeit wurde abhängig von der zu erwarteten Größe des PCR-Produkts bestimmt.

4.3 DNA-Quantifizierung

Für die Quantifizierung der DNA-Konzentration in einer Lösung wurde ein Nano-Drop-Spectrophotometer (Nano Drop 2000, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) verwendet. Dabei wurde 1 µl der zu bestimmenden Probe als Tropfen auf die Sensorlinse pipettiert und das Spektrum der Lösung gegenüber ddH₂O (Nullwert) gemessen. Über die Extinktion bei 260 nm wurde die DNA-Konzentration ermittelt. Über die Bildung der Quotienten der Werte bei 260/280 nm bzw. 260/230 nm kann eine Aussage über die Reinheit der DNA getroffen werden. Liegen die Messwerte bei 1,8 (260/280 nm) bzw. zwischen 1,8 und 2,2 (260/230 nm) konnte von reiner DNA ausgegangen werden.

4.4 Klonierungstechniken

4.4.1 Restriktion und Ligation

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt a.M). Dabei wurden analytische (15 µl) und präparative Ansätze (50 µl) hergestellt. Die Inkubationszeit von Plasmid-DNA und PCR-Produkten betrug 30 min bei „high fidelity“ Enzymen und eine Stunde bei herkömmlichen Enzymen bei den, vom Hersteller empfohlenen, Temperaturen.

Die Inaktivierung der enzymatischen Reaktion erfolgte entweder durch Hitze (5 min, 70 °C) oder durch Umpuffern bei der Aufreinigung (siehe 4.1). Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde eine T4-DNA-Ligase mit zugehörigem Puffer (New England Biolabs) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Es wurde ein 4-fach molarer Überschuss an zu inserierender DNA im Verhältnis zum geöffneten Vektor in der Reaktion eingesetzt. Dabei wurde dafür gesorgt, dass eines der zu ligierenden DNA-Fragmente phosphoryliert vorlag. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden oder ü. N. (Tab. 18).

Tab. 18: Zusammensetzung der Standard-Restriktions- und Ligationsansätze.

Restriktion	Ligation
<u>analytisch:</u>	<u>präparativ:</u>
DNA: 0,5-1 µg DNA	Vektor-DNA:
Restriktionsendonuklease: 0,3 µl (3-6 U)	Vektor: 15-25 ng
Puffer (10x): 1,5 µl	DNA-Fragment: 4x molarer Überschuss
ddH ₂ O: auf 15 µl Endvolumen	Ligasepuffer (10x): 2 µl
	T4-DNA-Ligase: 1 µl (1 U)
<u>präparativ:</u>	ddH ₂ O: auf 20 µl Endvolumen
DNA: 1-5 µg DNA	
Restriktionsendonuklease: 1 µl (10-20 U)	
Puffer (10x): 5 µl	
ddH ₂ O: auf 50 µl Endvolumen	

4.4.2 Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA

In einigen Fällen war es nötig DNA-Fragmente am 5'-Ende zu dephosphorylieren (z. B. zur Verringerung von unspezifischer Religation geöffneter Vektoren), bzw. zu phosphorylieren (z.B. Rezirkularisierung inverser PCR-Produkte). Für die Dephosphorylierung wurde dem zuvor hergestellten Restriktionsansatz 1 µl alkalische Phosphatase (Fast-AP, Thermo Scientific) und die entsprechende Menge des zugehörigen Puffers nach Herstellerangaben zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz wie in 4.1 beschrieben aufgereinigt. Für die Phosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde das „Quick-Blunting-Kit“ von NEB verwendet. Dabei werden die dephosphorylierten 5'-Enden der PCR-Produkte durch eine T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Die Reaktion wurde gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt. Das phosphorylierte Produkt wurde anschließend wie zuvor beschrieben aufgereinigt.

4.4.3 Fusions-PCR

Das Zusammensetzen von mehreren, mittels PCR erzeugten DNA-Fragmenten erfolgte über weitere PCR-Reaktionen. Hierbei wurden jeweils zwei lineare PCR-Produkte, die an ihren Enden über eine zum benachbarten Fragment homologe Region verfügten, mit Hilfe von flankierenden Primern zu einem einzigen DNA-Fragment fusioniert (Abb. 10). Die Zusammensetzung des dabei verwendeten präparativen PCR-Ansatzes ist in Tab. 19

dargestellt. Die Reaktion erfolgte nach dem in Tab. 16 gezeigten Thermocycler-Standardprotokoll für präparative PCRs. Die Aufreinigung des generierten PCR-Produkts erfolgte wie schon zuvor beschrieben (siehe 4.1).

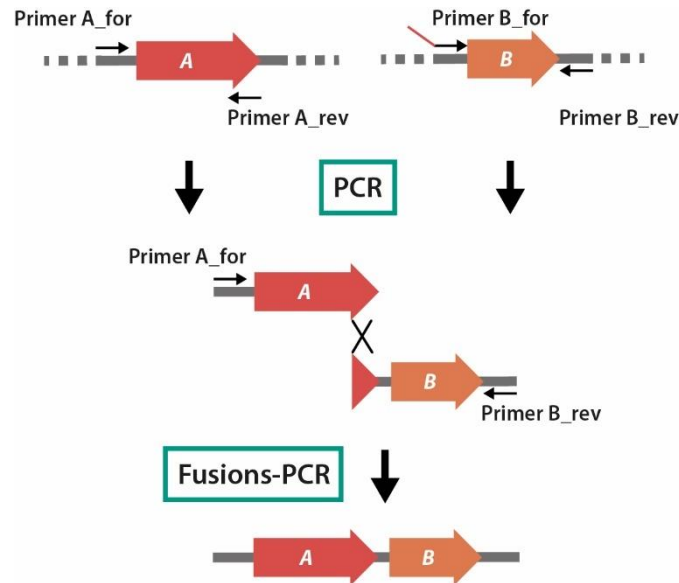


Abb. 10: Schema einer Fusions-PCR. Im ersten Schritt werden die beiden zusammenzufügenden Fragmente A & B mittels zweier PCR-Reaktionen von der jeweiligen Matrize amplifiziert. Der forward Primer von Fragment B weist dabei neben dem bindenden noch einen zu Fragment A homologen Bereich auf, der so an das PCR-Produkt angefügt wird. Im zweiten Schritt folgt Fusion beider Fragmente. Der homologe Überhang übernimmt hierbei die Funktion eines Primers und bindet an den homologen Bereich von Fragment A.

Tab. 19: Fusions-PCR-Ansätze.

Substanz	Volumen
5x iProof-Puffer	10 μ l
iProof-Polymerase	1 μ l
dNTPs	1 μ l
DMSO	1,5 μ l
dH ₂ O	7,5 μ l
flankierender forward Primer	12,5 μ l
flankierender reverse Primer	12,5 μ l
Matrize: Fragment A	2 μ l
Fragment B	2 μ l

4.4.4 inverse Plasmid-PCR

Die inverse PCR ist eine geeignete Technik, um unerwünschte Sequenzabschnitte, wie z.B. Tag-Sequenzen, aus einem geschlossenen Plasmid zu entfernen. Dazu wurden Primerpaare hergestellt, die flankierend zu dem zu entfernenden Bereich up- und downstream binden. Die Primer waren jedoch nicht, wie bei einer herkömmlichen PCR, zueinander (upstream \rightarrow forward Primer; downstream \leftarrow reverse Primer), sondern entgegengesetzt orientiert (upstream \leftarrow reverse Primer; downstream \rightarrow forward primer). Folglich wurde das gesamte Plasmid bis auf die jeweils zu entfernende Stelle amplifiziert (Abb. 11). Voraussetzung war dabei, dass die als Matrize dienenden Plasmid-Konstrukte möglichst klein waren, um einen Kettenabbruch bei der Amplifikation zu vermeiden. In allen Fällen wurde hierbei der zuvor schon beschriebene präparative PCR-Ansatz (Tab. 16) verwendet. Die Reaktion erfolgte erneut nach dem in Tab. 17 gezeigten Thermocycler-Standardprotokoll für präparative-PCRs. Die so erzeugten PCR-Produkte wurden wie in Abschnitt 4.1 beschrieben aufgereinigt, phosphoryliert und anschließend mittels T4-DNA-Ligase rezirkularisiert (siehe 4.4.1).

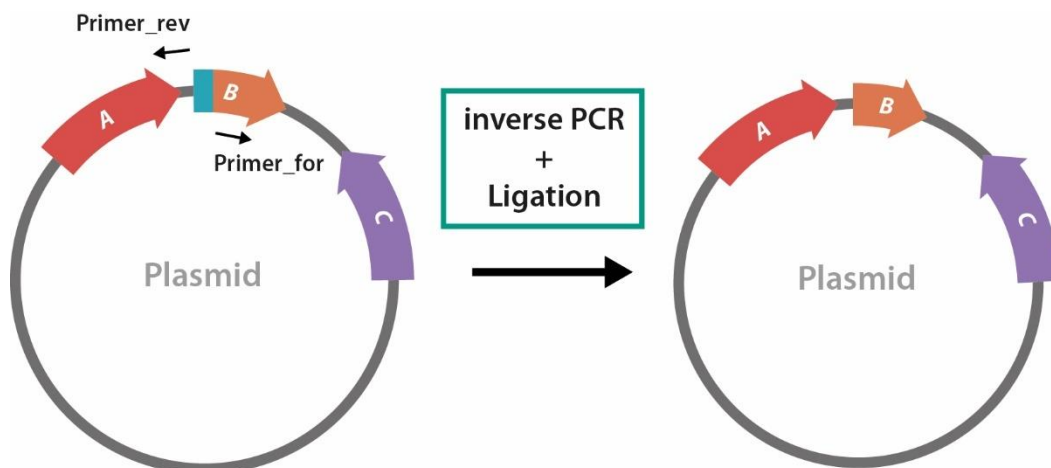


Abb. 11: Schema einer inversen Plasmid-PCR. Das Primerpaar bindet flankierend und in entgegengesetzter Orientierung zu dem zu entfernenden Sequenzabschnitt (in blau dargestellt). Durch die PCR wird ein lineares DNA-Fragment erzeugt, das diesen Bereich nicht mehr aufweist. Durch anschließende Ligation wird das Fragment zum Zielplasmid rezirkularisiert.

4.5 Transformationstechniken

4.5.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Ausgehend von einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli* Stammes wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur in SOB-Medium (Tab. 3) kultiviert. Mit der Übernachtskultur wurden

anschließend 50 ml SOB-Medium inokuliert. Für die Herstellung der *R. sphaeroides* Kultur wurden 50 ml RS-OH-Medium (Tab. 3) mit einer Einzelkolonie inokuliert. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ bzw. OD₆₅₀ von 0.5 - 0.8 wurde die Kultur 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 5 min bei 4 °C und 9000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal unter den oben beschriebenen Zentrifugationsbedingungen in 50 ml 4 °C kalten bidestilliertem Wasser gewaschen. Der Überstand wurde anschließend erneut verworfen und das Zellpellet in 1 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen bis zur Verwendung auf Eis gekühlt.

4.5.2 Elektroporation

In einem ersten Schritt wurden zur Entfernung von Salzen zunächst alle Ligationsansätze dialysiert. Dazu wurde eine sterile Petrischale mit ddH₂O Wasser gefüllt und eine Dialysemembran (VSWP 02500, Typ: VS, 0.025 µm Porengröße, Merck-Millipore, Darmstadt) auf die Oberfläche aufgelegt. Die Ligationssansätze wurden als Tropfen (20 µl) auf die Membran pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden diese Ansätze wieder abgenommen und für die Elektroporation eingesetzt. Zuvor aufgereinigte, in ddH₂O eluierte Plasmide wurden vor der Elektroporation nicht dialysiert. 5-10 µl des zu transformierenden Konstrukts wurden in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, Biorad) pipettiert. Nach der Zugabe von 100 µl elektrokompenter Zellen wurde der Ansatz mit der Pipette durch auf- und abziehen vorsichtig gemischt und in einem MicroPulser (Bio-Rad) transformiert. Nach erfolgtem, elektrischem Puls wurden sofort 900 µl, raumtemperiertes SOC-Medium (9,44 ml SOB, [siehe Tab. 3], 340 µl 10 % (w/v) Glucose, 260 µl 1 M MgCl₂) hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dieses unter Schütteln (150 U/min) für 60-70 min bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellen auf LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und bei 30 °C oder 37 °C für 12-48 Stunden inkubiert.

4.6 Sequenzierungen

Alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurden gegebenenfalls durch Sequenzierungsreaktionen auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Sequenzierungsreaktionen nach dem Sangerverfahren (Sanger *et al.*, 1977) wurden von den Firmen GATC Biotech (Konstanz) und eurofins genomics (Ebersberg) durchgeführt. Die zu sequenzierenden Proben und die dabei verwendeten Primer wurden gemäß den Vorgaben des Sequenzierdienstleisters

vorbereitet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Geneious Bioinformatics Software (Biomatters, Auckland, Neuseeland) prozessiert und mit den *in silico* generierten Sequenzen verglichen.

4.7 Generierung eines Codon-optimierten, synthetischen DNA-Fragments

Durch das Einbringen der *c*-Typ Cytochrome CymA und STC aus *S. oneidensis* sollte *R. sphaeroides* dazu befähigt werden Elektronen von einer Elektrode zu beziehen. Dazu mussten zunächst Plasmide hergestellt werden, um die Gene, die für die Expression der Proteine benötigt werden, in *R. sphaeroides* einzubringen. Ein Vergleich der Codon-Nutzung beider Organismen (*R. sphaeroides* 2.4.1 [nächster verwandter Stamm in der Datenbank] & *S. oneidensis* MR-1) mithilfe der Codon-Nutzungs-Datenbank Kazusa Codon Usage Database (www.kazusa.or.jp/codon/) und des „Graphic Codon Usage Analysers“ (Fuhrmann *et al.*, 2004; <http://gcua.schoedl.de/>) zeigte z. T. eine starke Abweichung in der Verteilung der jeweils genutzten Codone (Abb. A1). Dies würde u. U. zu einem Stocken der Translation und somit zu einer schlechten Proteinexpression führen. Daher sollten die Gensequenzen von *cymA* und *stc* an die Codon-Nutzung von *R. sphaeroides* optimal angepasst werden. In diesem Zuge sollte auch noch ein weiteres mögliches Problem beseitigt werden. So war es nicht klar, ob die Sequenz für die Sekretion von STC ins Periplasma mit dem *sec*-System von *R. sphaeroides* kompatibel ist.

4.7.1 Austausch der Sekretionssequenz von STC

Im ersten Schritt wurde eine geeignete Sekretionssequenz aus *R. sphaeroides* gesucht. Da das Cytochrom *c2* als nicht maturierte Vorstufe in das Periplasma von *R. sphaeroides* sekretiert wird, schien dessen Sekretionssequenz aufgrund der Analogie zur STC-Sekretion, in diesem Fall geeignet zu sein (Donohue *et al.*, 1986). Mittels der Signalsequenzanalyse-Software SignalP 4.1 (Center For Biological Sequence Analysis; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) wurde die Sekretionssequenz des Cytochroms *c2* detektiert. Im nächsten Schritt wurde mit derselben Methode die Sekretionssequenz von STC analysiert (Abb. A2). Nachdem beide Sequenzen nun bekannt waren, wurde die von STC *in silico* entfernt und durch die des Cytochroms *c2* ersetzt. Weiterhin wurde noch eine C-terminale His-Tag-Sequenz am Ende des Konstrukts eingefügt (Abb. A3a), um dessen Expression mittels Immunodetektion (siehe Abschnitt 10) spezifisch nachweisen zu können.

4.7.2 Codon-Optimierung von *cymA* und *stc*

Zunächst wurde, wie auch bei *stc*, eine His-Tag-Sequenz (N-terminal) in *cymA* eingefügt. Die DNA-Sequenzen von *cymA* und *stc* wurden mittels des „Graphic Codon Usage Analysers“ analysiert und mithilfe der Codon-Nutzung-Datenbank (Kazusa) so optimiert, dass zum einen die relative Abdeckung der Triplets möglichst bei über 15 % lag und zum anderen keine zwei identischen Basentriplets direkt aufeinander folgten (Abb. A3b, A4b, A6 & A8).

4.7.3 Zusammensetzen des synthetischen *cymA-stc*-Fragments

Nachdem beide Gene optimiert und modifiziert waren, wurde die eigentliche synthetische Sequenz *in silico* zusammengefügt. Dabei wurde zwischen *cymA* und *stc* eine 23 bp umfassende, intergene Sequenz eingefügt, die eine ribosomale Bindestelle für die Translation von *stc* enthielt. An die flankierenden Bereiche (upstream von *cymA* und downstream von *stc*) wurden weitere Sequenzen angefügt, die eine Bindung von Primern ermöglichen sollten, um das Konstrukt amplifizieren zu können. Weiterhin wurden so auch Restriktionsschnittstellen eingefügt, die für eine spätere Ligation benötigt wurden. Abschließend wurde die Synthese des fertigen Konstrukts als lineares DNA-Fragment bei einem externen Dienstleister (GeneArt™ DNA-Strings, Thermo-Fisher-Scientific) in Auftrag gegeben.

4.8 Herstellung der verwendeten Expressionsplasmide

Bei der Herstellung der *cymA* und *stc* tragenden Expressionsplasmide für *R. sphaeroides* mussten mehrere Zwischenschritte durchgeführt werden. Im Folgenden ist die Generierung aller Konstrukte und die Erzeugung der später verwendeten Expressionsplasmide beschrieben:

4.8.1 pIND4-*cymA-stc*-His optimiert (Abb. 12a)

Zunächst wurde der in 4.7 beschriebene, Codon-optimierte, synthetische DNA-Strang mithilfe der Primer 1763 und 1764 amplifiziert. Bei dem hierbei erhaltenen PCR-Produkt, sowie dem späteren Zielvektor pIND4, wurde anschließend mit den Endonukleasen NcoI und HindIII eine Restriktionsreaktion durchgeführt. Die beiden resultierenden Fragmente wurden mittels T4-Ligase miteinander verknüpft und das so erzeugte Plasmid pIND4-*cymA-stc*-His optimiert anschließend in JG109 transformiert. Es folgte eine Selektion auf LB_{Kan}-Agarplatten. Abschließend wurde die Richtigkeit des Konstrukts durch Sequenzierung mit den Primern 1058 und 1059 überprüft.

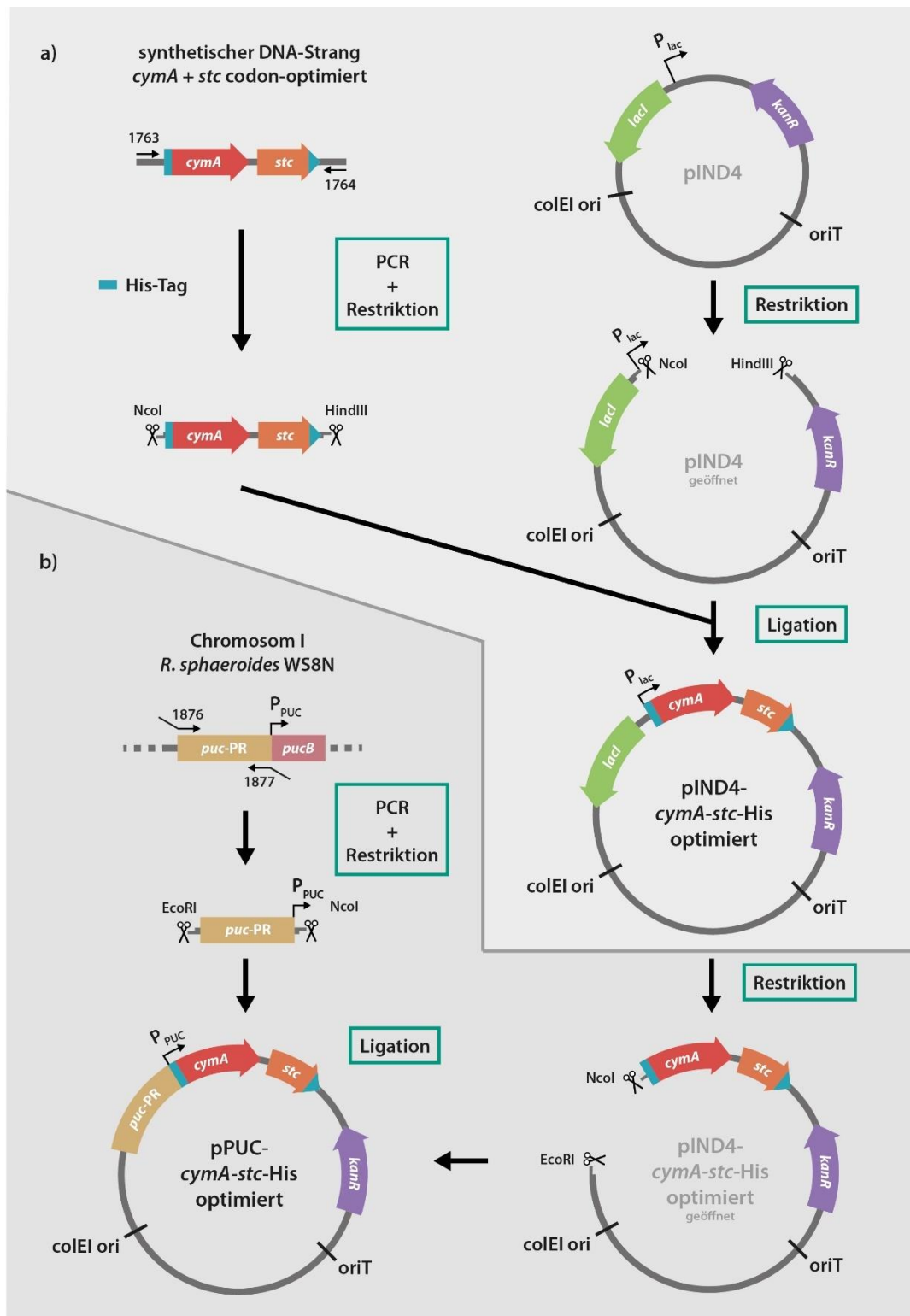


Abb. 12: Klonierungsstrategie a) pIND4-cymA-stc-His optimiert. Klonierung des synthetischen *cymA-stc*-Konstrukts in den pIND4-Vektor. **b) pPUC-cymA-stc-His optimiert.** Klonierung des *puc*-Operon-Promotorbereichs (*puc-PR*) in das in a) erzeugte Konstrukt. Die mit Zahlen beschrifteten Pfeile kennzeichnen die verwendeten Primer, die grünen Kästen die angewandten molekularbiologischen Methoden. Die verwendeten Endonukleasen sind durch Scheren und alle im Konstrukt eingeführten His-Tag-Sequenzen durch blaue Bereiche in den einzelnen Genen beschrieben.

4.8.2 pPUC-*cymA-stc*-His optimiert (Abb. 12b)

In diesem Schritt sollte der Laktose-induzierbare Promotorbereich von pIND4-*cymA-stc*-His optimiert durch den Licht- und Hypoxie-induzierbaren Promotor des *puc*-Operons aus *R. sphaeroides* ersetzt werden (Kiley & Kaplan, 1987; Lee *et al.*, 1989; Lee & Kaplan, 1995). Zunächst wurde mit den Primern 1876 und 1877 die *puc*-Promotorregion amplifiziert und dabei am upstream-Ende des Fragments eine EcoRI- und am downstream-Ende eine NcoI-Restriktionsschnittstelle angefügt. Als Matrize diente hierbei chromosomale DNA des Stammes JG582. Das Plasmid pIND4-*cymA-stc*-His optimiert wie auch das erhaltene PCR-Produkt wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NcoI behandelt und die beiden resultierenden Fragmente mittels T4-Ligase miteinander verknüpft. Das so erzeugte Plasmid pPUC-*cymA-stc*-His optimiert wurde darauffolgend in JG22 transformiert, wie zuvor mittels LB_{Kan}-Agarplatten selektiert und zur Kontrolle mit den Primern 1884 und 1885 sequenziert.

Ergänzend sollten weitere Konstrukte erzeugt werden, die entweder keine oder zwei C-terminale His-Tags (*cymA*-His_{C-terminal} & *stc*-His_{C-terminal}) aufweisen. Um dies zu erreichen, wurden zunächst über inverse PCR zwei geeignete Konstruktionsplasmide generiert.

4.8.3 pSCVAM-*cymA*-His_{C-terminal}-*stc*-His_{C-terminal} (Abb. 13)

Mithilfe einer Fusions-PCR wurde zunächst das mit einer N-terminalen His-Tag-Sequenz versehene *cymA* mit einer zusätzlichen, C-terminalen His-Tag-Sequenz ausgestattet. Dazu wurde mit den Primern 2054 und 2053 die *cymA*-Sequenz von ‚pIND4-*cymA-stc*-His optimiert‘ amplifiziert und dabei durch den Primer 2053 der gewünscht His-Tag angefügt. Mittels der Primer 2052 und 2022 wurde ein weiteres Fragment mit der *stc*-Sequenz generiert und mithilfe des Primers 2052 ein homologer Überhang zum ersten Fragment erzeugt. Die beiden Teilstücke wurden anschließend über eine Fusions-PCR mit den Primern 2054 und 2022 zusammengefügt. Das Konstrukt wurde anschließend „blunt“ in einen mit der Endonuklease EcoRV geöffneten pSCVAM-Vektor mittels T4-Ligase ligiert. Das so erzeugte Plasmid pSCVAM-*cymA*-His_{N+C-terminal}-*stc*-His_{C-terminal} wurde in JG22 transformiert und wie zuvor über LB_{Kan}-Agarplatten selektiert. Im nächsten Schritt sollte die N-terminale His-Tag-Sequenz von *cymA* mithilfe einer inversen PCR entfernt werden. Um dies zu erreichen, wurde das zuvor erzeugte Plasmid mit den Primern 2062 und 2063 invers amplifiziert.

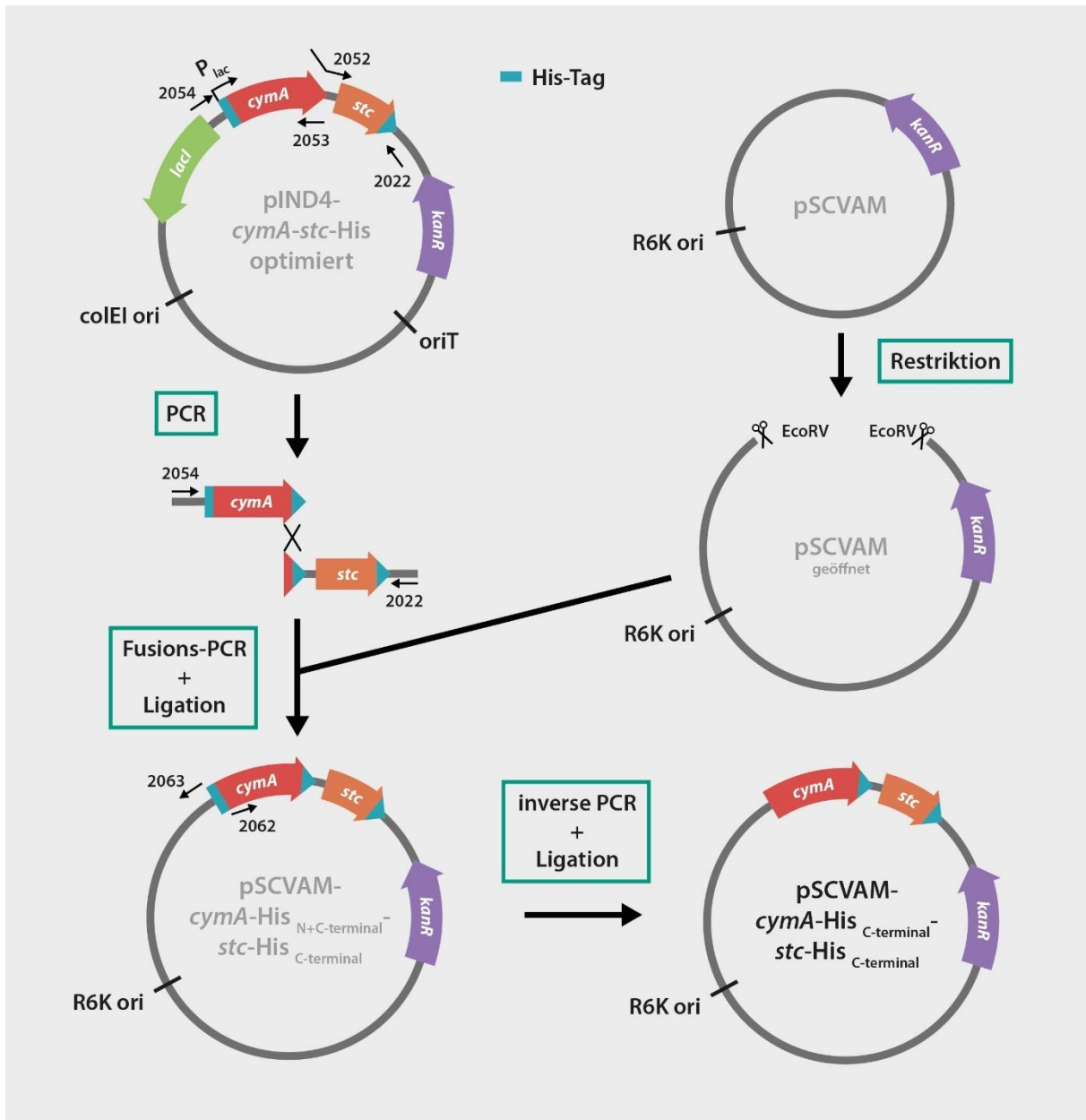


Abb. 13: Klonierungsstrategie pSCVAM-*cymA*-His_{C-terminal}-*stc*-His_{C-terminal}. Mittels PCR wurde an das erzeugte *cymA*-His_{N-terminal}-Fragment eine C-terminale His-Sequenz angefügt. An das zweite erzeugte, *stc*-His_{C-terminal}-Fragment wurde ein zum ersten Fragment homologer Überhang angefügt. Beide Fragmente wurden mithilfe einer Fusions-PCR zusammengefügt und in einen geöffneten pSCVAM-Vektor ligiert. Anschließend wurde die N-terminale His-Tag-Sequenz aus *cymA* durch inverse PCR entfernt. Die mit Zahlen beschrifteten Pfeile kennzeichnen die verwendeten Primer, die grünen Kästen die angewandten molekularbiologischen Methoden. Die verwendeten Endonukleasen sind durch Scheren und alle im Konstrukt eingeführten His-Tag-Sequenzen durch blaue Bereiche in den einzelnen Genen dargestellt.

Das generierte Produkt wurde mittels T4- Ligation rezirkularisiert und in JG22 transformiert. Die Selektion des so erzeugten Plasmids pSCVAM-*cymA*-His_{C-terminal}-*stc*-His_{C-terminal} erfolgte über über LB_{Kan}-Agarplatten. Die Richtigkeit des Konstrukts wurde durch Sequenzierung mit den Primern 573 und 574 überprüft.

4.8.4 pSCVAM-*cymA*-*stc* (Abb. 14)

Beim zweiten Konstruktionsplasmid sollten alle enthaltenen His-Tag-Sequenzen entfernt werden. Zunächst wurde mit den Primern 2054 und 2022 der *cymA* und *stc* umfassende Bereich aus ‚pIND4-*cymA*-*stc*-His optimiert‘ amplifiziert. Dieser wurde anschließend, wie schon zuvor beschrieben, in einen mit EcoRV geöffneten pSCVAM Vektor ligiert. Das so generierte Plasmid pSCVAM-*cymA*-His_{N-terminal}-*stc*-His_{C-terminal} wurde in JG22 transformiert und mittels LB_{Kan}-Agarplatten selektiert. Im nächsten Schritt wurden die beiden His-Tag-Sequenzen durch zwei aufeinanderfolgende, inverse PCRs entfernt. Zunächst wurde das zuvor erzeugte Plasmid mit den Primern 2062 und 2063 amplifiziert, das PCR-Produkt mittels T4-Ligase rezirkularisiert und in JG22 transformiert. Nach erfolgter Selektion des generierten Plasmids ‚pSCVAM-*cymA*-*stc*-His_{C-terminal}‘ auf LB_{Kan}-Agarplatten, folgte nach demselben Muster die zweite inverse PCR mit den Primern 2064 und 2065. Das resultierende Plasmid pSCVAM-*cymA*-*stc* wurde abschließend mit den Primern 573 und 574 durch Sequenzierung überprüft.

4.8.5 Generierung der Expressionsplasmide (Abb. 15)

Für die Herstellung der eigentlichen Expressionsplasmide wurden zunächst die beiden Konstruktionsplasmide pSCVAM-*cymA*-*stc* und pSCVAM-*cymA*-His_{C-terminal}-*stc*-His_{C-terminal} jeweils mit den Endonukleasen NcoI und HindIII behandelt. Weiterhin wurden auch die beiden Plasmide pPUC-*cymA*-*stc*-His_{optimiert} und pIND4 mit denselben Enzymen geöffnet. Im Anschluss wurde je ein *cymA*-*stc*-Fragment ohne und eines mit His-Tag-Sequenzen in jeweils ein geöffnetes pIND4- oder pPUC-Plasmid ligiert. Dadurch wurden die vier Expressionsplasmide pPUC-*cymA*-*stc*, pPUC-*cymA*-*stc*-His, pIND4-*cymA*-*stc* und pIND4-*cymA*-*stc*-His generiert.

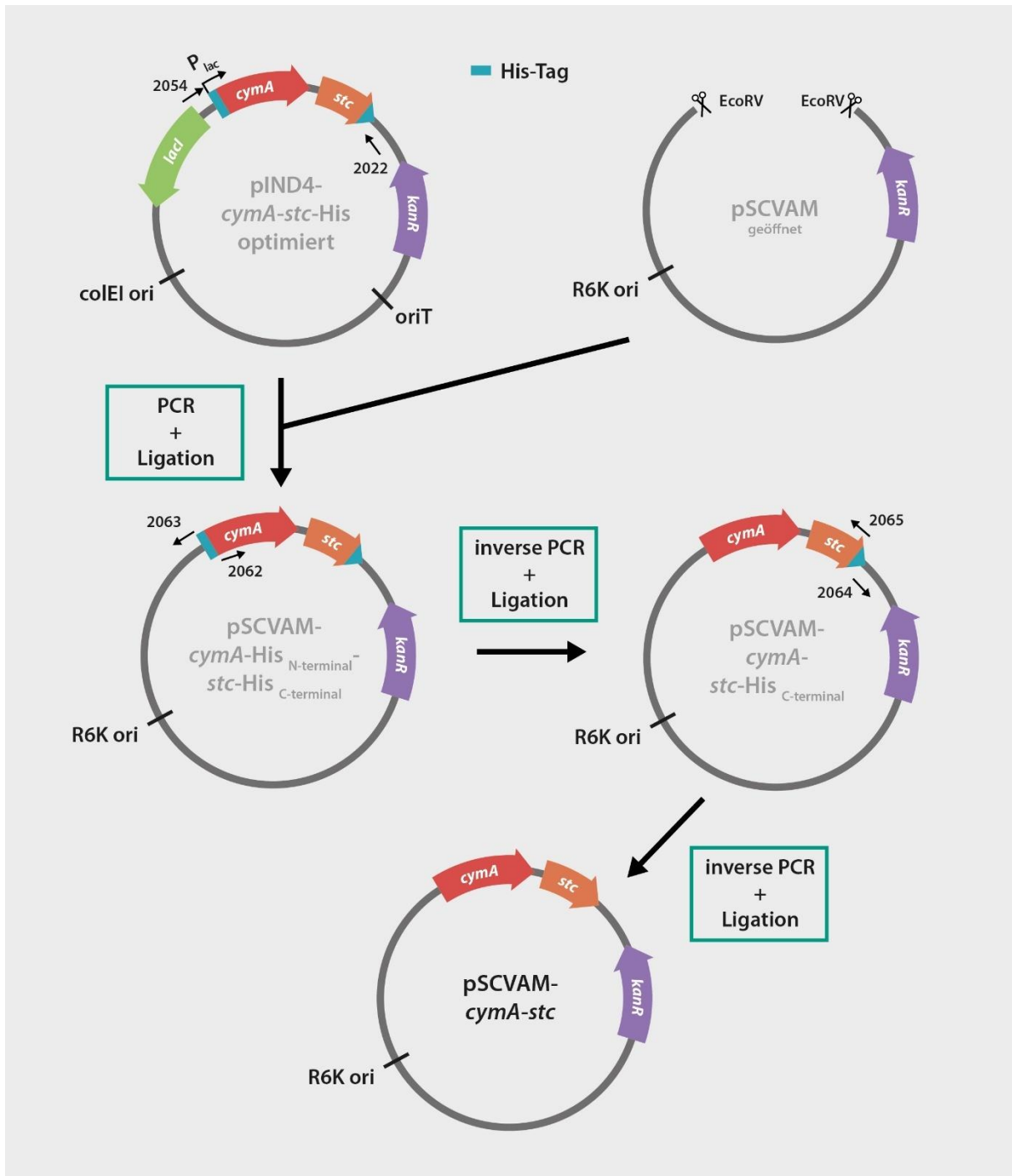


Abb. 14: Klonierungsstrategie pSCVAM-cymA-stc. Amplifikation des *cymA*-His_{N-terminal}-*stc*-His_{C-terminal}-Fragments aus pIND4-*cymA-stc-His-optimiert* und Ligation in den geöffneten pSCVAM-Vektor. Mittels zwei inverser PCRs wurden anschließend die His-Tag-Sequenzen aus *cymA* und *stc* entfernt. Die mit Zahlen beschrifteten Pfeile kennzeichnen die verwendeten Primer, die grünen Kästen die angewandten molekularbiologischen Methoden. Die verwendeten Endonukleasen sind durch Scheren und alle im Konstrukt eingeführten His-Tag-Sequenzen durch blaue Bereiche in den einzelnen Genen beschrieben.

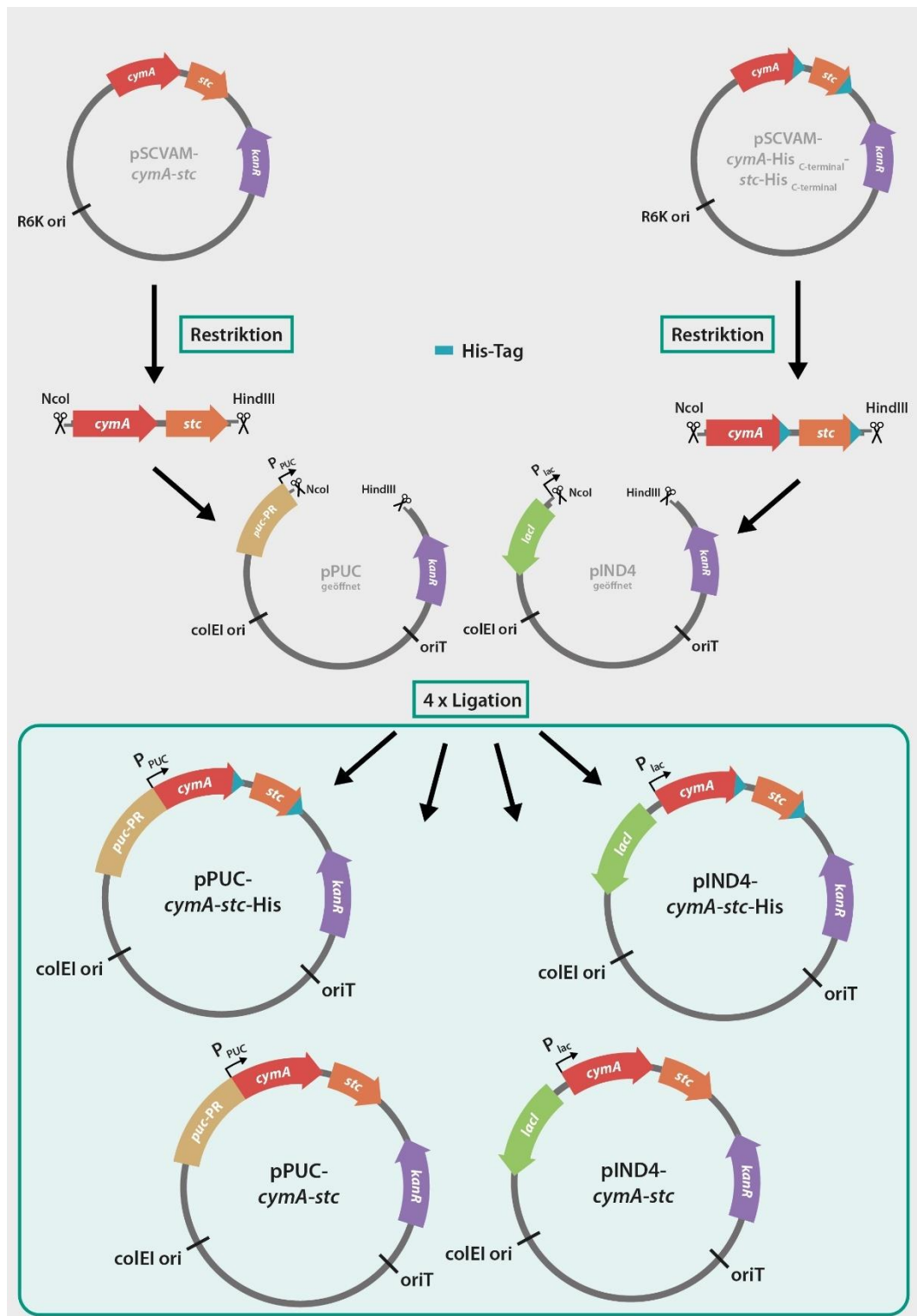


Abb. 15: Klonierungsstrategie pPUC-cymA-stc, pPUC-cymA-stc-His, pIND4-cymA-stc & pIND4-cymA-stc-His. Die beiden *cymA-stc*-Bereiche mit und ohne His-Tag-Sequenzen aus den jeweiligen pSCVAM-Plasmiden wurden mittels Restriktion entfernt. Diese wurden jeweils in ein geöffnetes pIND4 und pPUC-Plasmid ligiert, wodurch die vier verwendeten Expressionsplasmide generiert wurden. Die mit Zahlen beschrifteten Pfeile kennzeichnen die verwendeten Primer, die grünen Kästen die angewandten molekularbiologischen Methoden. Die verwendeten Endonukleasen sind durch Scheren und alle im Konstrukt eingeführten His-Tag-Sequenzen durch blaue Bereiche in den einzelnen Genen beschrieben.

Alle vier Konstrukte wurden in JG144 transformiert, mittels LB_{Kan}-Agarplatten selektiert und durch Sequenzierung mit den Primern 1059 und 2061 (pPUC) bzw. 1058 und 1059 (pIND4) überprüft. Abschließend wurden alle vier Expressionsplasmide jeweils in JG582 transformiert.

5 Elektrophoretische Methoden

5.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Diese Methode ermöglicht eine Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen gemäß ihrer Fragmentgröße. Die Wanderungseigenschaften der negativ geladenen DNA in einem konstant elektrischen Feld (120 V) werden dabei von der Molekülgröße, der Gelmatrix und dem Salzgehalt des Puffers beeinflusst. In Tab. 20 sind alle bei dieser Methode verwendeten Puffer dargestellt.

Für die Herstellung der Gele wurden 1 % (für erwartete Fragmentgrößen > 500 bp) bzw. 2 % (w/v) Agarose (für erwartete Fragmentgrößen < 500 bp) in 1 x TAE aufgekocht bis sie sich vollständig aufgelöst hatte. Nachdem die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden pro 10 ml Agaroselösung je 1 µl einer 10 %igen Midori Green Lösung (Nippon Genetics) zugesetzt. Danach wurde die Agaroselösung in eine Gelkammer mit bereits eingesetztem Taschenformer gegossen.

Tab. 20: Zusammensetzung des Agarosegel-Elektrophorese-Puffers.

Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
50X TAE		6X DNA-Ladepuffer	
Tris-HCl pH 8	2 M	Tris-HCl pH 7,6	10 mM
Eisessig	1 M	Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
0,5 M EDTA	50 mM	Xylen Cyanol FF	0,03 % (w/v)
		Glycerin	60 % (v/v)
		EDTA	60 mM

Nach vollständiger Polymerisation der Agarose wurde der Taschenformer entfernt und das Gel in eine Laufkammer mit 1xTAE als Laufpuffer eingelegt. Die mit Ladepuffer versetzten DNA-Fragmente oder Plasmide wurden in die Taschen geladen. Eine Spur des Gels wurde

mit 4 μl des GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) als Größenmarker versehen.

Die Detektion der Fragmente erfolgte wahlweise mit einem UV-Präparationstisch (Benchtop UV Transilluminator, UVP, Cambridge, Großbritannien) bei einer Wellenlänge von 302 nm oder mit einem ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad).

5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dabei wurden 15 %ige Trenngele und 4 %ige Sammelgele verwendet. Das Proteingemisch wurde vor dem Probenauftrag mit einem Probenpuffer versetzt, der Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) und β -Mercaptoethanol enthielt.

Tab. 21: Zusammensetzung des Trenngels 15 % (w/v), Volumina für 4 Gele.

Substanz	Zusammensetzung	Volumen
dH ₂ O	-	6,4 ml
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH-Wert = 8,8	6,7 ml
Acrylamid-Lösung	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	13,4 ml
SDS	10 % (w/v)	268 μl
TEMED	-	39 μl
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v)	195 μl

SDS ist ein Detergens, das nichtkovalente Wechselwirkungen innerhalb nativer Proteine aufhebt. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken reduziert. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten mit ca. einem SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste. Der so entstandene Komplex aus SDS und denaturiertem Protein weist eine stark negative Ladung auf, die proportional zu der Masse des Proteins ist. Dabei überdecken SDS-Anionen weitestgehend die Eigenladung der Proteine, weshalb die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins vernachlässigbar ist. Im elektrischen Feld migrieren diese Komplexe

durch die Polyacrylamid-Matrix, wobei kleinere Proteine ein schnelleres Laufverhalten zeigen.

Beim SDS-Gel nach Laemmli, handelt es sich um ein diskontinuierliches Gel, welches sich aus einem Sammelgel mit größerem Porendurchmesser und niedrigerer Acrylamidkonzentration und einem Trenngel mit höherer Acrylamidkonzentration zusammensetzt. Im Sammelgel werden die Proteine durch den vorliegenden pH-Wert und die Laufpufferzusammensetzung gemäß den Prinzipien der Isotachyphorese fokussiert und dann im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Zusammensetzung der beiden Gelabschnitte ist in Tab. 21 bzw. Tab. 22 dargestellt.

Tab. 22: Zusammensetzung des Sammelgels 4 % (w/v), Volumina für 4 Gele.

Substanz	Zusammensetzung	Volumen
dH ₂ O	-	
Sammelgelpuffer	2 M Tris-HCl	10,1 ml
	pH-Wert = 6,8	1,7 ml
Acrylamid-Lösung	30 % (w/v) Acrylamid,	1,9 ml
	0,8 % (w/v) Bisacrylamid	
SDS	10 % (w/v)	140 µl
TEMED	-	56 µl
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v)	112 µl

Bei der Herstellung der Gele wurden zunächst die Substanzen für das Trenngel vermischt, wobei APS und TEMED zuletzt zugegeben wurden, da mit deren Zugabe die Polymerisation beginnt. Die Flüssigkeit wurde zwischen zwei entfettete, in eine Gießvorrichtung (Mini-PROTEAN[®] Tetra Handcast Systems, Biorad) eingespannte Glasplatten gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol wieder entfernt. Das Trenngel wurde daraufhin mit der zuvor hergestellten Sammelgellösung überschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Taschenformer eingesetzt, der vor der Zugabe der Proben wieder entfernt wurde.

Tab. 23: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamid-Elektrophorese-Puffer.

Substanz	Einwaage pro Liter	Substanz	Volumen
Laufpuffer		6X SDS-Ladepuffer	
Tris	3 g	Glycerin	650 µl
Glycin	14,4 g	Sammelgelpuffer	150 µl
SDS	1 g	SDS (20 % [w/v])	600 µl
		Bromphenolblau (0,5 % [w/v])	300 µl
		β-Mercaptoethanol	300 µl

Die Proben, deren Proteingehalte zuvor auf eine Menge von 15 - 30 µg eingestellt wurden, wurden zunächst mit dem in Tab. 23 dargestellten Ladepuffer versehen und mit dH₂O auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 2 min (Hämgruppenfärbung) bzw. 5 min (Western-Blot) bei 95 °C denaturiert. In die Taschen der Gele wurden je 25 µl Probe geladen, wobei jedes Gel eine Spur mit Größenmarker (Triple Color Protein Standard III, SERVA bzw. FastGene[®] Bluestar triple coloured prestained protein ladder, Nippon Genetics) enthielt. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur im in Tab. 23 dargestellten Laufpuffer durchgeführt. Die angelegte Spannung betrug dabei 120 V im Sammelgel- und 150 V im Trenngelbereich. Nachdem die Lauffront die Unterkante des Gels erreicht hatte, wurden die Glasplatten entfernt. Anschließend wurde das Gel in dH₂O für einige Sekunden gewaschen und anschließend einer Färbung (siehe 8) unterzogen oder mittels Western Blotting (siehe 9) transferiert.

6 Zellaufschluss

6.1 Präparation der periplasmatischen Fraktion

Die frisch hergestellten oder gefrorenen Zellpellets von *R. sphaeroides* wurden in einem einfachen Volumen an Resuspensionspuffer (siehe Tab. 13) resuspendiert und anschließend mit Polymyxin-B-Sulfat in einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt. Diese zur Gruppe der Polypeptid-Antibiotika gehörende Substanz komplexiert mit den Lipopolysacchariden der äußeren Membran und führt folglich zu deren Destabilisierung. Die so behandelten Zellen

wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 1 h bei 23.000 g zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand stellt die periplasmatische Fraktion der Zellen dar. Die erhaltene Fraktion wurde bis zur weiteren Verwendung bei auf Eis gelagert.

6.2 Präparation der Membranfraktion

Das, während der Präparierung der periplasmatischen Fraktion, gewonnene Zellpellet wurde erneut in dem doppelten Volumen an auf Eis gekühltem Waschpuffer aufgenommen. Um beim weiteren Aufschluss der Bildung von DNA-Aggregaten vorzubeugen, wurden der Suspension 0,1 mg/ml DNase I zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei einem Druck von 900 psi mittels einer 5 ml French-Press Zelle (Thermo Fisher Scientific; American Instruments Company, Maryland, USA) in zwei Durchläufen aufgebrochen. Die Suspension mit den aufgeschlossenen Zellen wurde danach für 5 min bei 4 °C und 9.000 g zentrifugiert, um nicht geöffnete Zellen zu entfernen. Der erhaltene Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge bei 208000 g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand der die cytoplasmatische Fraktion enthielt, wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml eisgekühltem Resuspensionspuffer versehen, welcher zur besseren Solubilisierung der Membranfragmente 2 % (w/v) des Detergens‘ Triton® X-100 enthielt. Anschließend erfolgte das Resuspendieren mit einem Homogenisator. Die so erhaltene Membranfraktion wurde bis zur weiteren Verwendung bei auf Eis gelagert.

7 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt von Lösungen wurde über die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Als Proteinstandard wurde eine Stammlösung aus Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 10 mg/ml verwendet. Über mehrere Verdünnungsschritte wurde eine Eichreihe hergestellt, die eine Proteinkonzentration von 0 - 0,1 mg/ml aufwies. Die zu bestimmenden Proteinproben wurden ebenfalls in mehreren Schritten verdünnt, um eine Konzentration zu erreichen, die im oben genannten Detektionsbereich der Methode lag. Jeweils 20 µl dieser Ansätze wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte NUNC Typ-F (Thermo Fisher Scientific) mit 180 µl des in Tab. 24 beschriebenen Bradford-Reagenz oder bei Triton® X-100-haltigen Proben mit 180 µl Bradford-Ultra-Lösung (Expedeon Ltd., Swavesey, Großbritannien) versetzt und für 10 min inkubiert. Mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (iMark™, Biorad) wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Aus den dreifach bestimmten Standardwerten wurde eine Eichgerade erstellt. Mit Hilfe dieser Eichgeraden

wurde aus den dreifach bestimmten Absorptionswerten der einzelnen Proteinproben, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die Proteinkonzentration der Ausgangslösung ermittelt.

Tab. 24: Zusammensetzung der Bradford-Reagenz.

Substanz*	Einwaage pro Liter
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	100 mg
konzentrierte Phosphorsäure	100 ml
96 % Ethanol	50 ml
dH ₂ O	ad. 1000 ml

* die einzelnen Bestandteile müssen in der angegebenen Reihenfolge (von oben nach unten) gemischt werden

8 Färbemethoden

8.1 Anfärben von Hämgruppen

Die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden teilweise einer spezifischen Färbung von Häm-Proteinen unterzogen. Der Häm-Cofaktor besitzt eine Peroxidase-Aktivität, durch welche 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) unter Zugabe von H₂O₂ zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird. Zunächst wurden die Proteine durch eine 30-minütige Inkubation mit TCA-Lösung in der Gelmatrix fixiert. Nach einem 30-minütigen Waschschrift in dH₂O wurde das Gel mit der Entwicklungslösung versehen und solange inkubiert, bis klare Signale zu erkennen waren. Die Dokumentierung erfolgte über das ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad). Die Zusammensetzung der hierbei eingesetzten Lösungen ist in Tab. 25 dargestellt.

8.2 Coomassie-Färbung

Um nach der erfolgten Hämgruppen-Färbung eine gleichmäßige Beladung des Gels qualitativ nachzuweisen, wurde im Anschluss eine unspezifische Anfärbung von Proteinen durch eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Dies erfolgte über eine einstufige Färbung mittels InstantBlue™ (Expedeon) nach Herstellerangaben. Die Dokumentierung wurde erneut über das ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad) durchgeführt.

Tab. 25: Zusammensetzung der Lösungen zur Hämgruppen-Färbung eines SDS-Gels.

Substanz	Zusammensetzung	Volumen
TCA-Lösung	12,5 % (w/v) in dH ₂ O	10 ml
Entwicklungslösung		
TMB-Lösung	10 mg 3,3,5,5-Tetramethyl- benzdine in 9 ml dH ₂ O	9 ml
Citrat-Puffer	0,5 M Citrat pH = 6,4	1 ml
H ₂ O ₂	30 % (v/v)	20 µl

9 Western Blotting

Denaturierte Proteine, die im SDS-Gel nach der Größe aufgetrennt wurden, werden bei diesem Verfahren durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran (Roti[®]-NC, Roth) übertragen und fixiert.

Zum Proteintransfer wurde das Semi-Dry-Verfahren verwendet und mittels eines Trans-Blot-Turbo-Systems (Biorad) durchgeführt. Zunächst wurden 14 kleine Filterpapiere (Roth) und eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des SDS-Trenngels zugeschnitten. Auf die mit dH₂O benetzte Anode der Blotting-Kammer wurden danach sieben, in Blotting-Puffer (siehe Tab. 26) getränkte Filterpapiere aufgelegt. Als nächstes wurde die Nitrocellulosemembran auf den Stapel aus Filterpapier aufgebracht.

Tab. 26: Zusammensetzung der Blotting-Puffers.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
Glycin	20 g	266 mM
Tris	40 g	330 mM
Ethanol	150 ml	15 % (v/v)
Methanol	50 ml	5 % (v/v)

Daraufhin folgte das SDS-Trenngel, auf welches erneut sieben, in Blotting-Puffer getränkte Whatmanpapiere aufgelegt wurden. Abschließend wurden durch Abwalzen verbliebene Luftblasen aus dem erzeugten Stapel entfernt. Nach Auflegen der Kathode wurde der Proteintransfer mittels des Programms für hohe Molekulargewichte (High MW2 [13 A, 25 V, 12 Minuten]) durchgeführt und die Nitrocellulose-Membran anschließend für die Immunodetektion verwendet.

10 Immunodetektion

Die zu detektierenden Zielproteine wurden bei der Klonierung mit einer Gensequenz versehen, die für einen sog. His-Tag kodiert. Dieser His-Tag ist ein Peptid aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen, welches N- oder C-terminal an ein rekombinantes Protein angehängt werden kann. Durch die Wechselwirkung mit einem für dieses Peptid spezifischen Antikörper, kann der His-Tag als Nachweis für ein Protein dienen, für das noch kein spezifischer Antikörper verfügbar ist.

Die wie in Abschnitt 9 behandelte Nitrocellulose-Membran wurde zwei Mal für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend für mindestens eine Stunde oder über Nacht in Blocking-Puffer (Waschlösungen Immunodetektion siehe Tab. 27) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Daraufhin wurde der primäre Antikörper (Anti-His-Antikörper aus der Maus, MCA1396, AbD serotec, Puchheim) 1:1000 in 14 ml TBS-Puffer mit 3 % BSA (w/v) verdünnt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde sie zweimal in TBS-Tween-Triton-Puffer und einmal in TBS-Puffer für je 10 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Anti-Maus-Antikörper mit alkaliner Phosphatase aus der Ziege, Sigma, Deisenhofen) wurde mit 3 % BSA in 14 ml TBS 1:7.500 verdünnt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit diesem inkubiert.

Anschließend wurde die Membran viermal mit TBS-Tween-Puffer für 5 min und fünfmal für 2 min mit dH₂O gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran auf eine saubere Plastikoberfläche gelegt und mit 2 ml Entwicklerlösung (Immun-Blot Goat Anti-Mouse AP Assay Kit, Biorad) überschichtet. Bei der nun stattfindenden Reaktion hydrolysiert die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers 5-Brom-4-chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) zu 5-Brom-4-chlor-Indoxyl und Phosphat. Das 5-Brom-4-chlor-Indoxyl wird durch Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo oxidiert. Je nach Proteinkonzentration wurde die Membran für 1-20 min entwickelt.

Nachdem klare Banden erkennbar waren wurde der Entwicklungsprozess durch spülen mit dH₂O abgebrochen. Die Dokumentation der entwickelten Membran erfolgte mit dem ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad).

Tab. 27: Zusammensetzung der Immunodetektions-Waschlösungen.

Substanz	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
TBS-Puffer		
Tris/HCl pH-Wert = 7.5	6,06 g	50 mM
NaCl	8,77 g	150 mM
TBST-Puffer		
Tris/HCl pH-Wert = 7.5	6,06 g	50 mM
NaCl	8,77 g	150 mM
Tween 20	0,5 g	0,05 % (w/v)
TBST-Triton-Puffer		
Tris/HCl pH-Wert = 7.5	6,06 g	50 mM
NaCl	8,77 g	150 mM
Tween 20	0,5 g	0,05 % (w/v)
Triton X-100	2 g	0,2 % (w/v)

11 Analyse der Gesamtkonzentration an organischen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen

Für die Bestimmung der Gesamtkonzentration an organischen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen (**TOC** = engl. total organic carbon, bzw. **TN** = total nitrogen) verschiedener Proben wurde ein TOC-Analysegerät (multi N/C 2100s, Analytik Jena, Jena; TOC-Gas-Generator TG 600, CM^C-Instrument, Eschborn) verwendet.

Das Gerät arbeitet für die Bestimmung des TOCs nach der Differenzmethode. Dabei wurde die Konzentration des Gesamtkohlenstoffs (**TC** = engl. total carbon) und des gesamten anorganischen Kohlenstoffs (**TIC** = engl. total inorganic carbon) gemessen und der TOC durch die Subtraktion des TIC vom TC (**TOC** = TC – TIC) bestimmt. Zunächst erfolgte die Messung des TIC. Dabei wurde der in der zu bestimmenden Probe enthaltene anorganische

Kohlenstoff durch Ansäuern mit 10 %iger ortho-Phosphorsäure zu CO₂ umgesetzt und dieses über einen NDIR-Detektor[®] gemessen. Im Anschluss wurde die zu analysierende Probe in ein Verbrennungsrohr injiziert und dort thermisch bei 800 °C an einem Platinkatalysator mit Sauerstoff zu CO₂ umgesetzt. Dabei wurde das gesamte CO₂, welches zum einen Teil aus der Verbrennung stammte und zum anderen Teil schon in der Probe vorhanden war, ebenfalls detektiert.

Die Bestimmung der Gesamtstickstoffkonzentration (TN) erfolgte simultan zu der Messung des TCs. So wurden bei dem oben beschriebenen Verbrennungsverfahren sämtliche Stickstoffverbindungen in NO_x (NO und NO₂) umgesetzt. Das so generierte Messgas wurde anschließend durch einen Konverter geleitet, der NO₂ zu NO reduziert. Im nächsten Schritt wurde das NO mithilfe von im Gerät erzeugtem O₃ oxidiert, wobei für kurze Zeit das angeregte NO₂⁺ entstand. Beim Zurückfallen in den Ursprungszustand (NO₂) wird Strahlung im Bereich von sichtbarem Licht emittiert, welches über einen Chemolumineszenz-Detektor (CLD) gemessen wurde. Deren Intensität ist dabei proportional zur Menge an NO₂⁺- und folglich zur Gesamtstickstoff-Konzentration.

Alle zu untersuchenden Proben wurden gemäß dem zu erwartenden Kohlenstoffgehalt mit ddH₂O verdünnt (in der Regel 1:10). Gegebenenfalls wurden sie zuvor noch mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm, PTFE, VWR, Darmstadt) filtriert. Die zu messenden Proben wurden in 2 ml Röhrchen geladen, wobei das Injektionsvolumen jeweils 200 µl betrug. Die Messung der Proben erfolgte mindestens als dreifache Bestimmung, wobei bei größeren Abweichungen automatisch noch eine vierte Messung durchgeführt wurde. Weiterhin wurde vor allen Messungen ein Kalibrierungsschritt durchgeführt, bei dem ein Standard, ein Reagenzienblindwert (10 %ige ortho-Phosphorsäure) und ein Verdünnungsblindwert (ddH₂O) gemessen wurden.

12 Konstruktions-Werkzeuge und verwendete Materialien

Die detaillierte Konzeption und Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten BES ist im Ergebnisteil (siehe III, 1) dargestellt. Im folgenden Abschnitt sollen die verwendeten Konstruktionswerkzeuge, Materialien und Verarbeitungsmethoden beschrieben werden.

Für die Konstruktion und Modellierung der einzelnen Komponenten aller entwickelten Systeme wurde die *computer aided design*-Software (CAD) Autodesk Inventor (akademische Lizenz, Version 2012 & 2014, Autodesk, San Rafael, USA) verwendet. Mittels dieses

Programms war es möglich, einzelne Bauteile zu entwerfen und diese anschließend im simulierten 3D-Modell *in silico* zusammenzufügen. Dadurch war es möglich konstruktive Konflikte frühzeitig zu erkennen und zu beheben.

Tab. 28: Für die feinmechanische Verarbeitung verwendete Rohmaterialien.

Material	Werkstoff-Form	Bezugsquelle
Kunststoffhalbzeuge		
Polycarbonat (PC)	Platten (Stärke: 5, 12 mm)	Liebherr & Ketterer
PMMA (Polymethyl- methacrylat)	Platten (Stärke: 2, 5, 10 mm)	(Freiburg i. Br.)
PTFE (Polytetrafluorethylen)	Platten (Stärke: 5 mm)	VWR
Silikon	Rundstäbe (Durchmesser 5, 20, 25 mm) Folie (Stärke: 2 mm, 60 °Shore)	
Metallhalbzeuge		
Edelstahl V4A	Rundstäbe (Durchmesser 2 mm)	Haecker Metall
Edelstahl V4A	Rohre (Außendurchmesser 8 mm, Innendurchmesser 6 mm)	(Pforzheim)
Aluminium	Strebenprofile (40x20 mm, 6 mm Nut)	Aluprofil-Technik- Kohl (Wadgassen)

Weiterhin wurden nach Abschluss des Konstruktionsprozesses technische Zeichnungen (siehe Kapitel VII Anhang Abschnitt 2) für die maschinelle Fertigung aller Einzelteile angefertigt.

Alle Reaktoren wurden überwiegend aus speziell entwickelten, aber teilweise auch kommerziell erhältlichen Teilen zusammengesetzt. Die Fertigung aller speziell konstruierten Fräs- und Drehteile erfolgte in der Feinmechanischen Werkstatt des Instituts für physikalische Chemie (Leitung Dieter Waltz, KIT, Karlsruhe). Weitere Teile wurden per Laserzuschnitt am

Institut für Anwendungsentwicklung (IMTEK, Universität Freiburg) hergestellt. Die verarbeiteten Rohmaterialien und deren Bezugsquelle sind in Tab. 28 dargestellt. Die als Fertigteile bezogenen Komponenten der Konstruktionen sind in Tab. 29 aufgeführt.

Tab. 29: Für die BES verwendete Fertigkomponenten.

Komponenten	Werkstoff / Eigenschaften	Bezugsquelle
Schrauben	Edelstahl V4A / DIN 84 5x10	Schrauben
	Edelstahl V4A / DIN 84 3x10	Jäger
	Edelstahl V4A / DIN 912 5x100	(Karlsruhe)
	Edelstahl V2A / DIN 912 1,4x10	
	Polyamid / DIN 84 5x12	
	Polyamid / DIN 84 3x8	
	Polyamid / DIN 84 2x10	
Gewindestangen	Edelstahl V4A / DIN 976 M5	
Schneidring- Verschraubungen	Edelstahl VA2 / DIN 2353 R ¼ , 8 mm	Ehlgötz Kompressoren & Motoren (Karlsruhe)
Steckverbindungen 45° mit Stecknippel	vernickeltes Messing / 8 mm Kunststoff (blaue Serie)	
L-Steckverbindungen	vernickeltes Messing / 8 mm Kunststoff (blaue Serie)	
T-Steckverbindungen	vernickeltes Messing / 8 mm Kunststoff (blaue Serie)	

Komponenten	Werkstoff / Eigenschaften	Bezugsquelle
Drosselrückschlagventile mit Steckanschluss	vernickeltes Messing / 8 mm Kunststoff (blaue Serie)	Ehlgötz Kompressoren & Motoren (Karlsruhe)
T-Mehrfachverteiler	vernickeltes Messing / 8 mm Kunststoff (blaue Serie)	
Einschraubschlauchtüllen	vernickeltes Messing / 8 mm	
Schlauch	Polyethylen schwarz / 8 mm	
Nutsteine	Stahl verzinkt / M5	Aluprofil- Technik-Kohl (Wadgassen)
Flachdichtungsringe	Silikon 60 °Shore / Außendurchmesser: 85 bzw. 157 mm Innendurchmesser: 74 bzw. 140 mm	RESOSEAL (Westerrönfeld)
Schraubdeckel + Dichtungen	Butyl / Zubehör anaeroben Kulturröhrchen	Dunn Labor- technik
Einmalkanülen	Edelstahl VA2 / G21 0,8 x 120 mm	B.BRAUN (Melsungen)

Komponenten	Werkstoff / Eigenschaften	Bezugsquelle
Gaze (Elektrode)	Platin 99,9 % / 10,24 Maschen / mm ²	Chempur (Karlsruhe)
Kontaktierungsdraht	Platin 99,9 % / Durchmesser 0,1 mm	
Zylindergläser	Borosilikatglas / Zylinder 80 x 80 mm Borosilikatglas / Zylinder 150 x 150 mm	DURAN
Filterkerze	Borosilikatglas / Porengröße 1 - 1,6 µm	ROBU-
Gasverteilungsrohre	Borosilikatglas / Porengröße 40- 100 µm	Glasfilter-Geräte (Hattert)
Magnetrührstäbe	- / Abmessungen 15 x 5 mm	Roth
Acrylglaskleber	- / Acrifix	Evonik Industries (Essen)

13 Bioelektrochemische Systeme

13.1 BES für die Abwasserbehandlung

13.1.1 Betriebsphase I mit synthetischem Abwasser

Im Folgenden soll die initiale Inbetriebnahme des in Kapitel III 1.2 entworfenen BES für die Abwasseraufbereitung dargestellt werden. Detaillierte Erläuterungen zur Konzeption, Funktionsweise und zum Aufbau des Reaktors sind Kapitel III 1.2 bzw. Kapitel IV 1.2 zu entnehmen.

Im ersten Schritt erfolgte die Bestückung des fertigen Reaktors mit Elektrodenmaterial (Sigracell GFD 2,5 Carbonvlief, SGL Carbon, Wiesbaden). Dabei wurde dieses zunächst auf die Elektrodenhalter gespannt und diese in den Reaktor eingesetzt. Anschließend wurden die Stromsammler eingeführt und das Elektrodenmaterial mit Isopropanol benetzt. Daraufhin wurde der Reaktor mit dH₂O mehrmals gefüllt und wieder entleert, um das Isopropanol wieder weitestgehend zu entfernen. Im Anschluss wurde der Reaktordeckel aufgesetzt, der gesamte Aufbau mit dem Aluminiumrahmen verspannt und der Referenzelektrodenhalter mit einer Ag/AgCl-Bezugselektrode (SE11, Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) versehen (Abb. 16).

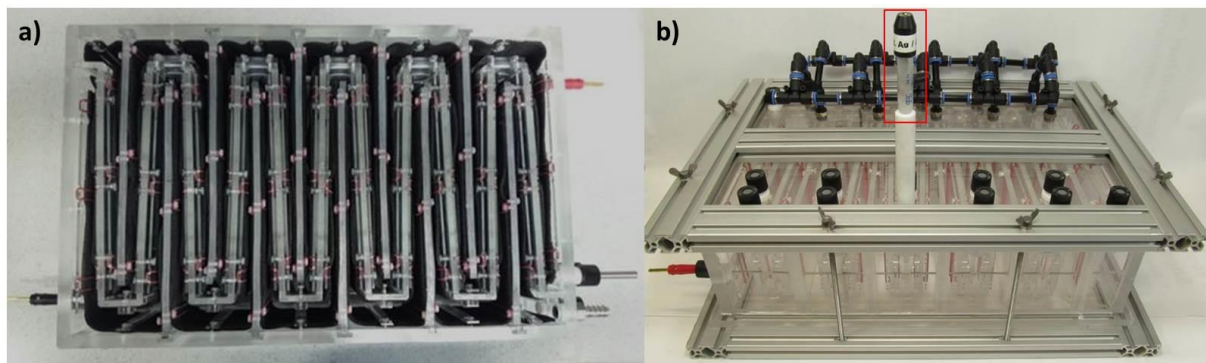


Abb. 16: Fertiggestellter Aufbau des BES zur Abwasseraufbereitung. In **a)** ist der geöffnete Reaktor mit den eingebauten Elektroden, in **b)** der geschlossene Reaktor mit allen weiteren Anbauteilen inkl. Ag/AgCl-Bezugselektrode (roter Kasten) zur besseren Veranschaulichung ohne Elektroden dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde der Reaktor wie in Abb. 17 gezeigt, an einen Potentiostat/Galvanostaten mit 10 A BOOSTER-Modul (PGStat128N, Metrohm Autolab, Filderstadt) für einen Betrieb als M3C angeschlossen. In der Folge wurde das Anodenpotential kontrolliert, dabei der Stromfluss gemessen und gegenüber der Zeit aufgezeichnet (Chronoamperometrie).

Als Bezugselektrode wurde eine Ag/AgCl Elektrode eingesetzt (SE11, Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf).

Im nächsten Schritt wurde der Zulaufanschluss des Reaktors über eine Peristaltikpumpe (IPN-C, ISMATEC, Wertheim) mit dem 20 l Reservoir für das synthetische Abwasser verbunden. Dabei wurde unmittelbar vor dem Zulaufanschluss ein Dreiwegehahn für die Inokulierung des Reaktors eingefügt. Der dabei verwendete Pumpenschlauch wurde zuvor durch Autoklavieren sterilisiert. Weiterhin wurde der Ablaufanschluss über ein Fallrohr, das der Bildung eines Unterdruckes entgegenwirken sollte, mit einem 10 l Abfallbehälter verbunden. Für die Versorgung des Kathodenbereichs mit Druckluft, wurde eine Verbindung mit einer zwischengeschalteten Gaswaschflasche zum Gasverteiler hergestellt.

Nachdem alle Leitungen und Messgeräte angeschlossen waren, wurde der Reaktor vollständig mit synthetischem Abwasser gefüllt. Im nächsten Schritt wurde mittels der Regelventile ein gleichmäßiger Fluss des Druckluftstroms bei allen Begasungslanzen eingestellt.

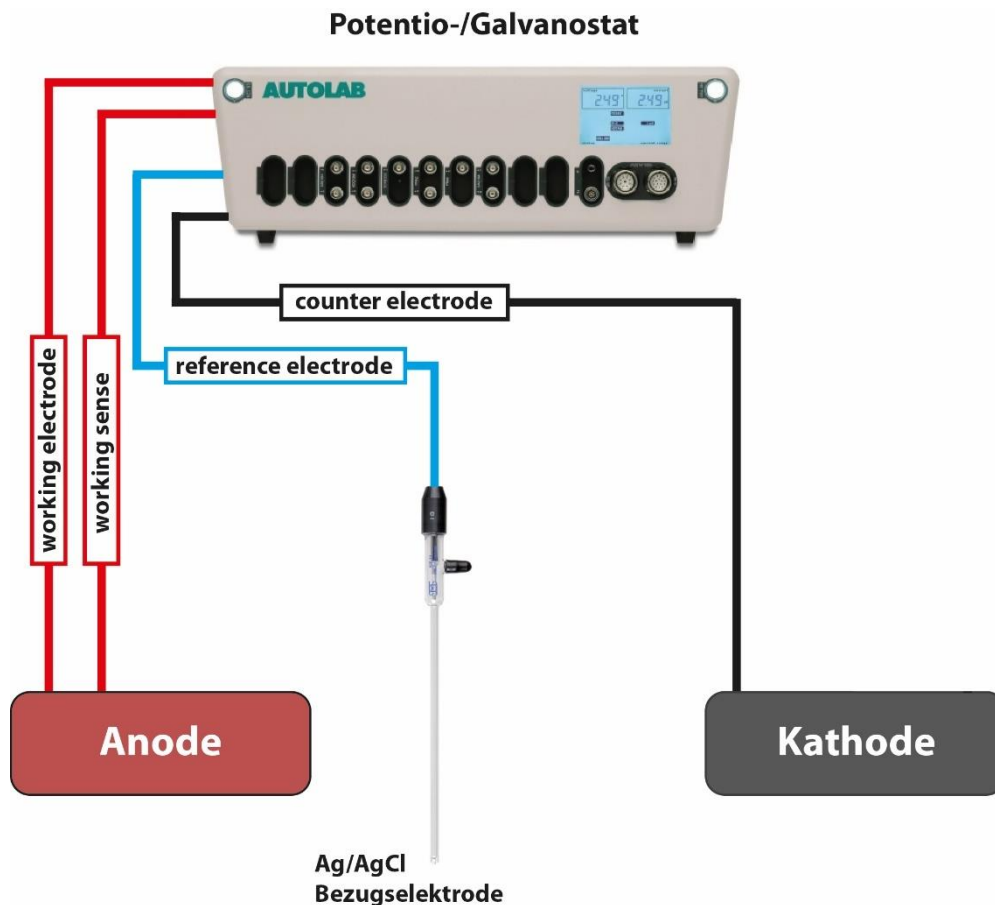


Abb. 17: Verschaltungsschema des Reaktors (3-Elektrodenmodus). Dargestellt ist die Verschaltung der Anode, Kathode und der Bezugselektrode mit den Anschlüssen des Potentio-/Galvanostaten (working electrode, working sense, reference electrode und counter electrode).

Anschließend erfolgte die Inokulierung mit den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Stämmen. Diese wurden mittels einer Spritze über den Dreiwegehahn in den Reaktor injiziert. Daraufhin wurde über die Peristaltikpumpe ein konstanter Fluss von 4 ml/min angelegt, was einer theoretischen Gesamtretentionszeit des Abwassers von 18,5 h entsprach. Im letzten Schritt wurde über den Potentio-/Galvanostaten eine chronoamperometrische Messung gestartet. Dabei wurde ein Arbeitselektrodenpotential von 0 mV gegenüber einer SHE eingestellt. Die dabei fließende Stromstärke wurde über einen Zeitraum von 55 Tagen aufgezeichnet. Der Versuchsaufbau befand sich hierbei in einem klimatisierten Raum, der eine Temperatur von 20-23 °C aufwies. Neben der Stromstärke wurden als weitere Größen der TOC, der TN und der pH-Wert bestimmt. Diese Messungen erfolgten jeweils für den Zulauf, für Abwasser, das den Anodenbereich komplett durchströmt hatte und jenes, das durch den gesamten Reaktor geflossen war. Als Zulaufprobe wurde jede neue angeschlossene Charge von synthetischem Abwasser einmalig analysiert. Die Probenpunkte nach dem Anode- bzw. Kathodenbereich wurden hingegen in Abständen von einem bis gelegentlich drei Tagen über Probeentnahmestutzen beprobt.

Die Einzelwerte der Analysen zeigten von Tag zu Tag teilweise starke Schwankungen. Um die momentanen Trends dieser Werte besser darstellen zu können, wurde jede Wertereihe über die Errechnung eines gleitenden Durchschnitts in Form einer durchgehenden Linie in der jeweiligen Farbe dargestellt. Die Berechnung und Darstellung erfolgte mittels einer Analysesoftware (OriginLab 2015, Northampton, USA) unter Verwendung des Glättungsfilters (Modus gleitender Durchschnitt, Fenstergröße =5).

13.1.2 Betriebsphase II mit kommunalem Abwasser

Nach Abschluss der Betriebsphase I, wurde der Reaktor mit allen Versorgungs- und Messapparaturen in das Technikum der Emscher Genossenschaft im Klärwerk Emschermündung in Dinslaken überstellt. Dort wurde der Versuchsaufbau weitgehend wie in 13.1.1 beschrieben rekonstruiert. Die einzigen Unterschiede bestanden in der Versorgung mit Abwasser und der Steuerung des Potentio-/Galvanostaten, welche nun auch mittels Fernsteuerung vom KIT aus erfolgen konnte. Die Beschickung des Reaktors wurde nun wie folgt durchgeführt: Ein Teil des Überlaufs der Vorklärungsstufe des Pilotklärwerks im Technikum wurde zunächst in einen weiteren Sedimentationsbehälter gepumpt. Aus diesem wurde anschließend das Abwasser aus dem oberen Drittel mittels der Peristaltikpumpe in den Reaktor gepumpt (4 ml/min). Die Beprobung wurde in gleicher Weise fortgeführt, wobei die

Beprobung des Zulaufs nun mittels eines Beprobungsstutzens direkt hinter dem Zulaufanschluss erfolgte. Die Proben für die TOC- und TN-Messungen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, bei -20 °C eingefroren und in regelmäßigen Abständen, im gefrorenen Zustand zur Analyse an das KIT geschickt. Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte vor Ort im Labor des Technikums.

13.2 M3C für die Untersuchung der Elektrotrophie von optimierten *R. sphaeroides*-Stämmen

Im Folgenden soll die Vorbereitung und Verwendung der in Kapitel III Abschnitt 1.1.2 entworfenen 280 ml M3C für die Untersuchung der Elektrotrophie von optimierten *R. sphaeroides*-Stämmen dargestellt werden. Detaillierte Erläuterungen zur Konzeption, Funktionsweise und zum Aufbau des Reaktors sind Kapitel III Abschnitt 1.1.2 bzw. Kapitel IV Abschnitt 1.1.2 zu entnehmen. Im ersten Schritt wurden die Reaktoren wie folgt zusammengesetzt: Zunächst wurde die 6 x 3,5 cm große Arbeitselektrode (Sigracell GFD 2,5, SGL Carbon) in den Arbeitselektrodenhalter eingespannt und dieser in den Reaktordeckel eingeschraubt. Danach wurde das Gegenelektrodenkompartiment, das mit einer Platingegenelektrode versehen war, mit einer protonenpermeablen Membran (PEM) (Durchmesser 1,9 cm; Fumapem F-950, fumatech, Bietigheim-Bissingen) versehen und ebenfalls in den Deckel eingeschraubt. Nachdem die Beprobungsstutzen, der Bezugselektrodenhalter und das Entgasungsrohr angebracht waren wurde zunächst das Gegenelektrodenkompartiment mittels einer Spritze mit dH₂O gefüllt und die Membran auf Dichtigkeit überprüft. Daraufhin wurde die Arbeitselektrode mit Isopropanol benetzt und diese durch fünfminütiges wässern in dH₂O weitestgehend wieder entfernt. Anschließend wurde das Zylinderglas mit 280 ml dH₂O befüllt, mit einem Magnetrührstab (15 x 5 mm, Roth) versehen und der Füllstand markiert. Der komplettierte Reaktordeckel wurde auf das Glas aufgesetzt und mittels der Schrauben mit der Bodenplatte verspannt. Alle Öffnungen wurden mit Aluminiumfolie (Roth) verschlossen und die Aufbauten durch Autoklavieren sterilisiert.

Nach dem Autoklavieren wurde aus den Aufbauten zunächst das Wasser durch einen geöffneten Beprobungsstutzen unter einer Sterilbank (HeraSafe, Hereaus, Hanau) entfernt. Anschließend wurde das Gegenelektrodenkompartiment mit 60 ml Resuspensionspuffer (Tab. 13) durchgespült und anschließend eine mit 20 ml gefüllte Spritze als Elektrolyt-Reservoir am

Kompartiment angeschlossen belassen. Im nächsten Schritt wurden die gegenüber einer Referenzbezugselektrode kontrollierten, und danach unter UV-Licht (302 nm) sterilisierten, Ag/AgCl-Bezugselektroden eingebaut. Zum Abschluss wurden Einwegkanülen (0,8 x 40 mm 21G, B.Braun), die mit einem Spritzenvorsatzsterilfilter (0,22 μ M Porengröße) versehen waren, für die spätere Begasung angeschlossen.

Die Reaktoren wurden anschließend in einem mit Infrarot-Lampen (840 nm, 48-LED CCTV-IR, TOOGOO, Hong Kong) modifizierten Inkubator (Incudrive H, Schuett Biotec, Göttingen) auf Magnetrührern (Topolino, IKA) platziert. Der Abstand zu den IR-Lampen betrug dabei jeweils 10 cm. Die Magnetrührer wurden auf die niedrigste Geschwindigkeitsstufe (ca. 120 U/min) eingestellt und im nächsten Schritt die Reaktoren an die Gasversorgung mit N₂/CO₂-Gasgemisch (80/20) angeschlossen. Es folgte das Einstellen eines konstanten Gastromes im Kopfraum des Reaktors. Weiterhin wurden die Aufbauten mit einem Potentiostaten (μ STAT 8000P, Drop Sense, Llanera, Spanien) als M3C kontaktiert. Nachdem die Reaktoren komplett angeschlossen waren, wurden die in Abschnitt 3.2 beschriebenen, inokulierten RS-PLA-Medien, wie in 3.1.2 erläutert, per Überdruck anaerob in die Reaktoren überführt. Anschließend wurden die IR-Lampen eingeschaltet und eine chronoamperometrische Messung für 120 h bei einem Arbeitselektrodenpotential von -500 mV gegenüber einer SHE durchgeführt (Abb. 18).

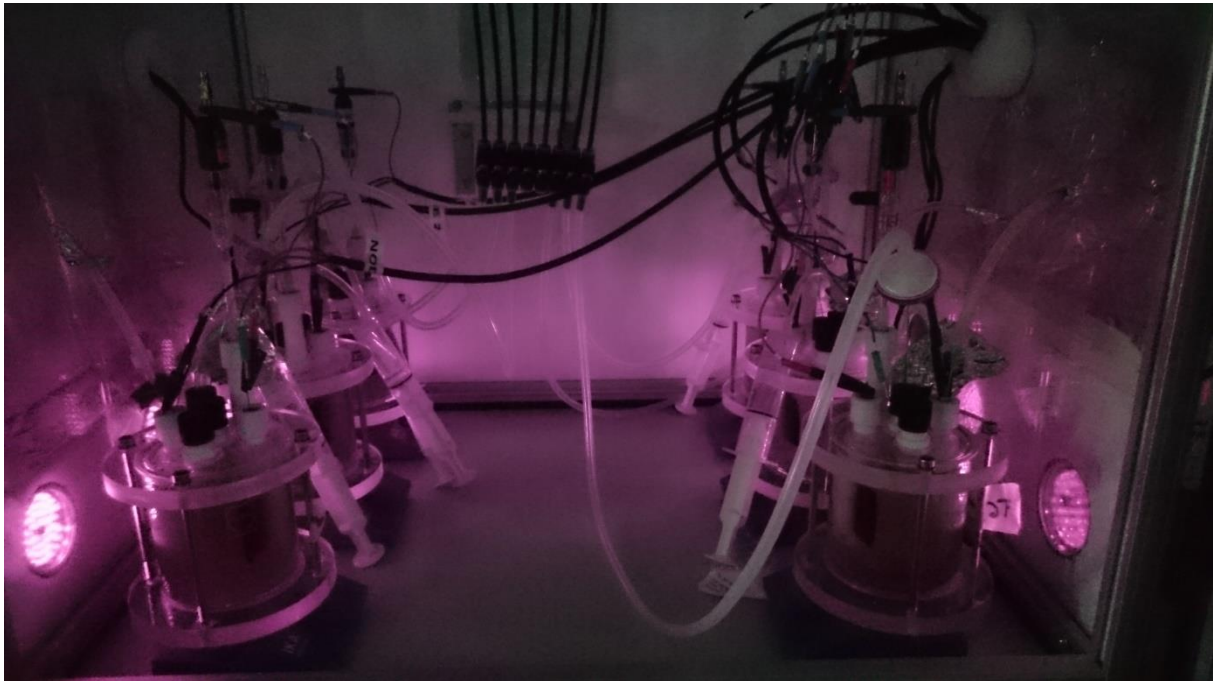


Abb. 18: Kompletter Versuchsaufbau des 280 ml BES mit *R. sphaeroides*.

Unter diesen Bedingungen stellte die Arbeitselektrode die Kathode und die Gegenelektrode die Anode dar. Die Beprobung der Reaktoren erfolgte täglich, wobei jeweils die OD₆₅₀ und der pH-Wert gemessen wurden. Letzterer wurde ggf. mit sterilen, anaeroben HCl- oder NaOH-Lösungen 2 h vor der Probennahme auf pH = 7 nachjustiert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass sich das System auf die neuen Bedingungen anpassen kann.

Die Berechnung des Betrags der gemessenen, mittleren Stromdichte erfolgte wie unten dargestellt (Abb. 19):

$$(1) \quad Q = \int_{t_0}^t |I| \times dt$$

$$(2) \quad \bar{I} = \frac{\Delta Q}{\Delta t}$$

$$(3) \quad \vec{j} = \frac{\bar{I}}{A}$$

Abb. 19: Formeln für die Berechnung der mittleren Stromstärke über den gesamten Versuchszeitraum.

(1) Q entspricht der geflossenen Ladung im Versuchszeitraum [t]; (2) \bar{I} entspricht der mittleren Stromstärke im Versuchszeitraum; (3) \vec{j} entspricht der mittleren Stromdichte der Arbeitselektrodenfläche [A].

Dabei wurde zunächst die geflossene Ladung über den gesamten Versuchszeitraum berechnet. Anschließend wurde die mittlere Stromstärke in diesem Zeitraum bestimmt und diese auf die geometrisch zugängliche Fläche der Arbeitselektrode bezogen, was der mittleren Stromdichte dieser über den gesamten Versuchszeitraum entsprach.

III Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus drei Teilen zusammen, die sich zum einen mit der Entwicklung und zum anderen mit der Charakterisierung von BES und unterschiedlichen Bakterienstämmen befassen. Dabei wird im ersten Teil die Entwicklung von zwei vielfältig einsetzbaren M3Cs und die Entwicklung eines neuartigen BES zur Abwasserreinigung beschrieben. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des entwickelten Abwasser-BES unter Laborbedingungen und dem darauffolgenden Feldversuch. Der dritte Teil der Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung von molekularbiologisch modifizierten *R. sphaeroides*-Stämmen. Diese sollten dabei in einer der, im ersten Abschnitt entwickelten, M3Cs bezüglich ihrer Elektronenaufnahmekapazität von einer Kathode untersucht werden.

1 Entwicklung neuer bioelektrochemischer Systeme

Eine Voraussetzung für die Untersuchung diverser Fragestellungen in den meisten Bereichen der Naturwissenschaften sind geeignete Versuchs- und Messapparaturen. Dies betrifft auch das Forschungsfeld der Bioelektrochemie, wobei die Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen Systemen für dieses Gebiet recht eingeschränkt ist. So werden häufig Apparaturen der klassischen Elektrochemie wie z.B. H-Zellen eingesetzt. Für die Untersuchung vieler Fragestellungen sind diese Systeme jedoch aufgrund ihrer Form und Gestaltung oft ungeeignet. Daher ist die Entwicklung neuer, speziell auf bestimmte Anwendungen zugeschnittener, aber auch universell nutzbarer Lösungen ein wichtiger Bereich im Forschungsfeld der Bioelektrochemie.

Im Folgenden soll nun detailliert auf die Gestaltung dieser Systeme eingegangen werden, die als CAD-Modelle dargestellt sind. Die zugehörigen technischen Zeichnungen aller entworfenen Bauteile können mit genauen Bemaßungen dem Anhang entnommen werden (siehe Kapitel VII Anhang, Abschnitte 2.1 - 2.3). Die kommerziell erworbenen, verbauten Komponenten sind Tab. 29 (Kapitel II, Abschnitt 12) zu entnehmen.

1.1 Entwicklung einer vielseitig einsetzbaren mikrobiellen 3-Elektrodenzelle

Wie schon zuvor erwähnt zeichnen sich M3Cs vor allem dadurch aus, dass eine große Bandbreite an bioelektrochemischen Prozessen unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden kann. Die Vielseitigkeit dieser Messanordnung sollte durch die Entwicklung einer möglichst variablen, robusten und in der Herstellung preiswerten Versuchsapparatur ergänzt werden. Daher wurde ein System mit zwei verschiedenen Arbeitsvolumina entwickelt, das im Wesentlichen aus einem Glaszylinder und einem abnehmbaren Deckel besteht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle für ein Experiment benötigten Elemente wie Elektroden, Probeentnahmestutzen, Begasungsrohre etc. zum einen in diesem Deckel integriert und zum anderen auch mit diesem zusammen entfernt werden können. Dabei sollte die Anordnung der einzelnen Elemente weitgehend frei wählbar sein.

1.1.1 Mikrobielle 3-Elektrodenzelle mit 2000 ml Arbeitsvolumen (Version A)

Der erste Planungsschritt umfasste den Entwurf eines, auf den Glaszylinder passenden, Kunststoffdeckels (Abb. 20). Um eine hohe Temperaturbeständigkeit zu erreichen, sollte dieser aus 12 mm starkem PC gefertigt werden. Die Runde Grundfläche wurde mit verschiedenen Fräsungen und Bohrungen versehen: Um den Deckel auf den Glaszylinder aufsetzen zu können, weist dieser eine 4 mm tiefe, umlaufende Nut auf.

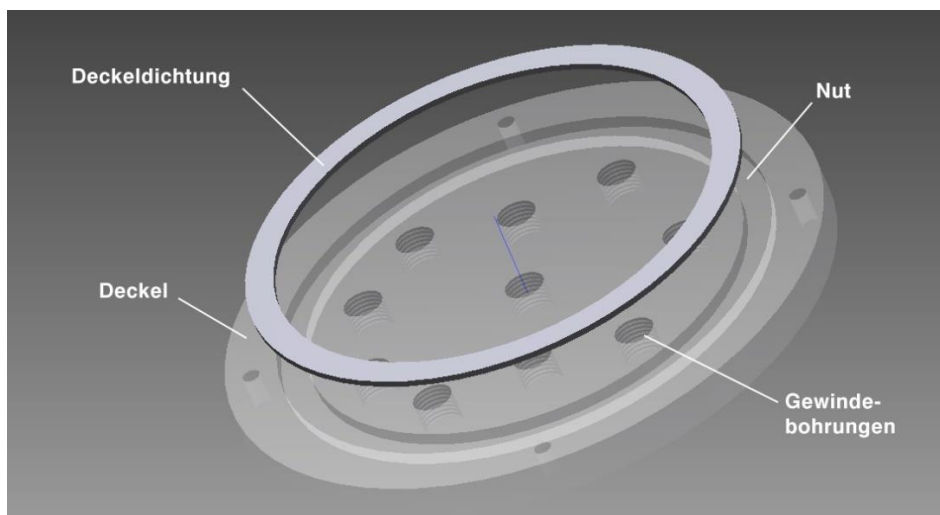


Abb. 20: Explosionsdarstellung des Zylinderdeckels. Das CAD-Modell zeigt die Bohrungen und Fräsungen des Deckels und die zugehörige Silikonflachdichtung von unten.

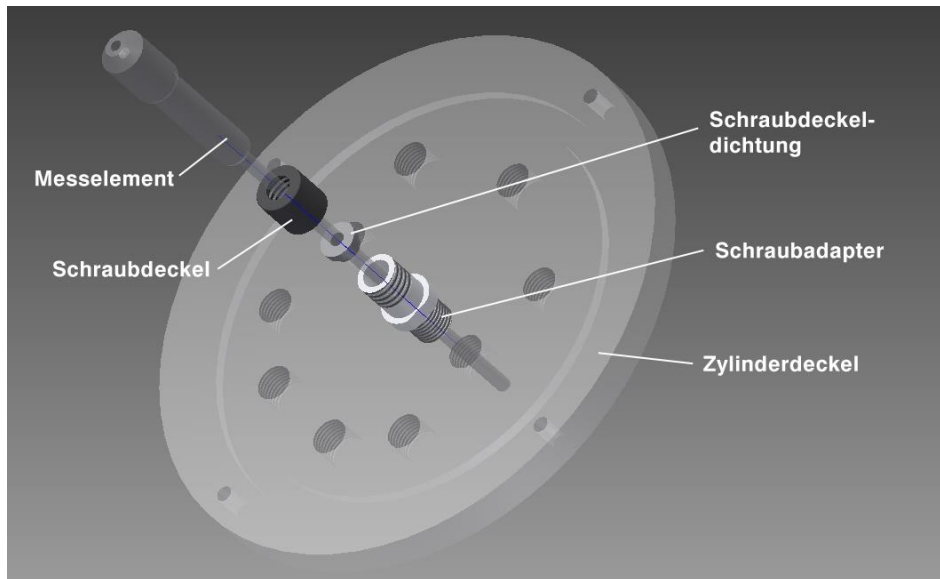


Abb. 21: Explosionsdarstellung der Integration eines Messelements in den Zylinderdeckel. Das CAD-Modell zeigt wie ein Messelement (in diesem Fall eine Bezugselektrode) mithilfe eines Schraubadapters, einer, durch eine Bohrung angepassten, Schraubdeckeldichtung und einem Schraubdeckel im Zylinderdeckel integriert wurde.

Diese Nut sollte zum einen für die Führung des Deckels auf den Zylinder sorgen und zum anderen zur Aufnahme einer passenden Silikonflachdichtung dienen. Weiterhin wurde der Deckel innerhalb des Nutkreises mit zehn Gewindebohrungen versehen, in welche spezielle Adapter aus PTFE eingeschraubt werden konnten. Außerhalb des Nutkreises wurden vier weitere Bohrungen gesetzt, die für die Verspannung des Deckels mit dem Zylinder vorgesehen waren. Der nächste Schritt war der Entwurf des zuvor erwähnten PTFE-Adapters. Dieser verfügte auf der einen Seite über ein, zu den Gewindebohrungen des Zylinderdeckels, passendes Außengewinde. So war es möglich den Adapter mit dem Deckel zu verbinden. Die andere Seite des Adapters wurde mit einem Spezialaußengewinde versehen, auf welches Schraubdeckel von kommerziell erhältlichen, anaeroben Glaskulturröhrchen (Dunn Labortechnik) aufgeschraubt werden konnten. Weiterhin verfügte der Adapter über eine durchgängige Bohrung entlang der Gewindeachse. In diese Bohrung konnte eine, zum Schraubdeckel zugehörige, Dichtung eingesetzt werden. Durch die Modifikation dieser Dichtung mittels Bohrungen im Durchmesser des einzubringenden Elements, war es möglich verschiedene Bauteile oder Messsonden mit dem Adapter zu verspannen und so in den Zylinderdeckel zu integrieren (Abb. 21).

Weiterhin wurde ein Arbeitselektrodenhalter entworfen, mit dem es möglich war verschiedene Elektrodenmaterialien zu nutzen (Abb. 22). Dieser besteht aus einer Grundplatte aus PC, welche mit sechs Gewindebohrungen und einer zylindrischen Fräsung für die

Deckelhalterung versehen war. Der zweite Teil des Arbeitselektrodenhalters war in der Grundform identisch, wies jedoch eine rechteckige Öffnung zwischen den sechs Bohrungen auf (Fassung). Zwischen den Grundplatten und der Fassung wurden zwei Silikondichtungen eingefügt, die der jeweiligen Grundform dieser Platten angepasst waren. Durch Verspannen der vier Elemente mittels Polyamidschrauben, konnte zum einen eine gewünschte Elektrode im Arbeitselektrodenhalter fixiert werden.

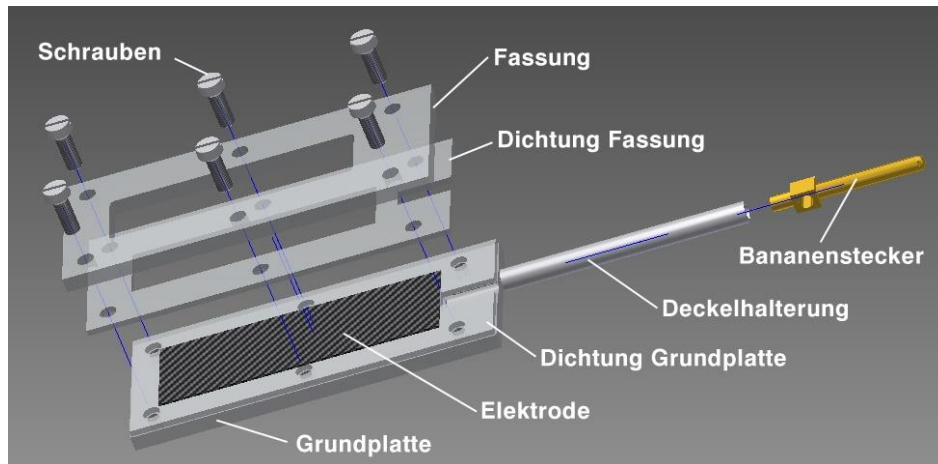


Abb. 22: Explosionsdarstellung des Arbeitselektrodenhalters. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Arbeitselektrodenhalters.

Zum anderen war es so möglich die aus PTFE gefertigte, zylindrische Deckelhalterung mit dem Halter zu verspannen. Dieser wies eine durchgehende Innenbohrung auf, die eine Durchführung eines, für die elektrische Kontaktierung der Arbeitselektrode, benötigten Platindrahts ermöglichen sollte. In den aus dem Deckel herausragenden Teil der Halterung konnte ein Bananenstecker eingesteckt werden. Über diesen war es möglich den Platindraht und folglich auch die Arbeitselektrode mit einer Messapparatur, wie z.B. einem Potentiostaten, elektrisch zu verbinden. Durch die Art der Einfassung der Arbeitselektrode sollte eine definierte, zugängliche Fläche (16 cm^2) geschaffen werden, die unabhängig von der Zuschnittgröße, konstant bleibt.

Die übrigen benötigten Bauelemente wurden kommerziell erworben und entweder unverändert verwendet (z.B. Bezugselektroden) oder modifiziert (z.B. Gegenelektrodenhalter). Letzterer wurde aus einer sehr feinporigen Filterkerze hergestellt, in welche eine über einen Platindraht kontaktierte Platindraht-Gaze ($10,24 \text{ Maschen} / \text{mm}^2$, $25 \times 5 \text{ mm}$) eingehängt wurde. Dieses Netz wurde im Bereich der Glasfritte positioniert und über den Draht mittels eines Bananensteckers am oberen Teil der Filterkerze fixiert und kontaktiert (siehe Abb. 23).

Durch die zuvor beschriebene Art der Integration der Bauelemente in den Deckel, war es möglich eine sehr große Bandbreite an Konfigurationen mit dieser M3C zu verwirklichen. In Abbildung Abb. 23 sind beispielhaft zwei mögliche 3-Elektroden-Messanordnungen gezeigt. Auf der linken Seite ist eine einfache Anordnung mit einer Arbeits-, einer Bezugs- und einer Gegenelektrode dargestellt (Abb. 23a). Die übrigen, freien Schraubadapteranschlüsse konnten dabei über die Schraubdeckeldichtung individuell angepasst werden und für gewünschte Zusatzfunktionen, wie z.B. Beprobung, Be- und Entgasung oder Zu- und Abpumpen von Flüssigkeiten genutzt werden. Weiterhin konnte die Anordnung aller Elemente, solange der benötigte Bauraumvorhanden war, frei gewählt werden. Auf der rechten Seite ist eine Konfiguration mit zwei 3-Elektrodenanordnungen dargestellt (Abb. 23b). Diese ermöglichte es zwei unabhängige Messungen in einer Versuchsapparatur zu verwirklichen. Auch hier war es möglich weitere Elemente, wie eine weitere Filterkerze als Begasungsrohr, über die Schraubadapter in den Deckel zu integrieren. Der mit den gewünschten Elementen versehene Deckel sollte abschließend mit dem Glaszylinder verspannt werden. Dafür wurde eine Bodenplatte aus 12 mm PC mit der Grundform des Deckels entworfen.

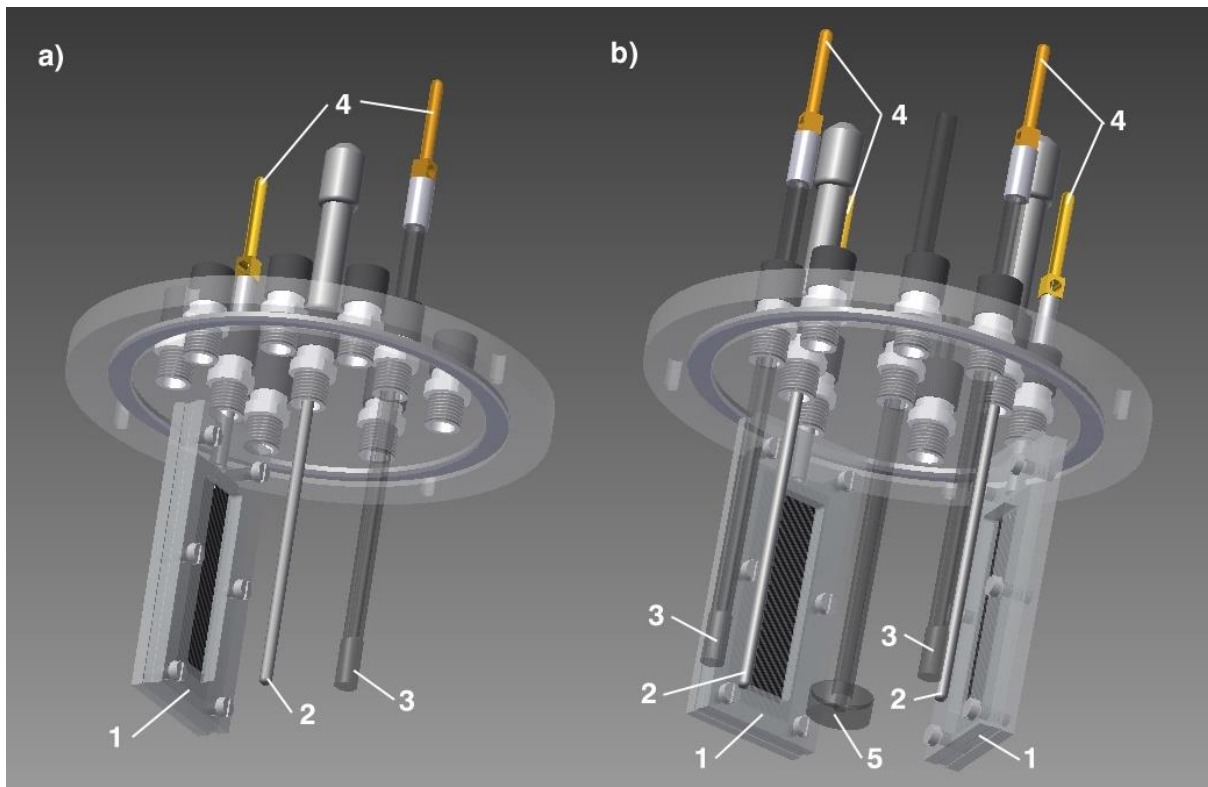


Abb. 23: CAD-Modelle des Zylinderdeckels in zwei verschiedenen 3-Elektroden-Konfigurationen. a) Einfache 3-Elektroden-Anordnung. **b)** Doppelte 3-Elektroden-Anordnung. 1) Arbeitselektrodenhalter; 2) Bezugs-
elektrode; 3) Gegenelektrodenhalter; 4) Bananenstecker; 5) Begasungsrohr.

Diese wies statt der Nut eine durchgehende Vertiefung auf, in welche eine Silikondichtung eingelegt werden konnte. Diese sollte einem ungewünschten Verrutschen des Zylinderglases vorbeugen. Weiterhin war die Bodenplatte mit vier Gewindebohrungen außerhalb der Vertiefung versehen, in welche Gewindestangen eingeschraubt werden konnten. Diese sollten dabei zur Verspannung des Deckels mit dem Zylinderglas über Flügelmutter dienen. Des Weiteren wurde die Bodenplatte bewusst aus Kunststoff entworfen, um eine aktive Durchmischung des Zylinders über einen Magnetrührer mittels Rührstab zu ermöglichen (Abb. 24a).

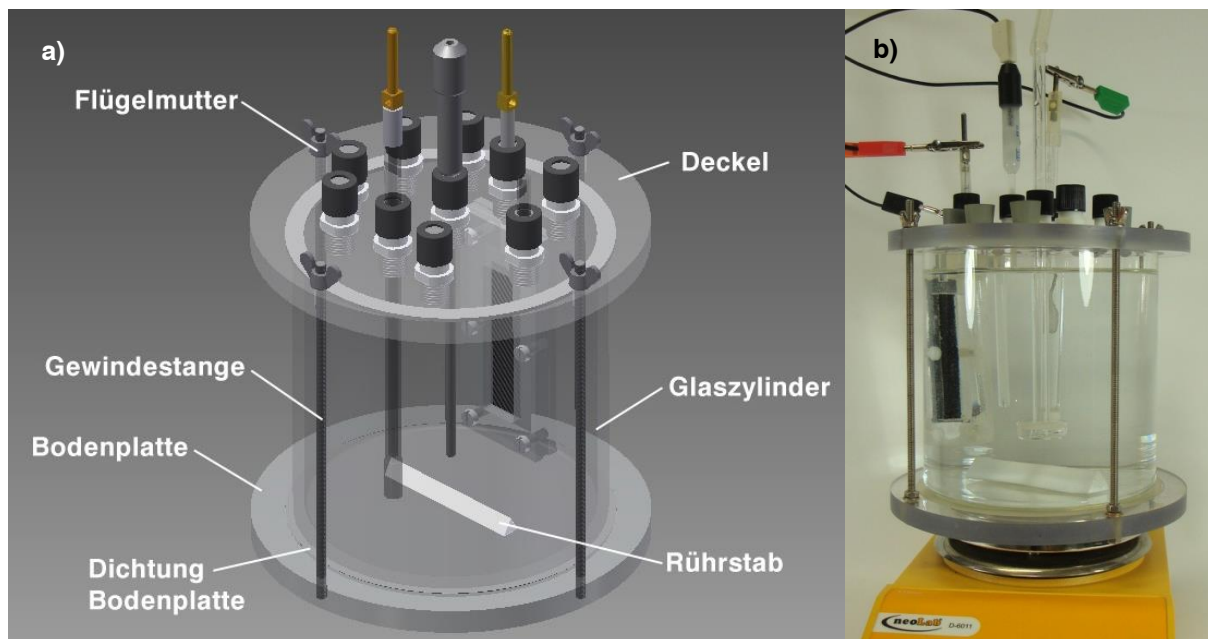


Abb. 24: Zusammengesetzte 2000 ml M3C (Version A) in einfacher 3-Elektroden-Konfiguration. a) Das CAD-Modell zeigt den Aufbau der gesamten Zelle. **b)** Die Fotografie zeigt die fertiggestellte Zelle.

In Abbildung 24 ist die komplette, anhand der zuvor beschriebenen Entwürfen gefertigte M3C dargestellt. Diese Version der Zelle wurde bisher in mehreren Arbeiten erfolgreich zur Untersuchung verschiedener bioelektrochemischer Fragestellungen verwendet, was vor allem durch ihre Vielseitigkeit ermöglicht wurde (Dolch, 2014; Sturm-Richter *et al.*, 2015; Reiner, 2015; Geiger, 2016). Dennoch wurden bei der Anwendung auch einige Bereiche identifiziert, die Raum für Optimierungen boten. Daher wurde basierend auf dem Grundprinzip dieses Aufbaus eine weitere Version entwickelt, die neben einem kleineren Arbeitsvolumen weitere Detailverbesserungen im Bereich verschiedener Bauelemente aufweist.

1.1.2 Mikrobielle 3-Elektrodenzelle mit 280 ml Arbeitsvolumen (Version B)

Basierend auf dem Grundentwurf der zuvor entwickelten M3C, wurde im ersten Schritt der Konzeption zunächst das Arbeitsvolumen reduziert. Dies bot mehrere Vorteile wie z.B. eine Erhöhung des Arbeitselektrodenflächen-Volumen-Verhältnisses. Weiterhin wurden der Arbeits- und der Gegenelektrodenhalter an das neue Format angepasst und in diesem Zuge umgestaltet bzw. optimiert.

Für den Arbeitselektrodenhalter wurde eine komplett neue Form gewählt, die es ermöglichte den gesamten Halter in den Zylinderdeckel einschrauben zu können. In Abbildung 25 ist dessen Konstruktion mit allen Komponenten als Explosionszeichnung dargestellt.

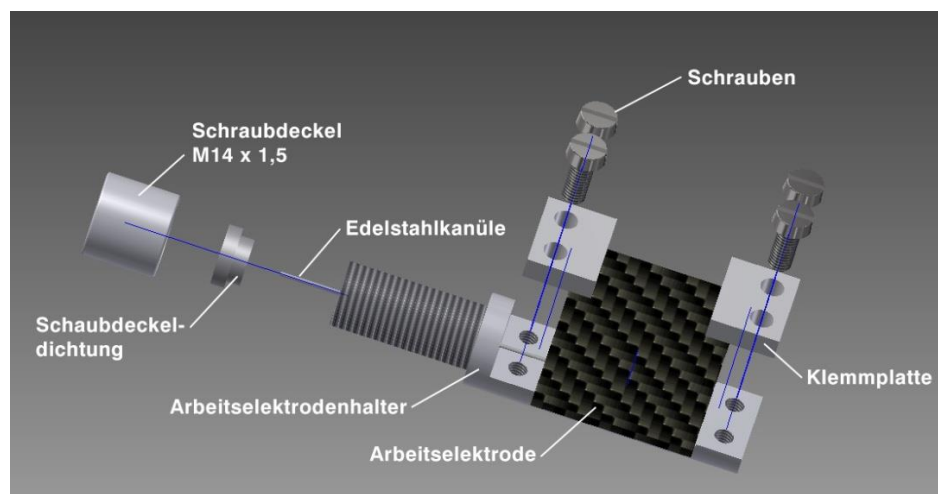


Abb. 25: Explosionsdarstellung des verbesserten Arbeitselektrodenhalters. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Arbeitselektrodenhalters.

Der aus PTFE gefertigte Arbeitselektrodenhalter war in zwei Bereiche gegliedert. Der mit Flächen versehene Teil (hier rechts dargestellt) verfügte über eine, für das Einpassen der Arbeitselektrode, vorgesehene Vertiefung, welche an beiden Enden von zwei Flächen mit je zwei Gewindebohrungen flankiert wurde. Diese dienten der Verschraubung der beiden Klemmplatten, die die Arbeitselektrode mit dem Arbeitselektrodenhalter verspannen sollten. Die Standardabmessungen der Arbeitselektrode für diese Konfiguration betrug 60 x 35 mm, was einer geometrisch zugänglichen Fläche von 33 cm² entsprach (Vorder- und Rückseite).

Der zylindrische Teil des Arbeitselektrodenhalters (hier links dargestellt) wies auf der gesamten Länge ein, für das Einschrauben in den Zylinderdeckel vorgesehenes, Außengewinde auf. Weiterhin war dieser Teil des Halters mit einer kleinen, zentralen Bohrung versehen, die bis zur angrenzenden Schraubfläche der Klemmplatte reichte. Durch diese Bohrung war es möglich, eine Edelstahlkanüle bis zum unteren Ende der eingebauten

Arbeitselektrode durchzuführen und mit dieser zu verspannen. So konnte die Kanüle als Stromsammler für die Elektrode dienen. Ein Problem hierbei war, dass diese zentrale Bohrung eine offene Verbindung zwischen dem Innenraum und der Umgebung der fertig aufgebauten Zelle hergestellt hätte. Daher wurde am oberen Ende des Arbeitselektrodenhalters eine Schraubdeckeldichtung über eine weitere Bohrung eingepasst. So war es möglich den zentralen Kanal gegen ein Austreten von Flüssigkeit aus dem Inneren der Zelle abzudichten und dennoch den Stromsammler aus dem Arbeitselektrodenhalter herauszuführen. Diese Dichtung wurde nach dem Einschrauben des Arbeitselektrodenhalters in den Deckel über einen passenden Schraubdeckel mit dem Halter verspannt.

Auch auf der Seite der Gegenelektrode wurden Optimierungen vorgenommen. Eine wichtige Weiterentwicklung war hierbei der Austausch der, in der ersten Version als Separator verwendeten, Filterkerze durch eine PEM. Dadurch sollte der Einfluss der Gegenelektrodenreaktion auf das Arbeitselektrodenkompartiment verringert werden. In diesem Zuge wurden zwei Komponenten entwickelt: Zum einen ein neuer Gegenelektrodenhalter und zum anderen ein, in den Deckel einschraubbares, Gegenelektrodenkompartiment. In letzteres sollte der Gegenelektrodenhalter samt Gegenelektrode und der PEM integriert werden. Der Gegenelektrodenhalter wurde komplett aus PTFE gefertigt und ist mit allen Komponenten als Explosionszeichnung in Abbildung 26 dargestellt.

Der Grundkörper war in zwei Bereiche gegliedert und verfügte auf der einen Seite über einen rechteckigen, flächigen Teil, der mit einer mittigen Bohrung versehen war.

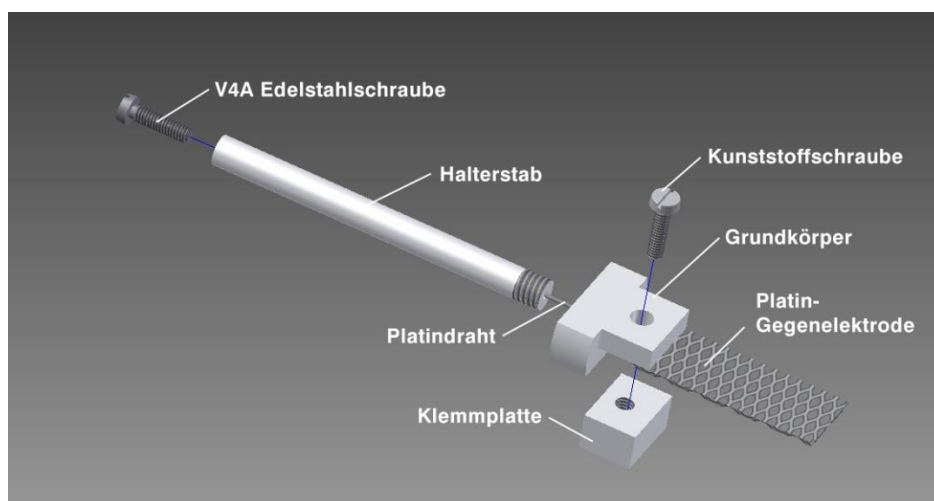


Abb. 26: Explosionsdarstellung des verbesserten Gegenelektrodenhalters. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Gegenelektrodenhalters.

Mithilfe einer Kunststoffschraube und einer Klemmplatte mit Gewindebohrung wurde die Platingenelektrode mit dem Grundkörper verspannt. Diese bestand aus einer Platindraht-Gaze (10,24 Maschen / mm²) mit einer geometrischen Grundfläche von 25 x 10 mm.

Auf der anderen Seite des Grundkörpers befand sich ein breiterer, mit einer Außenrundung versehener Bereich, an dessen Stirnseite eine zentrale Gewindebohrung gesetzt wurde. Die Bohrung wurde so ausgeführt, dass am Übergang der beiden Bauteilbereiche ein mittiger Kanal entstand. Durch diesen konnte ein als Stromsammler dienender Platindraht zur Gegenelektrode durchgeführt und mit dieser verspannt werden. In die Gewindebohrung wurde ein Halterstab über ein, am unteren Ende des Stabes befindliches, Außengewinde eingeschraubt. Weiterhin verfügte der Halterstab über eine durchgehende, zentrale Bohrung, durch die der Platindraht zum oberen Ende des Halters durchgeführt werden konnte. Dort wurde eine zentrale Gewindebohrung für eine Edelstahlschraube gesetzt. So war es möglich den Platindraht von der Gegenelektrode durch den Halterstab zu führen und an dessen oberem Ende mit der Edelstahlschraube zu verspannen. Dadurch konnte eine elektrische Kontaktierung der Gegenelektrode mit der Edelstahlschraube erreicht werden. Wie beim Arbeitselektrodenhalter beschrieben bestand auch in diesem Fall das Problem der Abdichtung des Stromsammlerkanales. Dies konnte durch das Einbringen von Heißkleber in die Verschraubung von Halterstab und Grundkörper gelöst werden.

Auch das Gegenelektrodenkompartiment wurde komplett aus PTFE gefertigt und ist mit allen Komponenten in Abbildung 27 als Explosionszeichnung dargestellt.

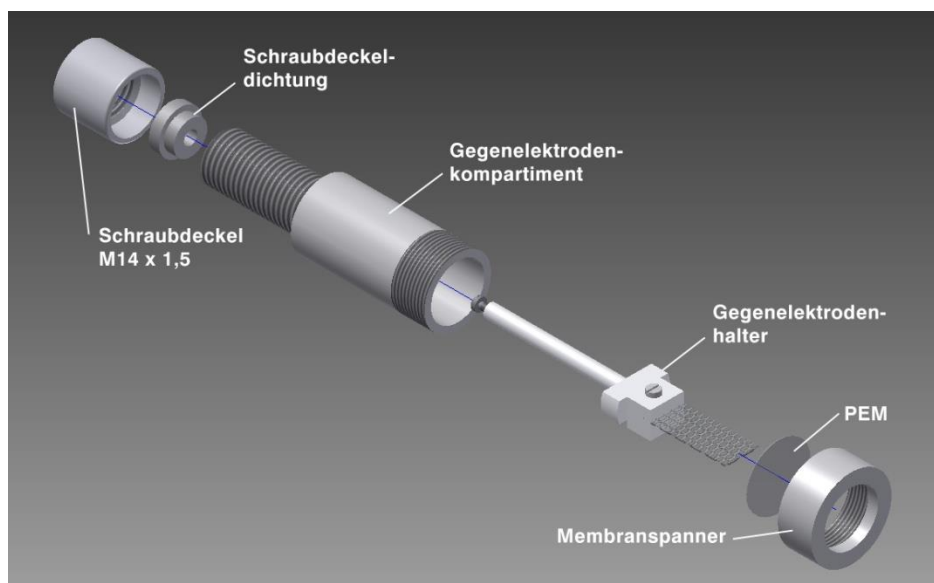


Abb. 27: Explosionsdarstellung des kompletten Gegenelektrodenkompartiments. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Gegenelektrodenkompartiments.

Das röhrenförmige Gegenelektrodenkompartiment war in zwei Bereiche gegliedert. Der schmalere der beiden war durchgehend mit einem Außengewinde versehen, das für das Einschrauben des Kompartiments in den Zylinderdeckel vorgesehen war. Weiterhin wurde dort eine zentrale, durchgehende Innenbohrung gesetzt, deren Durchmesser entsprechend der einzusetzenden Schraubdeckeldichtung gewählt wurde. Der breitere Bereich des Gegenelektrodenkompartiments wurde mit einem, am Ende befindlichen, Außengewinde versehen. Die zentrale Bohrung in diesem Bereich wurde so gewählt, dass ein möglichst großes Innenvolumen erreicht, aber gleichzeitig die mechanische Stabilität des Bauteils gewährleistet wurde. Der oben beschriebene Grundkörper des Gegenelektrodenhalters wurde ebenfalls an diese Bohrung angepasst, sodass der gesamte Halter passend in diesen Teil des Kompartiments hineingeschoben werden konnte. Die Fixierung des Gegenelektrodenhalters erfolgte über eine passende Schraubdeckeldichtung, die den Halterstab in Position hielt. Nach dem Einbau des Gegenelektrodenhalters, wurde die passend zugeschnittene PEM (Durchmesser: 19 mm) in den Membranspanner gelegt und durch Aufschrauben mit dem Gegenelektrodenkompartiment verspannt. Die Schraubdeckeldichtung wurde, nach dem Einschrauben des komplettierten Kompartiments in den Zylinderdeckel, abschließend mit einem passenden Schraubdeckel verspannt. Das Gesamtvolumen des kompletten Bauteils betrug 10,5 ml mit einer zugänglichen Separatorfläche von 2,01 cm². Neben diesen beiden neuen Komponenten wurde des Weiteren noch ein spezieller Halter für die Bezugselektrode entwickelt. Ziel dieser Maßnahme war die Führung und somit die Positionierung der Bezugselektrode zu verbessern.

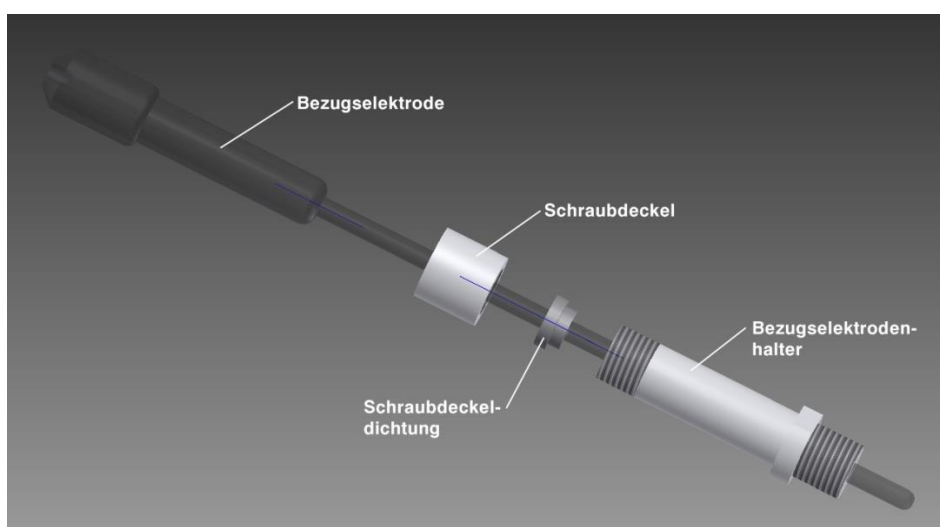


Abb. 28: Explosionsdarstellung des Bezugselektrodenhalters. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Bezugselektrodenhalters.

In Abbildung 28 ist der Bezugselektrodenhalter mit allen zugehörigen Komponenten als Explosionszeichnung dargestellt. Der aus PTFE gefertigte Halter wurde in einer zylindrischen Grundform entworfen und wies an beiden Enden jeweils ein identisches Außengewinde auf. Eines dieser beiden Gewinde war durch eine Auswölbung begrenzt und zum Einschrauben in den Zylinderdeckel vorgesehen. Der gesamte Halter wies in Längsrichtung eine durchgehende Bohrung auf, die auf den Durchmesser der verwendeten Bezugselektrode abgestimmt war. Weiterhin wurde im Bereich des zweiten Außengewindes eine Bohrung gesetzt, die das Einfügen einer Schraubdeckeldichtung ermöglichte. Diese Dichtung war der Bezugselektrode angepasst und sollte die zuvor schon beschriebene Problematik der Abdichtung des Zellinneren gegenüber der Umgebung lösen. Nach dem Einbau und der Positionierung der Bezugselektrode, wurde diese abschließend über einen passenden Schraubdeckel mit dem Halter verspannt.

Darauffolgend konnten nun die neu entwickelten Komponenten zusammen mit den schon in Abschnitt 1.1.1 beschriebenen Schraubadaptern in den Zylinderdeckel eingefügt werden (Abb. 29).

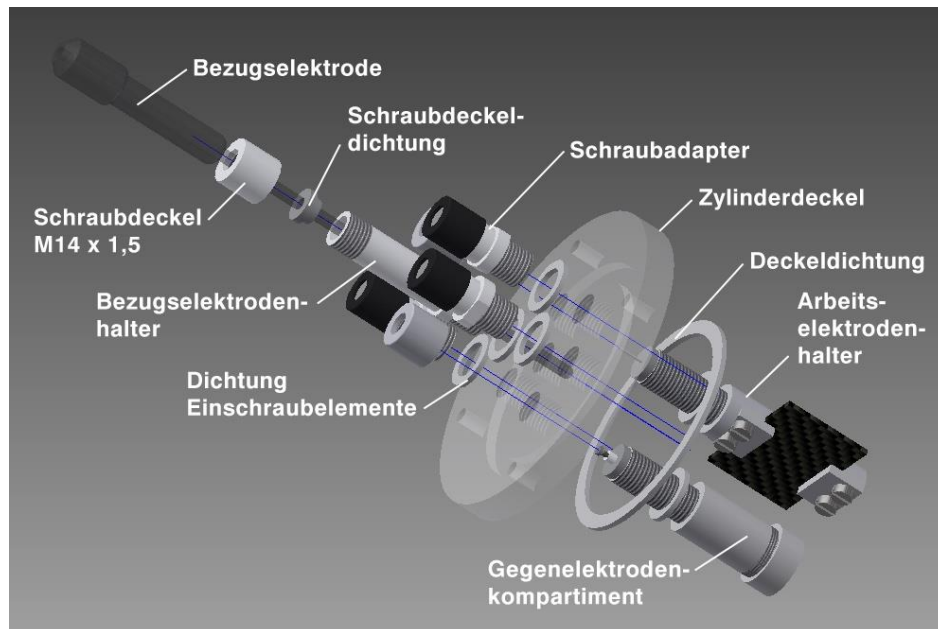


Abb. 29: Explosionsdarstellung des Zylinderdeckels mit allen Komponenten. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Zylinderdeckels.

Der Deckel wurde bezüglich seiner Abmessungen angepasst und wiederum aus 12 mm starkem PC gefertigt. Weiterhin wurde dieser erneut mit einer 4 mm tiefen, zum Glaszylinder passenden, umlaufenden Nut versehen, welche der Aufnahme einer passenden

Deckeldichtung aus Silikon diene. Durch den geringeren Durchmesser wies der innere Nutkreis in dieser Version nur sechs Gewindebohrungen für einschraubbare Elemente auf. Für die Verspannung des Deckels waren erneut vier Bohrungen außerhalb des Nutkreises vorgesehen.

Der Arbeitselektrodenhalter und das Gegenelektrodenkompartiment wurden von der Unterseite des Deckels her, wie in Abbildung 29 gezeigt, eingeschraubt und im Anschluss jeweils mit einem passenden Schraubdeckel versehen. Der Bezugselektrodenhalter und die drei Schraubadapter wurden von der Oberseite her in den Deckel eingebracht. Die Adapter wurden dabei jeweils mit auf die Anwendung abgestimmten Schraubdeckeldichtungen und passenden Schraubdeckeln versehen. Um die Dichtigkeit des Deckels zu verbessern, wurde jedes dieser Elemente vor dem Einschrauben noch mit einer passenden Silikonflachdichtung versehen. Somit waren, wie auch schon bei der ersten Version der M3C, alle für eine Messung benötigten Elemente im Deckel integriert. Der mit den gewünschten Elementen versehene Deckel sollte abschließend mit dem Glaszylinder verspannt werden (Abb. 30a).

Dafür wurde eine Bodenplatte aus 12 mm PC mit der Grundform des kleineren Deckels entworfen. Diese wies statt der Nut eine durchgehende Vertiefung auf, in welche eine Silikondichtung eingelegt werden konnte.

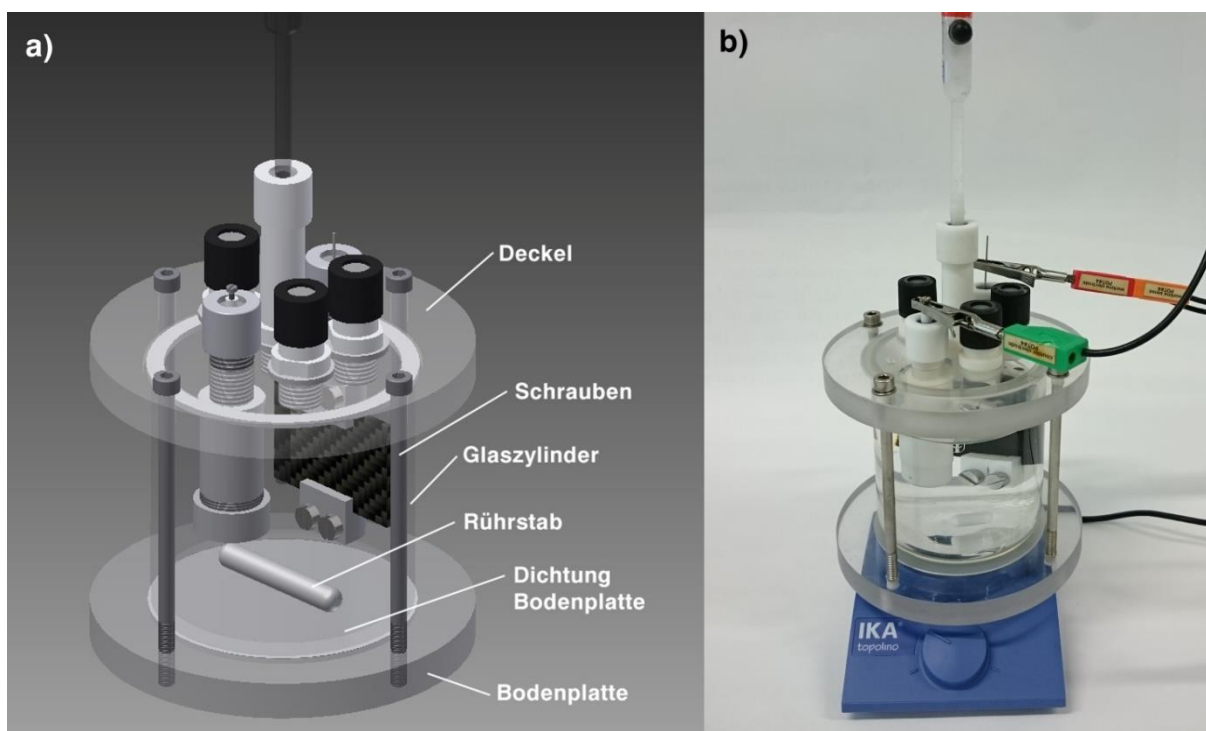


Abb. 30: Zusammengesetzte 280 ml M3C (Version B). a) Das CAD-Modell zeigt den Aufbau der komplettierten Zelle. b) Die Fotografie zeigt die fertiggestellte Zelle.

Weiterhin war die Bodenplatte mit vier Gewindebohrungen außerhalb der Vertiefung versehen, in welche Schrauben eingebracht werden konnten. Diese sollten für die Verspannung des Deckels mit dem Zylinderglas dienen. Für eine aktive Durchmischung des Zylinders konnte auch in diesem Fall ein Magnetrührstab optional hinzugefügt werden. In Abbildung 11b ist die komplette, anhand der zuvor beschriebenen Entwürfen gefertigte, Zelle dargestellt. Diese M3C wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Abschnitt 3.2 für die elektrochemische Charakterisierung verschiedener *R. sphaeroides*-Stämme verwendet. Darüber hinaus fand sie auch in weiteren Arbeiten Verwendung (Prokhorova *et al.*, 2016, in revision; Bursac, 2015).

1.2 Entwicklung eines BES für die Abwasserbehandlung

Das Ziel bei der Entwicklung eines BES für die Abwasserbehandlung war, möglichst viele Probleme bisheriger, in diesem Bereich angesiedelter Systeme zu lösen oder zumindest zu verringern. Dabei stand vor allem eine möglichst lange Behandlungstrecke des Abwassers im Verhältnis zu den Gesamtabmessungen im Mittelpunkt. Aus diesem Grund wurde schon im ersten Entwurf dieses BES, welches in Zusammenarbeit mit Tina Klessing und Dr. Katrin Sturm-Richter entwickelt wurde, eine mäanderförmige Führung des Abwassers durch den Aufbau gewählt (Klessing, 2015). Da diese erste Version jedoch zahlreiche konzeptionelle wie konstruktive Probleme aufwies, wurde das im Folgenden beschriebene BES von Grund auf neu konstruiert und dessen Konzeption in zahlreichen Bereichen modifiziert.

Im ersten Schritt wurde zunächst der Grundkörper konstruiert welcher sich aus einer Bodenplatte und vier Seitenteilen aus PMMA zusammensetzte (Abb. 31). Die Bodenplatte war mit verschiedenen Vertiefungen versehen, die das Einbringen weiterer konstruktiver Elemente, wie beispielsweise der mäanderförmigen Trennwand oder der verschiedenen Elektrodenhalter, ermöglichten. Im vorderen und hinteren Seitenteil waren T-förmige Nuten vorgesehen die das Einschleiben spezieller Elektrodenhalter ermöglichten. Das linke und rechte Seitenteil war jeweils mit durchgehenden Gewindebohrungen versehen, die dem Einschrauben verschiedener Elemente dienten. Auf deren genaue Funktion wird in einem der folgenden Absätze eingegangen. Weiterhin wiesen alle Seitenteile im oberen Bereich Gewindebohrungen auf, die mit Kunststoffschrauben versehen werden konnten.

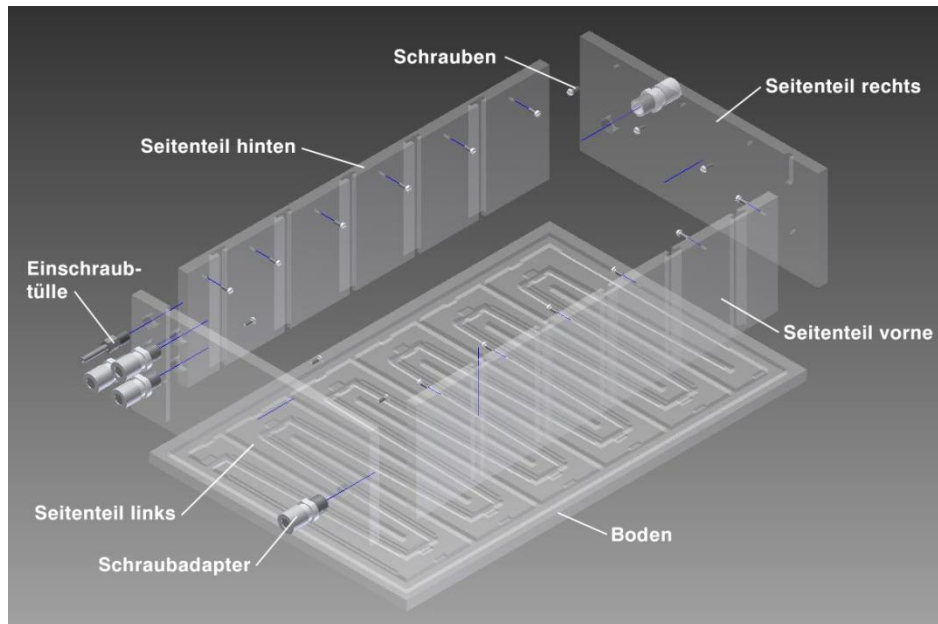


Abb. 31: Explosionsdarstellung des Grundkörpers des BES für die Abwasserbehandlung. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Grundkörpers.

Diese dienten in einem späteren Schritt der Fixierung der Elektroden an den Seitenwänden des Aufbaus. In den Grundkörper wurde im nächsten Schritt die schon erwähnte mäanderförmige Trennwand in den Boden eingefügt. Diese Struktur trennte das Anoden- und das Kathodenkompartiment voneinander und wurde aus sechs verschiedenen Elementen (Bauteile A-F) zusammengesetzt, welche ebenfalls aus PMMA gefertigt waren.

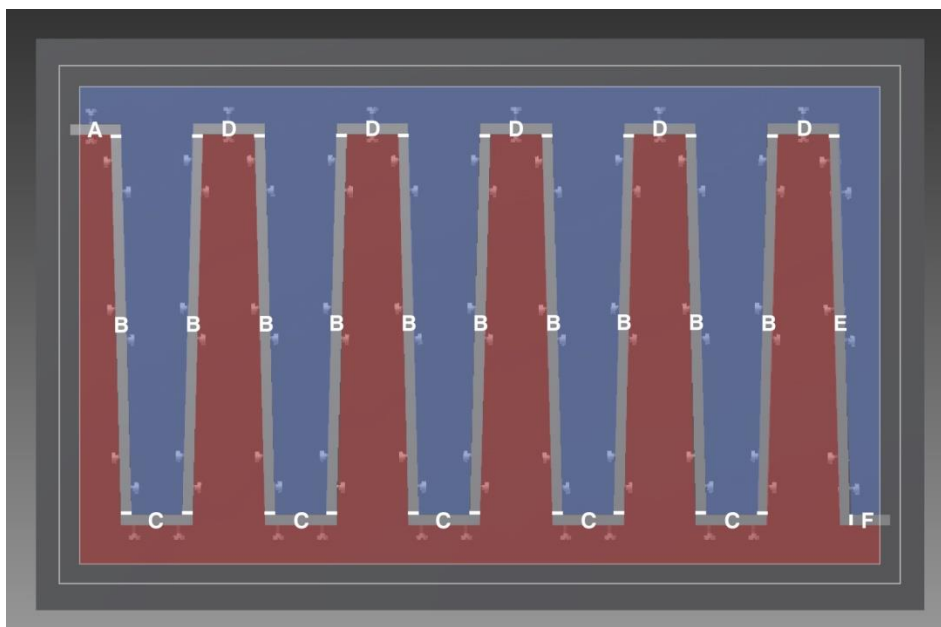


Abb. 32: Schema des Aufbaus der mäanderförmigen Trennwand. Das CAD-Modell zeigt die Anordnung und Positionierung der einzelnen Mäanderkomponenten (Bauteile A-F) auf der Bodenplatte des Grundkörpers. Der rote Bereich kennzeichnet das Anoden-, der blaue Bereich das Kathodenkompartiment.

Deren Anordnung und die Abgrenzung der beiden Kompartimente (Anode = rot; Kathode = blau) ist in Abbildung 32 dargestellt. Auch die Trennwandstruktur wurde im oberen Bereich mit Gewindebohrungen versehen, um dort Kunststoffschrauben einsetzen zu können. Diese dienen zum einen der Fixierung der Elektrodenhalter (Bauteile B + E) sowie der Elektrodenspanner (Bauteile A + D) an der Trennwand und zum anderen der Verspannung der Separatoren (Bauteil C).

Nachdem der Einbau der Trennwand in den Grundkörper erfolgt war, sollte im nächsten Schritt das Elektrodenmaterial eingesetzt werden. Wie schon zuvor beschrieben, wurde auch in diesem Fall ein Kohlenstoffvlies (Sigracell GFD 2,5, SGL Carbon) verwendet. Da der Bauraum für das Einsetzen der Elektroden sehr beengt war, musste eine Lösung für einen abschnittsweisen Einbau einzelner Elektrodensegmente entwickelt werden. Zu diesem Zweck wurde ein spezieller Elektrodenhalter aus PMMA entworfen, an welchem das passend zugeschnittene Elektrodensegment an Haltestegen mittels Gummispannern befestigt wurde (Abb. 33). Anschließend konnte der Elektrodenhalter mithilfe von Einhängeöffnungen an der Trennwand fixiert werden.

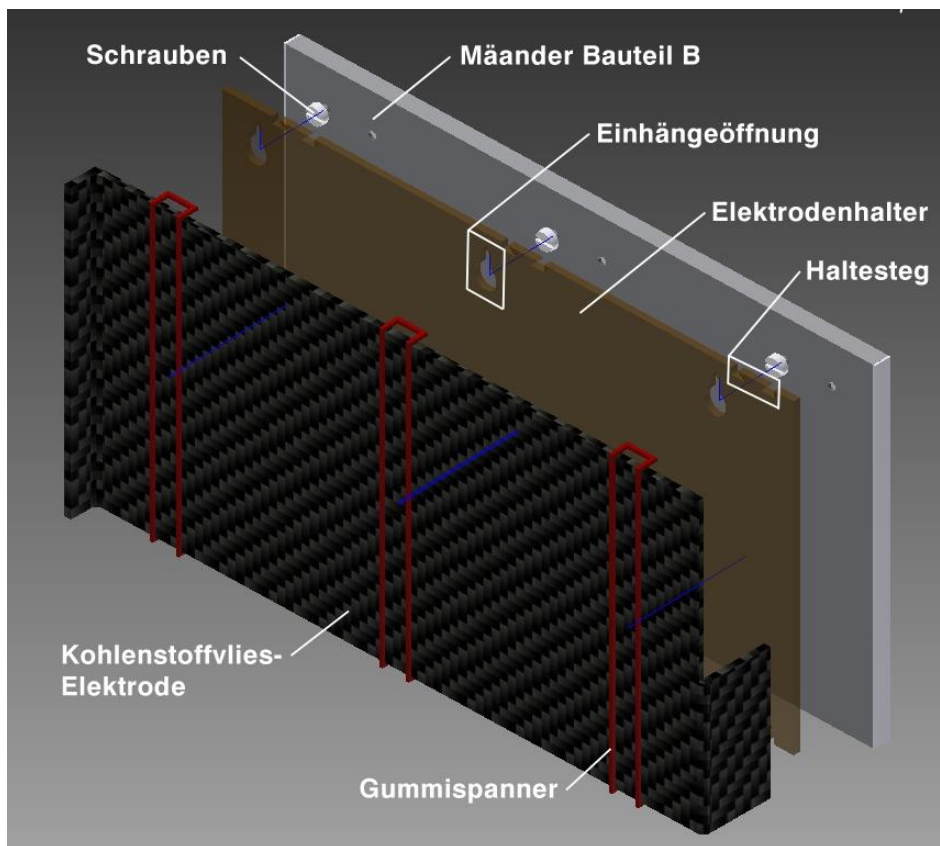


Abb. 33: Explosionsdarstellung des Elektrodenhalters. Das CAD-Modell zeigt das Grundprinzip der Befestigung der Kohlenstoffvlies-Elektrode am Elektrodenhalter und der Trennwand.

Hierbei wurde die untere Kante des Halters zunächst an den Rand einer dafür vorgesehenen Nut im Boden gesetzt. Die Einhängeöffnung wurde darauffolgend im weiter geöffneten Bereich über die Schrauben geschoben und der gesamte Elektrodenhalter nach unten in die Nut bewegt. Weiterhin war es wichtig die über den Halter hinausragenden Teile der Elektrodensegmente entlang der Mäanderstruktur zu führen und zu fixieren. Zu diesem Zweck wurden zwei Arten von Elektrodenspannern aus PMMA entwickelt, deren Funktion in Abbildung 34 anhand einer einzelnen Mäanderschleife dargestellt ist.

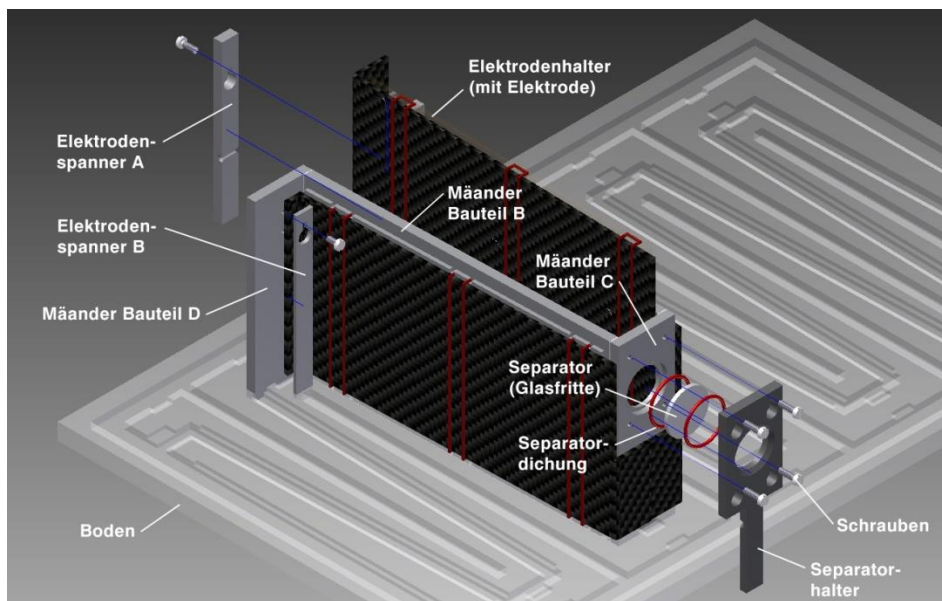


Abb. 34: Explosionsdarstellung des Aufbaus einer einzelnen Mäanderschleife. Das CAD-Modell zeigt exemplarisch, wie die Elektrodenhalter und die Elektroden an der Grundstruktur einer Mäanderschleife fixiert wurden. Weiterhin ist der Aufbau der Separatorstruktur dargestellt.

Auf der Innenseite der Schleife wurde zunächst der überhängende Teil der Elektrode um die Außenecke von Bauteil D geführt und anschließend mit dem Elektrodenspanner A fixiert. Dieser verfügte, wie der Elektrodenhalter, über eine Einhängeöffnung und wurde nach dem gleichen Prinzip mittels einer Schraube sowie einer Nut im Boden an der Trennwand befestigt. Weiterhin wurde die zur Elektrode hin orientierte Seite des Spanners mit einem runden Schlitz versehen, welcher der Aufnahme eines Edelstahlstabes diente. Dieser Stab wurde durch die Anordnung des Elektrodenspanners an das Elektrodenmaterial gepresst und konnte so als Stromsammelner fungieren.

Im nächsten Schritt wurden auf der Außenseite der Mäanderschleife die überhängenden Bereiche der Elektrode ebenfalls um die Ecken der Trennwand geführt. Dabei diente der Elektrodenspanner B zur Fixierung der Elektrode im Bereich des Bauteils D. Die Befestigung erfolgte dabei wiederum nach dem Prinzip des Elektrodenspanners A über eine

Einhängeöffnung. Die Befestigung des überstehenden Elektrodenbereiches am Bauteil C erfolgte über den Separatorhalter. Dieser wurde ebenfalls aus PMMA gefertigt und verfügte über zwei weitere Funktionen: Die erste war die Verspannung einer feinporigen Glasfrittenscheibe in der Trennwand. Diese sollte als Separator zwischen Anoden- und Kathodenkompartiment dienen und den Ladungstransport verbessern. Dabei wurde die Separatorscheibe mit zwei Dichtungen in eine passende Öffnung im Bauteil C der Trennwand eingefügt und mittels des Separatorhalters fixiert. Als weitere Funktion verfügte der Halter im schmalen, unteren Bereich wie der Elektrodenspanner A über einen runden, zur Elektrode hin orientierten Schlitz. Dieser diente der Aufnahme eines Stromsammlers. Die Befestigung des Separatorhalters an der Trennwand erfolgte erneut über vier Einhängeöffnungen und eine Nut im Boden des Aufbaus. Nach diesem Prinzip wurden alle Elektroden wie auch Separatorscheiben an der gesamten Trennwand sowie an der linken und der rechten Seitenwand des Aufbaus installiert.

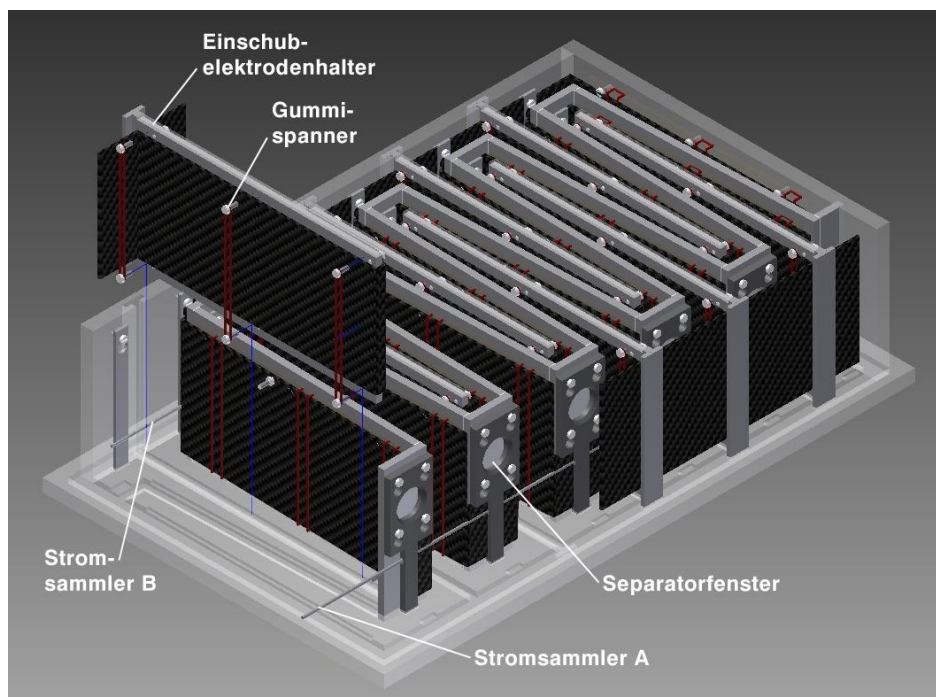


Abb. 35: Partielle Explosionsdarstellung des Grundkörpers mit eingebauten Elektroden.

Das CAD-Modell zeigt den Grundkörper nach der Anbringung der Elektrodenhalter an der mäanderförmigen Trennwand. Weiterhin sind auch die eingebauten Einschubelektrodenhalter, welche ebenfalls mit Elektrodenmaterial bespannt waren, und das Prinzip ihrer Installation dargestellt. Mittels zweier Stromsammler wurden alle Elektrodenabschnitte des Anoden- bzw. des Kathodenbereiches elektrisch kontaktiert. Weiterhin sind die zusammengesetzten, fünf Separatorfenster dargestellt.

Der nächste wichtige Schritt war zum einen die Elektrodenfläche und zum anderen die Behandlungsstrecke des Abwassers weiter zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden in die einzelnen Mäanderschleifen spezielle, aus PMMA gefertigte Einschubelektrodenhalter eingefügt (Abb. 35). Diese Halter bestanden aus zwei Elementen und wiesen eine T-förmige Grundform auf. Im oberen und unteren Bereich wurden sie mit zwölf Gewindebohrungen versehen die das Einfügen von Kunststoffschrauben ermöglichten. Dadurch war es möglich passend zugeschnittene Elektroden mithilfe von sechs Gummispannern von beiden Seiten an den Haltern zu fixieren. Weiterhin verfügten sie über eine weitere Bohrung, die das Durchführen des Stromsammlers durch den Halter ermöglichte und so für die elektrische Kontaktierung der Elektrodensegmente sorgte.

Der Einbau in den Grundkörper erfolgte mithilfe der schon oben erwähnten T-förmigen Nuten des vorderen und hinteren Seitenteils. Diese führten und positionierten die Einschubelektrodenhalter passgenau in die im Boden vorgesehenen, mit einer Silikondichtung bestückten Nuten. Weiterhin wies auch die Oberseite der Halter eine aufgeklebte Silikondichtung auf. Diese beiden Dichtungen sollten nach dem Aufsetzen des Deckels die links und rechts des Halters entstandenen Kanäle gegeneinander abdichten und somit die Verlängerung der Strömungsstrecke gewährleisten. Die überstehenden Bereiche, die an die Halter fixierten Elektrodensegmente, wurden beim Einschieben nach außen gebogen und wie schon zuvor beschrieben mithilfe des Elektrodenspanners B an der vorderen und hinteren Seitenwand befestigt. Weiterhin sind in Abbildung 35 alle fünf Separatorfenster dargestellt. Nachdem alle Elektrodensegmente eingebaut waren, erfolgte das Einsetzen der beiden Stromsammler. Durch die Anordnung der Separatorhalter bzw. der Elektrodenspanner (Typ A) und der Einschubelektrodenhalter wurde erreicht, dass jeder der beiden Edelstahlstäbe nur die dem jeweiligen Kompartiment zugeordneten Elektrodensegmente kontaktierte (Stromsammler A → alle Elektrodensegmente im Anodenkompartiment; Stromsammler B → alle Elektrodensegmente im Kathodenkompartiment). Dadurch konnte der Anschluss aller Anoden- und Kathodensegmente über jeweils einen einzelnen Kontakt erfolgen.

Der Deckel des Aufbaus wurde ebenfalls aus PMMA gefertigt und ist in Abbildung 36 dargestellt. Dieser verfügte an der Unterseite über eine durchgängige Nut, die das Profil der Seitenwände und der mäanderförmigen Trennwand des Grundkörpers aufnahm. In diese Nut wurde eine passende Deckeldichtung aus Silikon eingefügt, die zum einen den Aufbau gegenüber der Umgebung und zum anderen die beiden Kompartimente gegeneinander abdichten sollte.

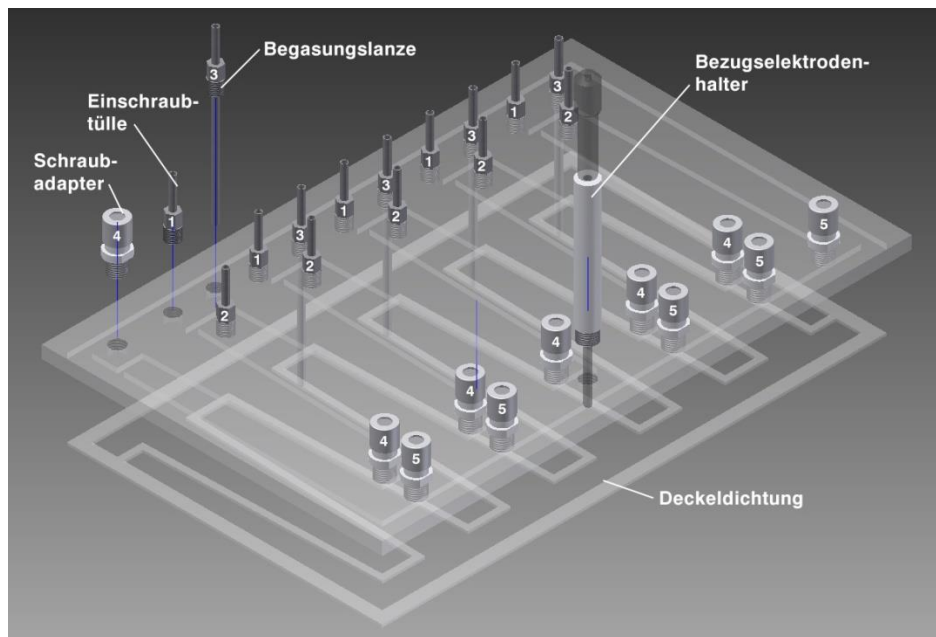


Abb. 36: Explosionsdarstellung des Deckels. Das CAD-Modell zeigt den Aufbau und die Abhängigkeiten der einzelnen Bauelemente des Deckels. Die Funktionen der einzelnen Anschlüsse sind wie folgt gekennzeichnet: 1) Druckentlastung Kathodenkompartiment; 2) Druckentlastung Anodenkompartiment; 3) Begasung Kathodenkompartiment; 4) Beprobung Kathodenkompartiment; 5) Beprobung Anodenkompartiment.

Weiterhin wurden zahlreiche Gewindebohrungen eingefügt, die mit verschiedenen Anschlüssen versehen wurden. Die Konfiguration dieser Anschlüsse war dabei für jedes Mäandersegment identisch und hatte folgende Funktionen:

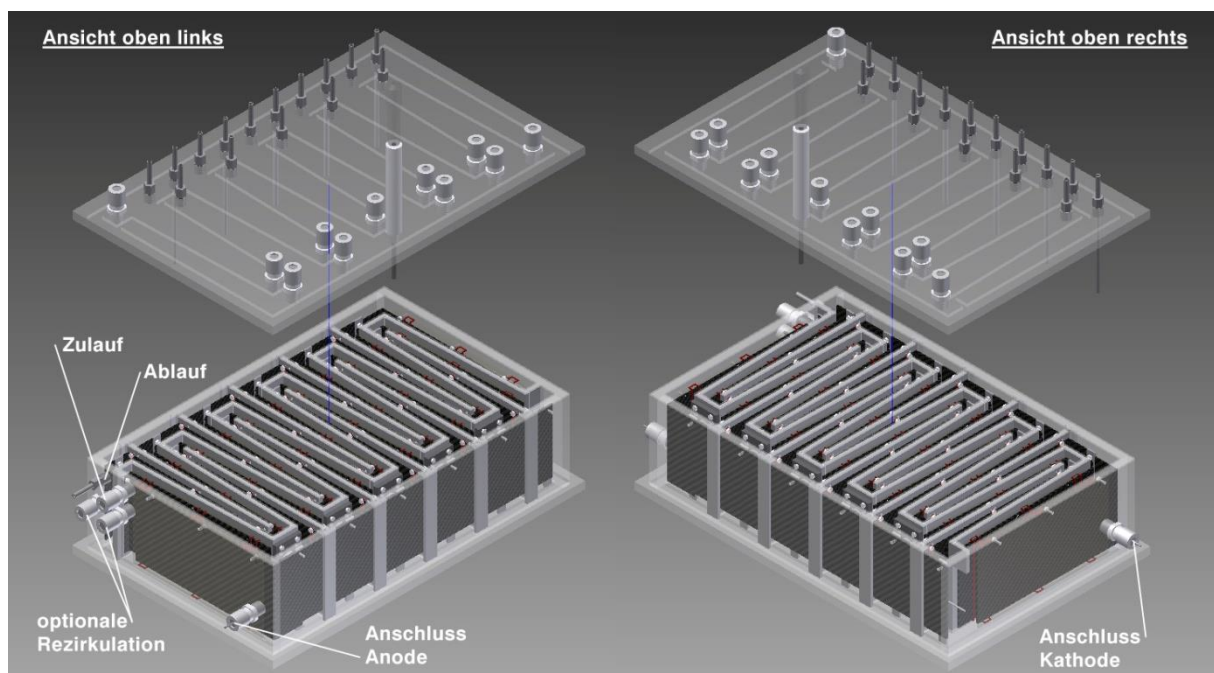


Abb. 37: Darstellung des kompletten BES für die Abwasserbehandlung. Das CAD-Modell zeigt den komplett zusammengesetzten Grundkörper mit abgehobenen Deckel aus zwei Perspektiven.

Die Anschlüsse 1, 3 und 4 waren jeweils dem Kathodenkompartiment zugordnet. Sie sorgten für die Versorgung dieses Kompartiments mit Druckluft über Begasungslanzen (Anschluss 3) und für die Entlastung des, durch zugeführte oder freigesetzte Gase, entstandenen Überdrucks (Anschluss 1). Weiterhin dienten Schraubadapter (Anschluss 4) der Beprobung an verschiedenen Stellen des Kompartiments. Die Anschlüsse 2 und 5 waren jeweils dem Anodenkompartiment zugeordnet. Diese dienten ebenfalls der Druckentlastung bzw. der Beprobung.

In Abbildung 37 ist der gesamte Aufbau mit komplettem Grundkörper und Deckel dargestellt. Die linke Ansicht zeigt die Anschlüsse für den Zu- und den Ablauf sowie zwei weitere Schraubadapter für eine optionale Installation einer Rezirkulation. Weiterhin ist der Anodenanschluss gezeigt, bei dem der Stromsampler durch eine angepasste Schraubdeckeldichtung nach außen geführt wurde. Dies wurde in gleicher Weise am Kathodenanschluss durchgeführt (Ansicht oben rechts). Eine Fotografie des gesamten Aufbaus ohne eingebaute Elektroden ist in Abbildung 38 dargestellt. Das Verspannen des Deckels mit dem Grundkörper erfolgte über einen externen Rahmen aus Aluminiumprofilen, welcher von der Feinmechanischen Werkstatt des Instituts für physikalische Chemie (Leitung Dieter Waltz, KIT, Karlsruhe) entworfen und gefertigt wurde.

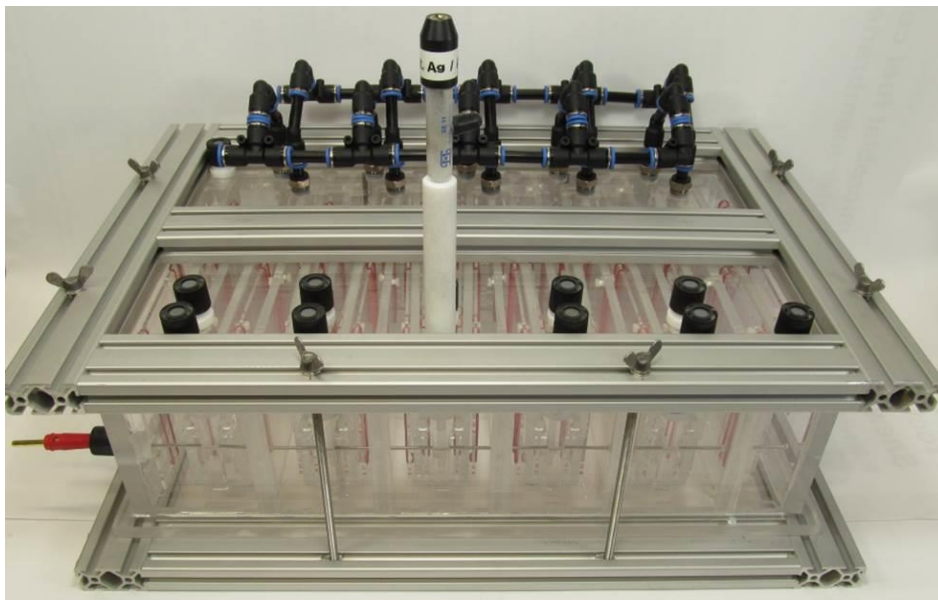


Abb. 38: Darstellung des gesamten Aufbaus. Die Fotografie zeigt den über einen externen Aluprofilrahmen verspannten Gesamtaufbau. Zur Veranschaulichung der Struktur wurde dieser ohne eingebaute Elektroden dargestellt. Die Kunststoffsteckverbindungen dienten der Verbindung der einzelnen Anschlüsse der Druckentlastung (Anoden- bzw. Kathodenkompartiment).

Weiterhin ist auch die Verbindung der Druckentlastungsanschlüsse des Anoden- und Kathodenkompartiments über verschiedene Kunststoffsteckverbindungen dargestellt. Die Regulierung der Druckluftmenge, die durch die Begasungslanzen in das Kathodenkompartiment geleitet wurde, wurde über einzelne Regler mit Rückschlagventil gesteuert.

Eines der Hauptziele bei der Entwicklung dieses BES war die Schaffung einer langen Abwasserbehandlungsstrecke bei gleichzeitig kleinen Außenmaßen. Die erreichte mittlere Strecke, die in der geometrischen Mitte der Kanäle entlang der Flussrichtung bestimmt wurde, betrug hierbei 4,810 m bei einer Grundfläche von nur 0,113 m². Weiterhin konnte eine errechnete, geometrische Fläche des verwendeten Elektrodenmaterials von 0,431 m² (Anode) bzw. 0,439 m² (Kathode) erreicht werden. Das gemessene Gesamtvolumen des kompletten, mit Elektroden bestückten Aufbaus betrug 4,450 l, wobei das errechnete Volumen des Anodenkompartiments ohne Elektroden bei 2,781 l und das des Kathodenkompartiments ohne Elektroden bei 2,837 l lag. Somit lag die Verdrängung des gesamten Elektrodenmaterials bei einem Volumen von 1,168 l. Das fertiggestellte BES wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit zunächst unter Laborbedingungen und im Anschluss auch in einem Klärwerk in Betrieb genommen und charakterisiert. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Kapitel III, Abschnitt 2 dargestellt.

2 Charakterisierung des entwickelten BES für die Abwasserbehandlung

Die konventionelle Abwasserbehandlung ist in den Industrieländern eine seit vielen Jahrzehnten etablierten Technologie, die sich laufend weiterentwickelt. Dennoch ist deren Energiebilanz trotz des Einsatzes vieler Innovationen, wie z.B. der Erzeugung und Nutzung von Biogas, nach wie vor negativ (Fricke, 2009). Einen vielversprechenden Ansatz für die weitere Verbesserung der Energiebilanz von Kläranlagen bietet der Einsatz von BES, welche in der Lage sind, die im Abwasser enthaltene chemische in elektrische Energie zu konvertieren und diese direkt (MFC), zur Entsalzung von Meerwasser oder zur Herstellung anderer Energieträger (MEC) nutzbar zu machen. Zahlreiche Arbeiten, vor allem im Bereich der MFCs, wurden in diesem Themengebiet in der letzten eineinhalb Dekaden veröffentlicht (> 380 Artikel, /www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Dabei wurden eine große Zahl an technischen Ausführungen beschrieben und verschiedene Aspekte, wie der CSB- und der

Stickstoffabbau, betrachtet. In diesem Zusammenhang wurde auch auf die Probleme der verschiedenen Konzepte, wie z.B. der Faulung von Separatoren, eingegangen (Xu *et al.*, 2012).

Ein Ziel dieser Arbeit war, durch den in Abschnitt 1.2 entworfenen Aufbau zur Lösung einiger dieser Probleme beizutragen. In Folgendem soll zunächst die ersten Ergebnisse nach der Inbetriebnahme im Labor und anschließend auf den späteren Betrieb unter realen Bedingungen im Technikum des EMG-Klärwerks Emschermündung (Dinslaken) eingegangen werden.

2.1 Charakterisierung der ersten Betriebsphase mit synthetischem Abwasser

Für die erste Betriebsphase des BES wurde als Substrat das in Kapitel II Abschnitt 3.1.2 beschriebene synthetische Abwasser verwendet. Die Inbetriebnahme erfolgte wie in Kapitel II Abschnitt 13.1.1 beschrieben. Die hierbei verwendeten Bakterienstämme wurden zum größten Teil von Stefanie Epple zur Verfügung gestellt und zuvor aus dem Überlauf des Vorklärbeckens des Klärwerks Emschermündung isoliert. In diesem Zusammenhang wurden Selektionsbedingungen gewählt, die eine Isolierung potentiell exoelektrogener Organismen begünstigte. Weiterhin wurde das BES in dieser ersten Phase als M3C betrieben. Dabei diente die Anode als Arbeitselektrode (Kathode = Gegenelektrode), welche mit einem festen Potential gegenüber der Bezugslektrode betrieben wurde. Dies sollte dazu dienen, in der ersten Versuchsphase optimale elektrochemische Bedingungen für die exoelektrogenen Organismen zu schaffen und somit einen stabilen Prozess zu etablieren. Weiterhin erfolgte vier Tage nach dem Start des Experiments die erste Beprobung an drei Punkten des Reaktors (Zulauf, nach dem Anoden- und nach dem Kathodenbereich), wobei der TOC-, der TN- und der pH-Wert in der Folge jeweils alle ein bis drei Versuchstage gemessen wurden. Dabei unterlagen die einzelnen Werte der Messung z.T. starken Schwankungen, was eine Interpretation dieser Daten erschwerte. Um die Trends der Einzelwerte besser darstellen zu können wurde daher bei jeder Datenreihe, wie in Kapitel II Abschnitt 13.1.1 beschrieben, eine Glättung dieser Werte durchgeführt (siehe durchgehende Linien). Weiterhin wurde die Stromdichte über den gesamten Versuchszeitraum von 55 Tagen erfasst. Die zugehörigen Ergebnisse sind in den folgenden Absätzen dargestellt. Zunächst soll in diesem Zusammenhang auf den Verlauf der Stromdichte eingegangen werden (Abb. 39).

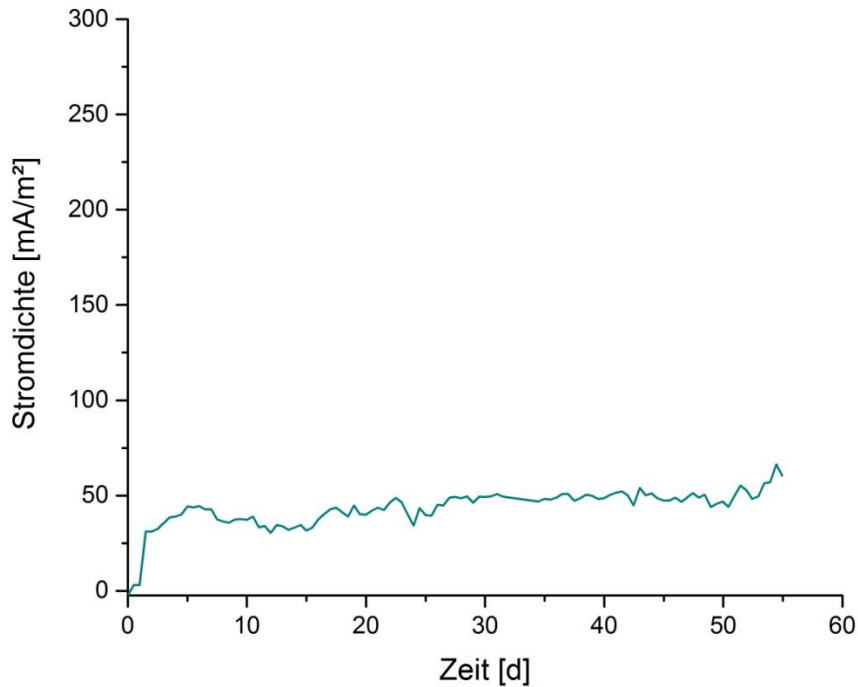


Abb. 39: Zeitlicher Verlauf der Stromdichte des Abwasser-BES (Versuchsphase I). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und mit synthetischem Abwasser betrieben.

Die gemessene Stromdichte steigt innerhalb der ersten eineinhalb Versuchstage sehr schnell auf einen Wert von 31,1 mA/m² an und verläuft im Anschluss leicht steigend bis zu einem Maximum von 69,38 mA/m² nach 54,85 d. Die Charakteristik des Verlaufs ist schwankend und erreicht zwischen den Versuchstagen fünf und 52 ein Niveau, das ungefähr dem Bereich der mittleren Stromdichte von 43,44 mA/m² entspricht ($\pm 13,75$ mA/m²). Folglich war die gemessene Stromdichte über einen weiten Zeitraum des Experiments verhältnismäßig stabil und zeigte sogar eine leicht steigende Tendenz.

Im nächsten Schritt sollte der Abbau des organischen Kohlenstoffs im entwickelten BES unter den zuvor genannten Bedingungen beschrieben werden. Hierbei wurde aufgrund der vorhandenen Analytik der TOC gemessen, wohingegen in der Abwasseranalytik eher der CSB als Messgröße für den vorhandenen organischen Kohlenstoff dient. Da in diesem Fall in erster Linie eine Aussage über die Abbauleistung des Systems gegenüber organischen Kohlenstoffverbindungen getroffen werden sollte, wurde die Darstellung der TOC-Werte als ausreichend erachtet. Auf deren Verlauf soll im Folgenden eingegangen werden (Abb. 40). Zunächst fällt auf, dass der TOC des Zulaufs in einem Bereich von 344,2 mg/l bis 422,6 mg/l über den gesamten Versuchszeitraum entgegen den Erwartungen stark schwankt.

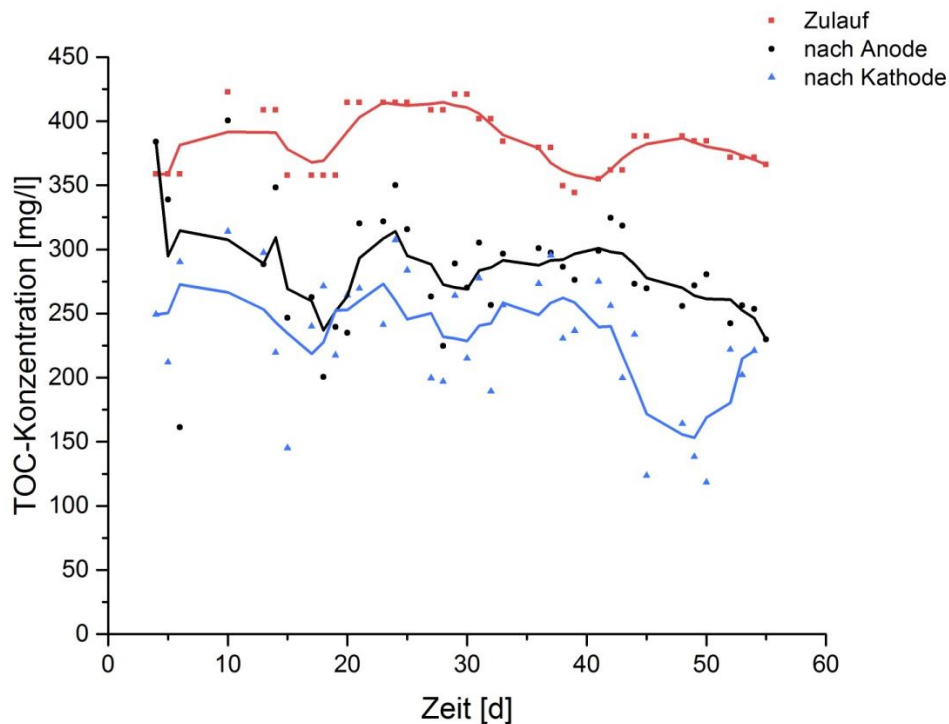


Abb. 40: Zeitlicher Verlauf der TOC-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase I). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und mit synthetischem Abwasser betrieben. Die Einzelwerte wurden zur besseren Veranschaulichung durch das Errechnen des gleitenden Durchschnitts geglättet (Linien).

Betrachtet man die TOC-Konzentration nach dem Anodenkompartiment, kann annähernd über den gesamten Zeitraum eine deutliche Abnahme dieser beobachtet werden. So lag die mittlere TOC-Eliminierung nach dem Anodenbereich bei 101,5 mg/l, was einer Abnahme von 26,4 % gegenüber der mittleren Zulaufkonzentration entspricht. Weiterhin zeigt die Verlaufskarakteristik der TOC-Konzentration nach der Anode große Ähnlichkeit zu jener des Zulaufs. Daher scheint die Eliminierungsleistung des Anodenkompartiments über annähernd den gesamten Versuchszeitraum konstant gewesen zu sein. Nach dem Kathodenkompartiment ist eine weitere Abnahme der TOC-Konzentration zu beobachten. Diese fällt jedoch mit einer mittleren TOC-Eliminierung von 50,3 mg/l (13,01 %) nur halb so hoch aus wie die nach dem Anodenbereich. Weiterhin ist auch hier über weite Teile des Versuchsablaufes eine annähernd konstante Eliminierungsleistung zu erkennen, wobei diese zwischen Tag 40 und 52 überproportional ansteigt.

Insgesamt konnte somit über den gesamten Versuchszeitraum eine mittlere TOC-Eliminierung von 151,8 mg/l erreicht werden, was einer Abnahme von 39,5 % gegenüber der mittleren Zulaufkonzentration entspricht. Eine Entfernung des gesamten, im synthetischen

Abwasser vorhandenen Kohlenstoffs erfolgte hierbei jedoch nicht (mittlere Restkonzentration = 232,8 mg/l).

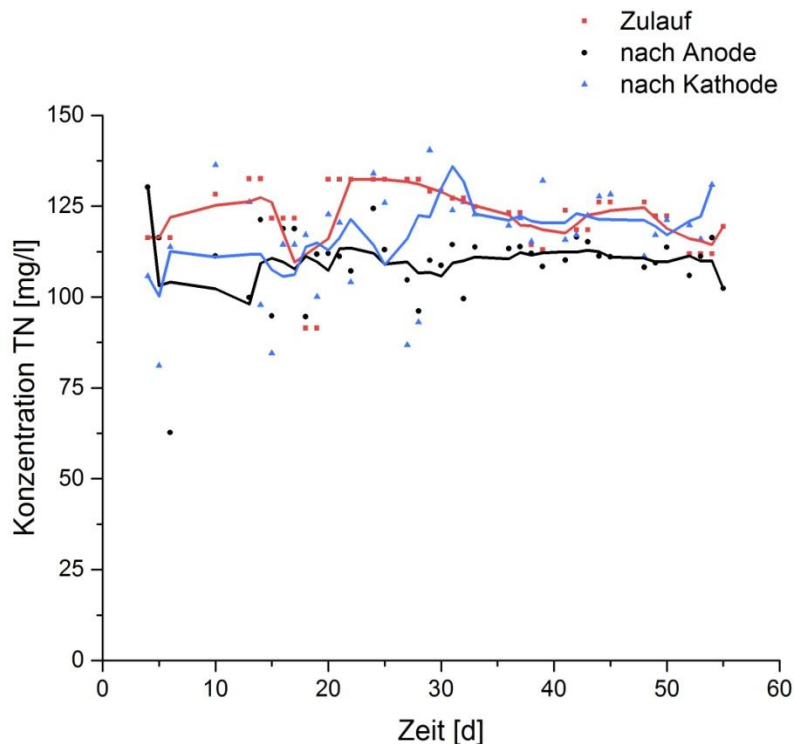


Abb. 41: Zeitlicher Verlauf der TN-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase I). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und mit synthetischem Abwasser betrieben. Die Einzelwerte wurden zur besseren Veranschaulichung durch das Errechnen des gleitenden Durchschnitts geglättet (Linien).

Im nächsten Schritt sollte der Abbau von Stickstoffverbindungen untersucht werden (Abb. 41). Wie schon bei der TOC-Messung zeigen die TN-Proben des Zulaufs mit Werten zwischen 111,9 und 132,6 mg/l erneut eine Fluktuation. Nach dem Anodenbereich kann eine geringe Abnahme der TN-Konzentration mit einer mittleren Eliminierung von 10,1 mg/l beobachtet werden. Diese scheint dabei im Bereich von 20 bis 50 Tagen annähernd konstant zu sein. Die TN-Konzentration nach dem Kathodenkompartiment hingegen widerspricht völlig den Erwartungen. So sind die Einzelwerte im Bereich von vier bis 30 Tagen extrem schwankend (81,1 bis 166,2 mg/l) und liegen somit teilweise deutlich über den Werten des Zulaufs. Auch im restlichen Versuchszeitraum sind die Werte auf oder oberhalb des Niveaus des Ausgangswertes. Somit kann festgehalten werden, dass eine geringe mittlere TN-Eliminierung zwar nach dem Anodenkompartiment beobachtet werden konnte (10,1 mg/l), diese jedoch nach dem Durchlaufen des Kathodenraumes nicht mehr nachweisbar war und mit 124,1 mg/l sogar um 2,8 mg/l über dem mittleren Ausgangswert lag.

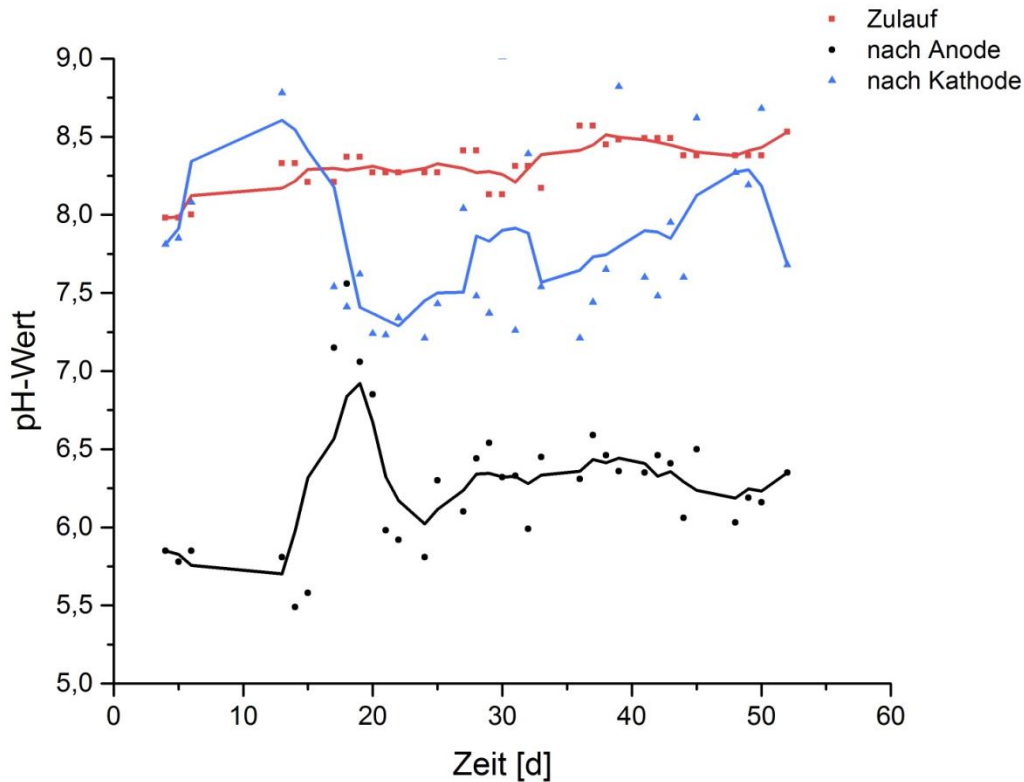


Abb. 42: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes des Abwasser-BES (Versuchsphase I). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und mit synthetischem Abwasser betrieben. Die Einzelwerte wurden zur besseren Veranschaulichung durch das Errechnen des gleitenden Durchschnitts geglättet (Linien).

Abschließend sollte noch der Verlauf des pH-Wertes überprüft werden (Abb. 42). Der Zulauf zeigt über den gesamten Versuchszeitraum leicht schwankende, aber weitgehend stabile Werte (7,98 bis 8,53). Die pH-Werte nach dem Anodenkompartiment sind hingegen, wie zu erwarten, deutlich niedriger und liegen in der ersten Versuchsphase (4-15 d) in einem Bereich von 5,49 bis 5,85. Nach einem kurzzeitigen Anstieg in den neutralen Bereich pendeln sich die Werte über den restlichen Versuchsverlauf zwischen 5,81 bis 6,5 ein. Die pH-Werte nach dem Kathodenbereich zeigen in der ersten Versuchsphase (4-15 d) Werte, die weitgehend auf dem Niveau des Zuflusses liegen (7,81 bis 9,19). Anschließend sinken die pH-Werte in einen mittleren Bereich um 7,52, wobei auch vereinzelt deutlich höhere Werte gemessen wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das entwickelte BES in der ersten Versuchsphase den Großteil der gestellten Anforderungen erfüllte. So konnte über den gesamten Versuchszeitraum eine annähernd konstante Stromdichte erreicht werden. Weiterhin konnten im selben Zeitraum etwa 40 % des, im synthetischen Abwasser enthaltenen TOCs, abgebaut werden. Auch der Verlauf des pH-Wertes verhielt sich weitgehend wie erwartet. Dies traf bei

der TN-Eliminierung nicht zu. Die Messwerte nach dem Durchlaufen des gesamten Systems lagen teilweise sogar höher als die im Zulauf. Daher war folglich keine Eliminierung von Stickstoffverbindungen in dieser Versuchsphase nachweisbar.

2.2 Charakterisierung der zweiten Betriebsphase mit kommunalem Abwasser

Nachdem die prinzipielle Funktionalität des entwickelten BES zumindest im Bereich der Stromproduktion und der Eliminierung von organischem Kohlenstoff unter Laborbedingungen gezeigt werden konnte, sollte im nächsten Schritt die Erprobung unter realitätsnahen Bedingungen erfolgen. In diesem Zusammenhang wurde der gesamte Aufbau mit allen Versorgungs- und Messapparaturen, wie in Kapitel II Abschnitt 13.1.2 beschrieben, im Technikum der EMG im Klärwerk Emschermündung reinstalled. Um den Aufbau schneller an die neue Umgebung zu adaptieren, wurde auch in diesem Fall der 3-Elektrodenmodus beibehalten. Nach dem Start des Experiments wurde erneut die Stromdichte, die TOC- und TN-Konzentration sowie der pH-Wert über einen Versuchszeitraum von 55 Tagen gemessen. In Abbildung 43 ist der Verlauf der Stromdichte dargestellt.

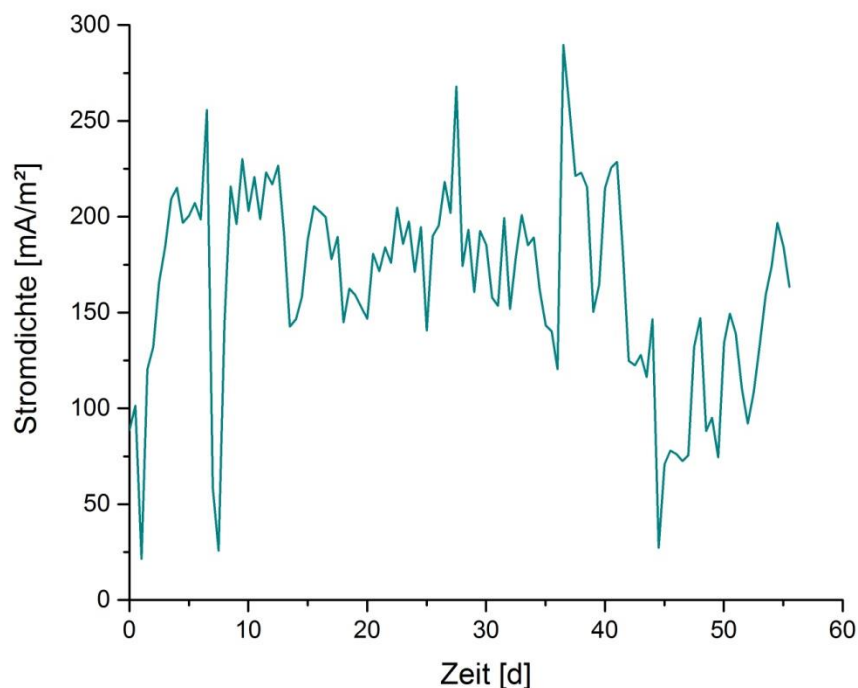


Abb. 43: Zeitlicher Verlauf der Stromdichte des Abwasser-BES (Versuchsphase II). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und mit Abwasser aus dem Überlauf des Vorklärbeckens betrieben.

Diese steigt innerhalb der ersten 12,4 Versuchstage auf einen Wert von 230,26 mA/m² an und verläuft im Anschluss bis Versuchstag 42 stark schwankend einem Bereich von durchschnittlich 185 mA/m². In diesem Zeitraum wird auch das Maximum von 294 mA/m² nach 36,53 d erreicht. Anschließend folgt bis zum Versuchsende ein Bereich in dem die Stromdichte auf einem niedrigeren durchschnittlichen Niveau liegt (112,68 mA/m²). Die mittlere Stromdichte über den gesamten Versuchszeitraum beträgt 165,09 mA/m². Somit kann festgehalten werden, dass die Stromdichte in der zweiten Versuchsphase deutlich gesteigert werden konnte.

Im nächsten Schritt sollte wiederum der Abbau des organischen Kohlenstoffs unter den veränderten Rahmenbedingungen beschrieben werden (Abb. 44).

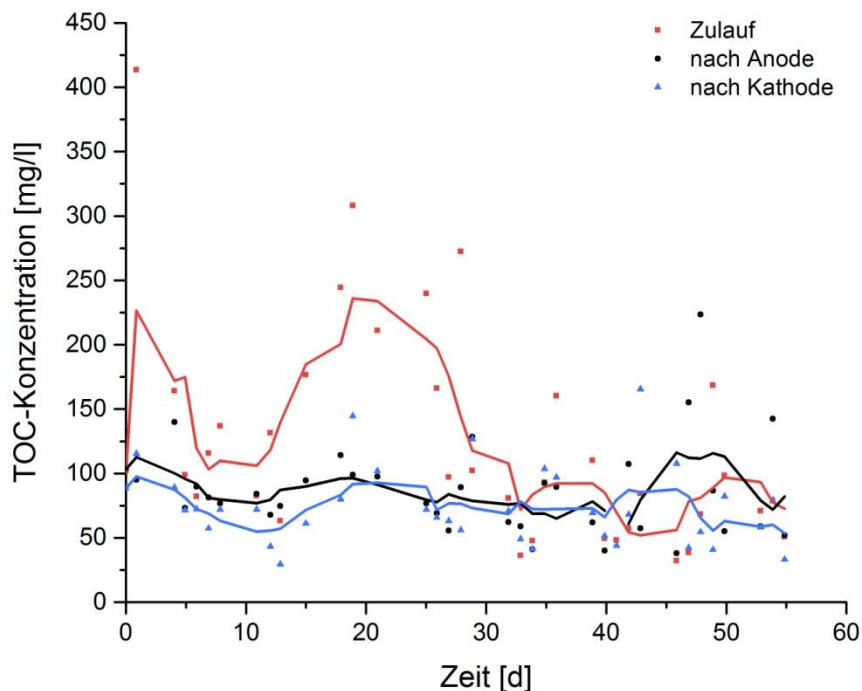


Abb. 44: Zeitlicher Verlauf der TOC-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase II). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und mit Abwasser aus dem Überlauf des Vorklärbeckens betrieben. Die Einzelwerte wurden zur besseren Veranschaulichung durch das Errechnen des gleitenden Durchschnitts geglättet (Linien).

Der TOC-Gehalt des Zulaufs zeigt über den gesamten Versuchszeitraum starke Schwankungen, wobei dieser in den ersten zwei Dritteln durchschnittlich höher liegt (149,5 mg/l; 0-39 d), als im letzten Drittel des Versuches (71,8 mg/l; 40-55 d). Der mittlere TOC-Gehalt des Zuflusses liegt bei 123,8 mg/l. Der Verlauf der TOC-Konzentration nach dem Anodenkompartiment ist über den gesamten Versuch recht konstant und beträgt

durchschnittlich 87 mg/l. Betrachtet man jedoch die TOC-Eliminierung dieses Kompartiments, so fällt diese in der ersten Hälfte mit durchschnittlich 71,1 mg/l (0-32 d) deutlich höher aus, als im zweiten Abschnitt (7,4 mg/l; 33-55 d). So kommt diese im zweiten Teil sogar zeitweise komplett zum Erliegen. Die mittlere TOC-Eliminierung im Anodenkompartiment über den gesamten Versuchsverlauf betrug 36,8 mg/l, was einer Abnahme um 30 % gegenüber der mittleren Zulaufkonzentration entspricht. Der Verlauf der TOC-Konzentration des Kathodenkompartiments zeigt ebenfalls einen konstanten Verlauf und beträgt durchschnittlich 74 mg/l. Die mittlere TOC-Eliminierung gegenüber dem Anodenkompartiment beträgt über den gesamten Versuchsverlauf 12,7 mg/l (10,3 %). Somit kann festgehalten werden, dass die mittlere TOC-Eliminierung des gesamten Systems von 49,8 mg/l zu rund drei Vierteln dem Anoden- und einem Viertel dem Kathodenkompartiment zuzuschreiben ist. Weiterhin war die Eliminierungsleistung über den gesamten Versuch stark schwankend, wobei der zugeführte TOC-Gehalt des Substrates auch in diesem Fall nicht vollständig abgebaut werden konnte.

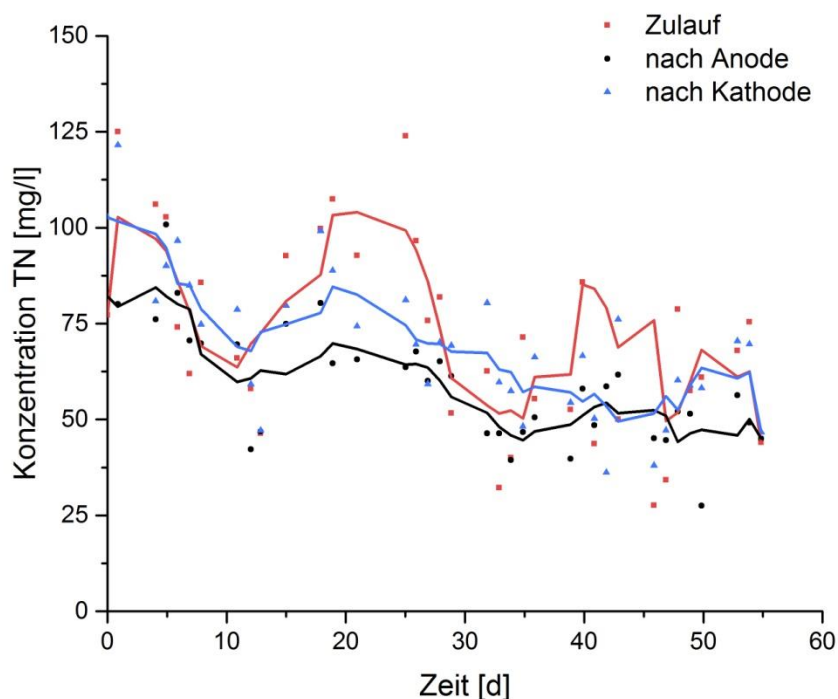


Abb. 45: Zeitlicher Verlauf der TN-Konzentration des Abwasser-BES (Versuchsphase II). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und Abwasser aus dem Überlauf des Vorklärbeckens betrieben. Die Einzelwerte wurden zur besseren Veranschaulichung durch das Errechnen des gleitenden Durchschnitts geglättet (Linien).

Im nächsten Schritt sollte der Abbau von Stickstoffverbindungen unter den neuen Bedingungen untersucht werden (Abb. 45). Wie auch schon bei der TOC-Messung, zeigen die TN-Proben des Zulaufs eine starke Fluktuation, wobei dessen TN-Konzentration über den Versuchsverlauf stetig abnimmt. Die mittlere TN-Konzentration liegt im selben Zeitraum bei 74,4 mg/l. Nach dem Anodenbereich kann eine geringe Abnahme der TN-Konzentration mit einer mittleren Eliminierung von 15,2 mg/l beobachtet werden. Dabei ist auch hier eine starke Schwankung zu beobachten. Bei der TN-Konzentration nach dem Kathodenkompartiment kann ein ähnliches Phänomen wie in der ersten Phase beobachtet werden. So liegen auch hier die Einzelwerte weitgehend über denen, welche nach der Anode gemessen wurden und sogar teilweise deutlich über jenen des Zulaufs. Die mittlere Eliminierung nach dem Durchlaufen des gesamten Systems lag bei 4,9 mg/l und somit erneut deutlich unter dem Wert nach dem Anodenbereich. Dennoch konnte in diesem Fall im Vergleich zur ersten Phase im Mittel eine geringe Eliminierung von Stickstoffverbindungen festgestellt werden.

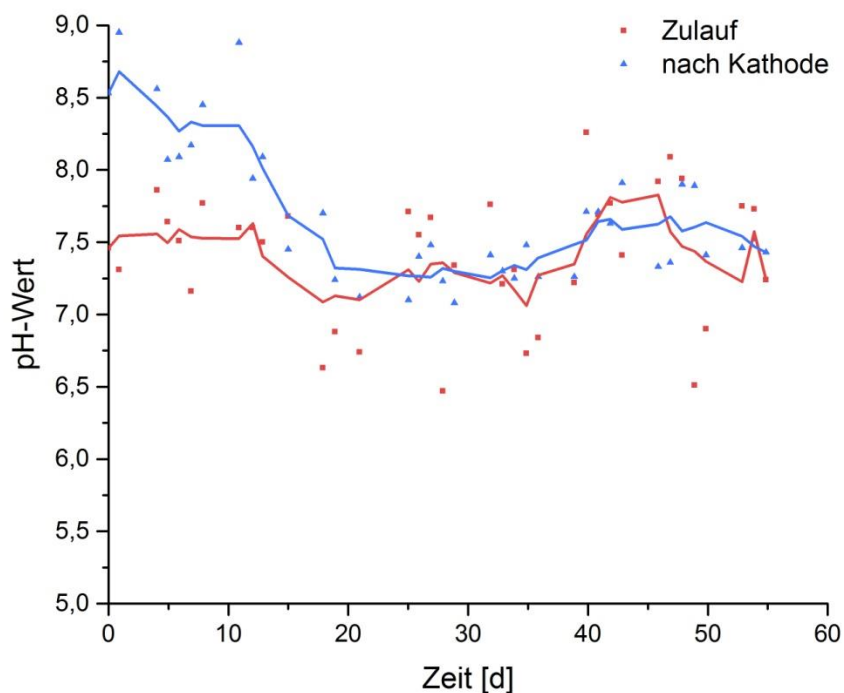


Abb. 46: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes des Abwasser-BES (Versuchsphase II). Das BES wurde im 3-Elektrodenmodus bei einem Arbeitselektrodenpotential (Anode) von 0 mV vs. SHE und Abwasser aus dem Überlauf des Vorklärbeckens betrieben. Die Einzelwerte wurden zur besseren Veranschaulichung durch das Errechnen des gleitenden Durchschnitts geglättet (Linien).

Abschließend sollte noch der Verlauf der pH-Werte in dieser Versuchsphase überprüft werden (Abb. 46). Dabei wurden nur die Werte des Zulaufs und jene des behandelten Abwassers nach dem Kathodenkompartiment untersucht, da in dieser Versuchsphase vor allem die pH-Werte nach dem Durchlaufen des gesamten Systems von Interesse waren. Wie zu erwarten zeigt der Zulauf über den gesamten Versuchszeitraum stark schwankende Werte (6,51 bis 8,09). Die pH-Werte nach dem Kathodenbereich zeigen in der ersten Versuchsphase (0-21 d) Werte im basischen Bereich, die in diesem Zeitraum im Mittel deutlich absinken (8,95 auf 7,14). Anschließend pendeln sich die Werte bis zum Versuchsende in einem Bereich von durchschnittlich $7,46 \pm 0,44$ ein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass beim Vergleich der beiden Versuchsphasen das entwickelte BES in der zweiten Phase eine in Teilen verbesserte Leistung zeigte. So war die Schwankung der Stromdichte in dieser Phase zwar deutlich größer, jedoch konnte gleichzeitig die mittlere Stromdichte um das 3,8-fache gesteigert werden. Die TOC-Eliminierung war in beiden Phasen unterschiedlich und ist zur besseren Vergleichbarkeit in Abbildung 47 nochmals zusammengefasst.

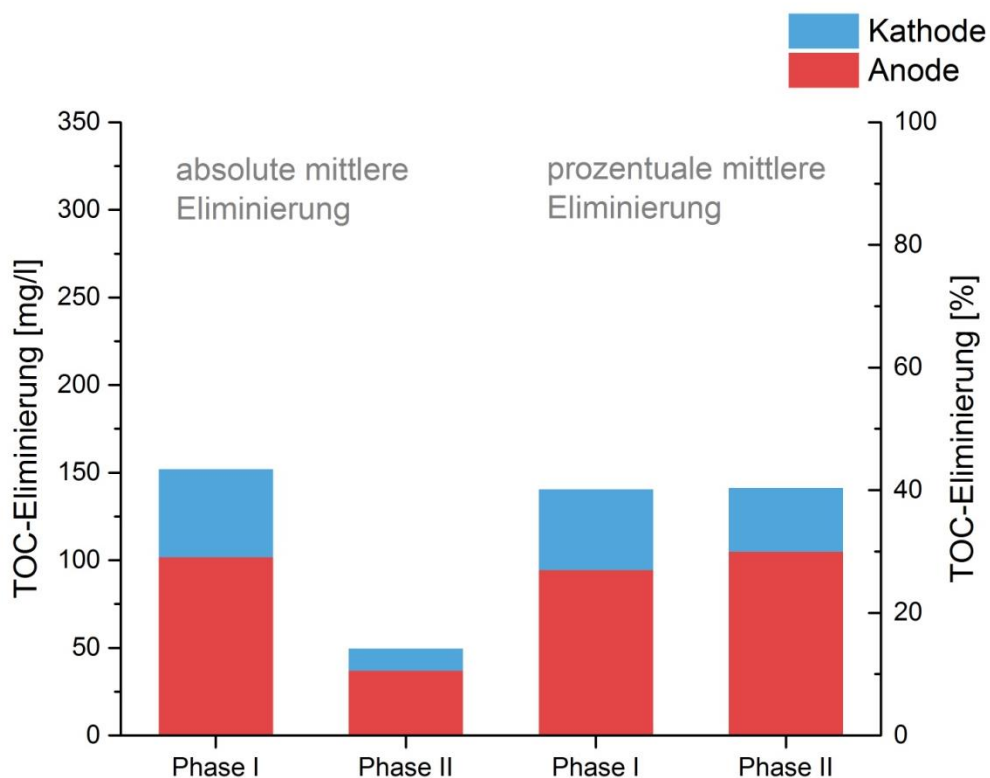


Abb. 47: Vergleich der absoluten und prozentualen Werte der mittleren TOC-Eliminierung in den beiden Versuchsphasen.

So war die absolute TOC-Eliminierung in der ersten Phase fast dreimal höher als in der zweiten Phase. Die auf die mittlere TOC-Konzentration des jeweiligen Zulaufs bezogene prozentuale TOC-Eliminierung zeigte hingegen mit 39,5 (Phase I) bzw. 40,3 % (Phase II) bei beiden Versuchen einen ähnlichen Wert. Weiterhin konnte eine unterschiedliche Verteilung der Eliminierung zwischen dem Anoden- und Kathodenkompartiment in den beiden Versuchsphasen festgestellt werden. Bezüglich des Abbaus stickstoffhaltiger Verbindungen konnte nach dem Durchlaufen des Gesamtsystems in der ersten Phase keine Abnahme der mittleren TN-Konzentration gemessen werden. In der zweiten Versuchsphase war hingegen eine geringe mittlere TN-Eliminierung zu beobachten. Weiterhin zeigte die pH-Wertmessung in beiden Versuchsphasen, nach einer Adaptationszeit von etwa 20 Tagen, eine Stabilisierung der Werte im behandelten Abwasser. Diese pendelten sich im schwach basischen Bereich ein. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte BES unter realitätsnahen Bedingungen in einem Klärwerk prinzipiell funktionsfähig ist, wobei die Leistung im Bereich der Eliminierung von Stickstoffverbindungen noch deutlich verbessert werden muss.

3 Generierung und Charakterisierung eines elektrotrophen *R. sphaeroides*-Stammes

Die Erforschung der Elektrotrophie und der mit ihr in Verbindung stehenden Organismen, ist hinsichtlich potentieller MES-Anwendungen ein vielversprechendes, wenn auch noch recht junges Forschungsfeld. Die meisten Studien in diesem Bereich beschäftigten sich bisher mit der Verwendung von Organismen, welche über die Eigenschaft, Elektronen von einer Kathode nutzen zu können, von Natur aus verfügen (Gregory *et al.*, 2004; Nevin *et al.*, 2010; Nevin *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2011; Summers *et al.*, 2013; Bose *et al.*, 2014; Ishii *et al.*, 2015). Leider sind die dafür verantwortlichen Mechanismen bisher i.d.R. kaum verstanden. Eine weitere Strategie auf dem Weg hin zu nutzbaren, elektrotrophen Organismen ist daher die Herstellung direkter Elektronentransferwege durch genetische Manipulation (Lovley & Nevin, 2013). Dabei könnten schon bekannte Elemente des EETs aus anderen Organismen dazu dienen, eine verlängerte Elektronentransportkette in einem Zielorganismus zu etablieren. Dieses Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet. Dabei diente das Nichtschwefelpurpurbakterium *R. sphaeroides* aufgrund seines vielfältigen Stoffwechsels, seiner guten genetischen Zugänglichkeit und seiner optional nutzbaren, phototropen

Lebensweise als Zielorganismus. Da gezeigt werden konnte, dass die verlängerte Elektronentransportkette des exoelektrogenen γ -Proteobakteriums *S. oneidensis* MR-1 prinzipiell auch in umgekehrter Richtung funktioniert, wurden einige der für diesen Prozess verantwortlichen Elemente in *R. sphaeroides* eingebracht (Ross *et al.*, 2011).

Der erste Schritt hierbei war die molekularbiologische Integration dieser Elemente in *R. sphaeroides*. Anschließend sollte die Expression der Elemente in den erzeugten Mutanten überprüft werden. In der abschließenden bioelektrochemischen Charakterisierung, sollte die Elektronenaufnahmekapazität der erzeugten Mutanten von einer Kathode gegenüber dem WT untersucht werden.

3.1 Einbringung und Expression EET-assoziiierter *c*-Typ Cytochrome in *R. sphaeroides*

Für die Herstellung einer verlängerten Elektronentransportkette in *R. sphaeroides* war der Transfer von Elektronen zwischen dem Periplasma und der Cytoplasmamembran ein erster wichtiger Schritt, den es zu verwirklichen galt. Zu diesem Zweck sollte das im Periplasma lokalisierte Cytochrom STC und das in der Cytoplasmamembran lokalisierte Cytochrom CymA in *R. sphaeroides* exprimiert werden. Hierfür wurden zunächst vier verschiedene Plasmidkonstrukte erzeugt, welche die Gene der beiden Proteine trugen. Dabei wurden verschiedene Anpassungen, wie z.B. eine Optimierung der Codon-Nutzung oder der Sekretionssequenzen vorgenommen. Die Genexpression zweier dieser Konstrukte wurde durch einen IPTG-induzierbaren (pIND4) und die anderen beiden über einen Licht- und Hypoxie-induzierbaren Promotor (pPUC) kontrolliert. Die detaillierte Erstellung dieser Plasmide ist in Kapitel II Abschnitt 4.7 und 4.8 beschrieben. Durch Transformation der Konstrukte in *R. sphaeroides* wurden vier Stämme generiert: JG963 (pIND4-*cymA-stc*), J964 (pIND4-*cymA-stc*-His), JG965 (pPUC-*cymA-stc*) und JG966 (pPUC-*cymA-stc*-His).

Im nächsten Schritt sollte die Expression der beiden Cytochrome in den erzeugten Stämmen unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Hierbei wurden zunächst die Proteinexpression der Stämme JG963 und JG964 unter chemoorganoheterotrophen Bedingungen getestet und dadurch die prinzipielle Funktionalität der erzeugten Konstrukte überprüft. Dabei wurden der WT (JG582) und die beiden Stämme, wie in Kapitel II Abschnitt 3.2 beschrieben, in RS-OH-Medium kultiviert. Nach der Zellernte und dem Zellaufschluss

wurden von allen Bakterienkulturen Membran- und Periplasmafraktionen hergestellt und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt.

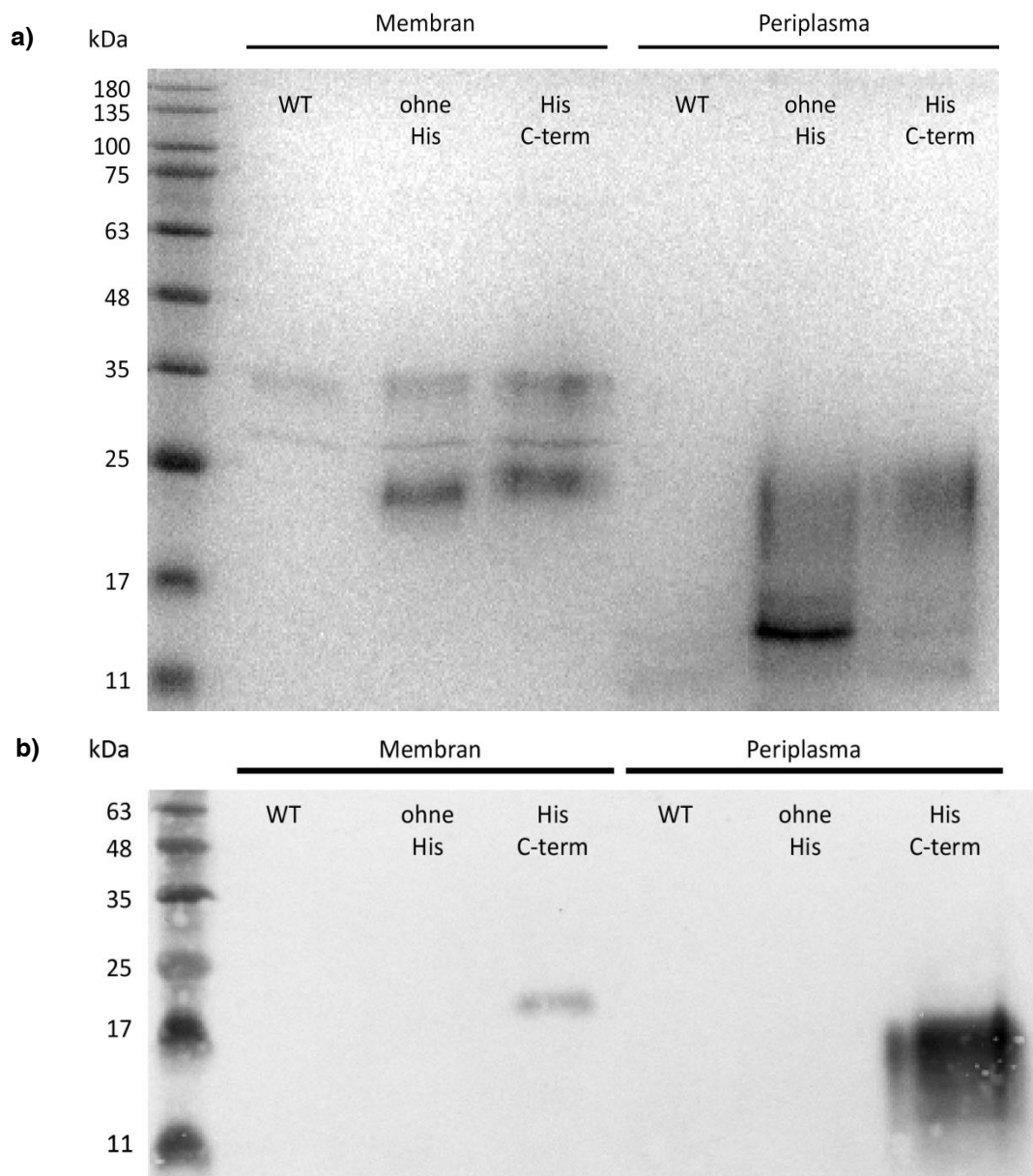


Abb. 48: Expressionsmuster der Membran- und der Periplasmafraktionen von *R. sphaeroides* WT, pIND4 *cymA-stc* (JG963) & pIND4 *cymA-stc*-His (JG964) unter chemoorganoheterotrophen Bedingungen. Die Zellen wurden in RS-OH-Medium bei einer IPTG-Konzentration von 50 μ M kultiviert und bei einer OD_{650} von 0,6 geerntet. Die Membran- und Periplasmafraktionen wurden präpariert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden je Membranfraktion 15 μ g und je Periplasmafraktion 30 μ g Protein aufgetragen. **(a)** zeigt die Hämgruppenfärbung des Gels, **(b)** den für His-Tags spezifischen Western Blot.

Daraufhin wurde, zur Unterscheidung der Cytochrome von anderen Proteinen, eine Hämgruppenfärbung durchgeführt (Abb. 48 a). Das Expressionsmuster zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen dem WT und den beiden anderen untersuchten Stämmen. Bei den

Membranfraktionen weisen alle Stämme zwei Signale im Bereich von 28 und 35 kDa auf. Weiterhin zeigen die mit 50 μM IPTG induzierten Stämme JG963 (ohne His) und JG964 (His C-term) jeweils ein deutliches Signal im Bereich von 21 kDa. Dies entspricht annähernd dem theoretischen Molekulargewicht von CymA (20,8 kDa; National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov/protein /NP_720107.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_720107.1)). Bei den Periplasmafraktionen sind bei allen untersuchten Proben zwei schwache Banden bei 11 und 13 kDa zu erkennen. Weiterhin zeigen die Stämme JG963 und JG964 im Bereich von 11-22 kDa jeweils ein breites, durchgehendes Signal, das bei JG963 im Bereich von 14 kDa zusätzlich eine klare Bande aufweist. Das theoretische Molekulargewicht von STC beträgt 9,7 kDa (ohne Signalpeptid; www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_718311.1; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), was zunächst nicht mit der Größe des zuvor beschriebenen Signals übereinstimmt. Es konnte jedoch in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass dieses Laufverhalten durchaus charakteristisch für STC zu sein scheint (Sturm-Richter *et al.*, 2015; Sturm *et al.*, 2015). Um die zuvor beschriebenen Signale eindeutig CymA bzw. STC zuordnen zu können, wurde im Anschluss ein Western Blot mit darauffolgender Immunodetektion durchgeführt. Hierbei wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch an die fusionierten His-Tags der beiden Cytochrome binden sollte (Abb. 48 b). Bei den Membranfraktionen ist hierbei ein klares Signal von JG964 im Bereich von 21 kDa zu erkennen. Weiterhin zeigte auch die Periplasmafraktion dieses Stammes erneut ein breites, durchgängiges Signal im Bereich von 11-22 kDa. Bei allen anderen Fraktionen sind keine weiteren Banden erkennbar. Daher kann in diesem Fall eindeutig von einer Expression von CymA und STC ausgegangen werden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse lässt sich festhalten, dass CymA wie auch STC in den Stämmen JG963 und JG964 grundsätzlich exprimiert werden.

Nachdem die grundlegende Expression der ersten beiden Konstrukte in *R. sphaeroides* nachgewiesen war, sollte im nächsten Schritt deren Expression unter photoorganoheterotrophen Bedingungen nachgewiesen werden. Dabei muss zunächst angemerkt werden, dass die Vorkultivierung aller *R. sphaeroides*-Kulturen für die spätere elektrochemische Charakterisierung unter denselben Bedingungen erfolgte. Dafür waren zwei Faktoren ausschlaggebend: Zum einen erfolgte das Wachstum der Kulturen deutlich schneller, als unter photolithoautotrophen Bedingungen und zum anderen wurde so dennoch die Expression des Photosyntheseapparates sichergestellt. Dadurch sollte auch die Umstellung auf einen photolithoautotrophen Stoffwechsel im späteren Charakterisierungsversuch beschleunigt werden.

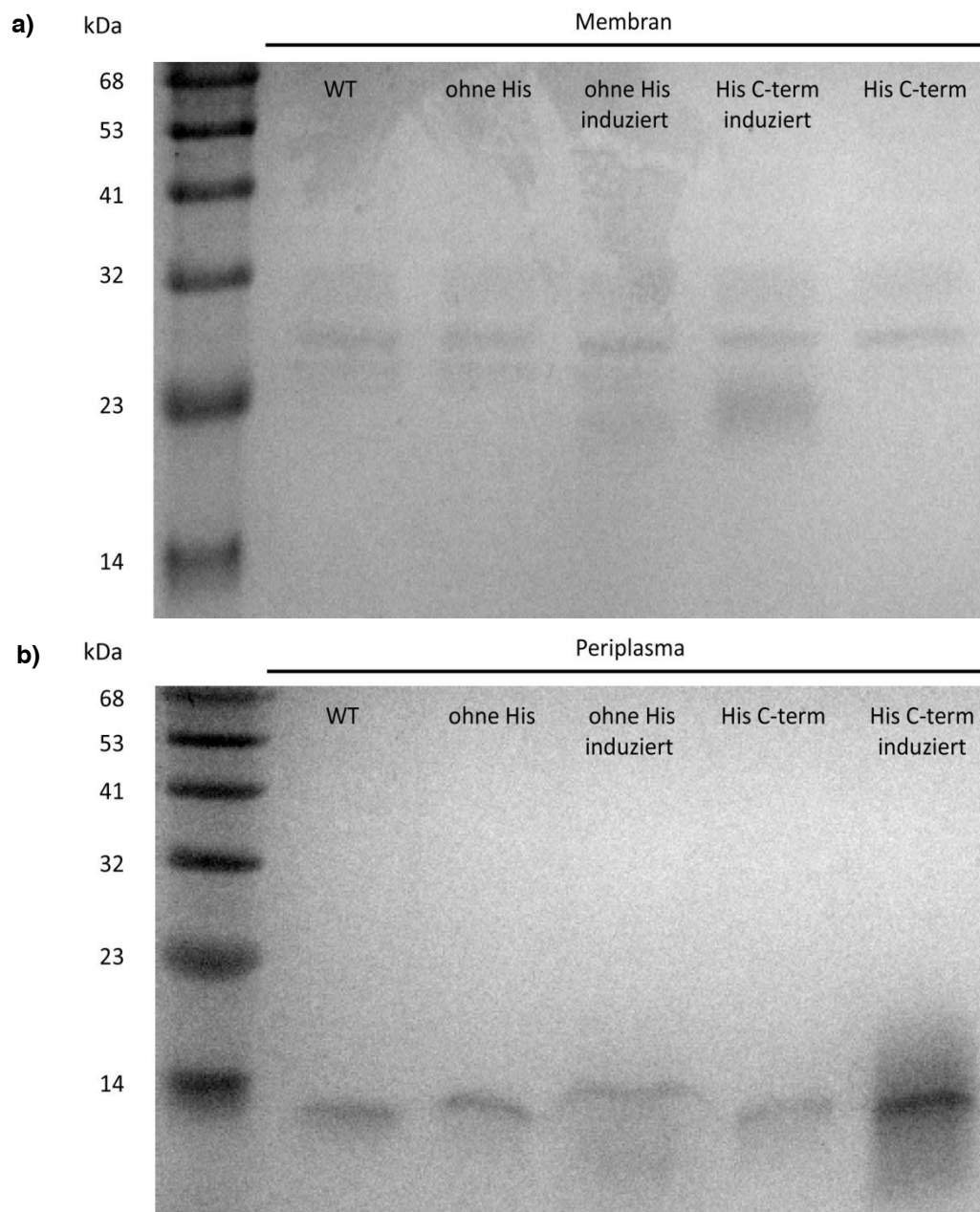


Abb. 49: Hämgruppenfärbung der Membran- (a) und der Periplasmafraktionen (b) von *R. sphaeroides* WT, pIND4 *cymA-stc* (JG963) & pIND4 *cymA-stc*-His (JG964) unter photoorganoheterotrophen Bedingungen. Die Zellen wurden in RS-OH-Medium im Licht kultiviert, wobei die induzierten Proben mit 50 μ M IPTG versetzt wurden. Die Zellernte erfolgte bei einer OD_{650} von 0,6. Die Membran- und Periplasmafraktionen wurden präpariert mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden je Fraktion 20 μ g Protein aufgetragen.

Die Kultivierung der Stämme JG582, JG963 und JG964 erfolgte, wie in Kapitel II Abschnitt 3.2 beschrieben, in RS-OH-Medium unter anaeroben Bedingungen im Licht. Dabei wurden jeweils zwei Ansätze der Stämme JG963 und JG964 hergestellt, von denen je einer mit 50 μ M IPTG induziert wurde (JG963 = ohne His + ohne His induziert; JG964 = His C-term + His C-

term induziert). Nach der Zellernte und dem Zellaufschluss wurden von allen Kulturen Membran- und Periplasmafraktionen hergestellt und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt.

Bei den Membranfraktionen sind bei allen Stämmen drei Signale im Bereich von 25, 29 und 32 kDa zu erkennen (Abb. 49a). Weiterhin zeigen die induzierten JG963 und JG964 Stämme jeweils erneut eine weitere Bande (21 kDa) im Bereich des theoretischen Molekulargewichts von CymA. Bei den Periplasmafraktionen ist bei allen untersuchten Proben eine markante Bande bei 13 kDa zu erkennen (Abb. 49b). Weiterhin zeigen die induzierten JG963 und JG964 Stämme im Bereich von 11-20 kDa jeweils erneut ein breites, durchgehendes Signal, was wahrscheinlich auf STC schließen lässt. Um diese Signale, wie schon zuvor, eindeutig CymA bzw. STC zuordnen zu können, wurde auch hier ein Western Blot mit darauffolgender Immunodetektion durchgeführt (Abb. 50).

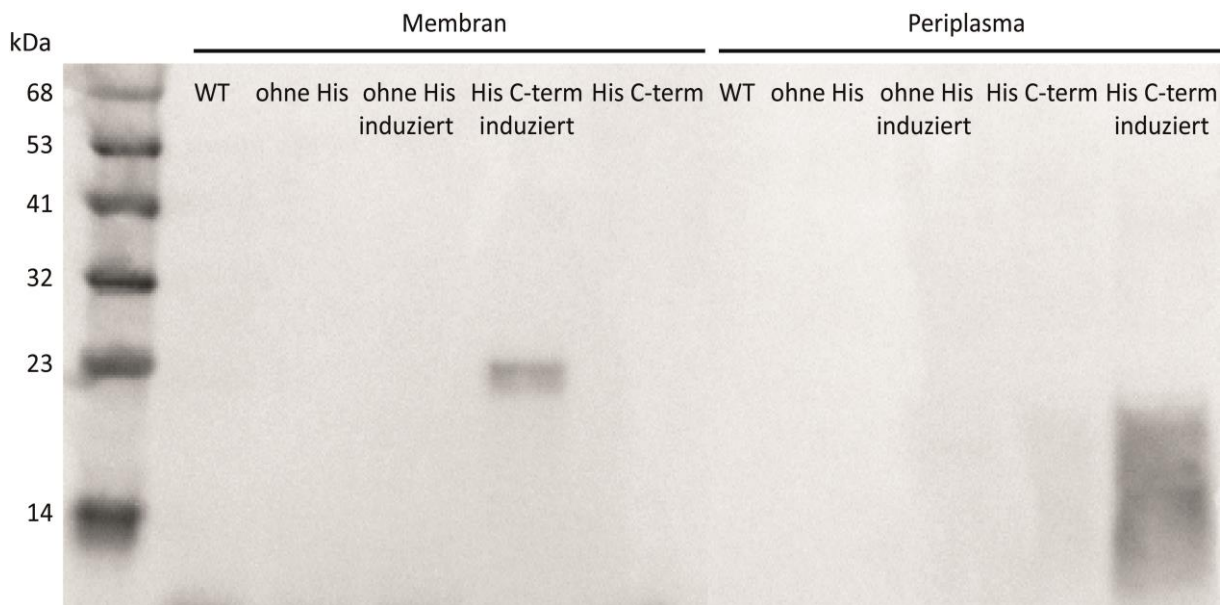


Abb. 50: Westernblot der Membran- und der Periplasmafraktionen von *R. sphaeroides* WT, pIND4 *cymA-stc* (JG963) & pIND4 *cymA-stc-His* (JG964) unter photoorganoheterotrophen Bedingungen. Die Zellen wurden in RS-OH-Medium im Licht kultiviert, wobei die induzierten Proben mit 50 μ M IPTG versetzt wurden. Die Zellernte erfolgte bei einer OD₆₅₀ von 0,6. Die Membran- und Periplasmafraktionen wurden präpariert mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden je Fraktion 20 μ g Protein aufgetragen.

Bei den Membranfraktionen ist ein klares Signal der induzierten Probe von JG964 im Bereich von 21 kDa zu erkennen. Weiterhin zeigte die induzierte Periplasmafraktion dieses Stammes erneut ein breites, durchgängiges Signal im Bereich von 11-20 kDa. Wie zu erwarten sind bei allen anderen Fraktionen keine weiteren Banden erkennbar. Daher kann auch in diesem Fall eindeutig von einer Expression von CymA und STC ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass auch unter photoorganoheterotrophen Bedingungen die beiden Cytochrome in den induzierten Stämmen von JG963 und JG964 exprimiert werden. Weiterhin scheint der pIND4-Promotor dieser Konstrukte unter diesen Rahmenbedingungen eine geringe Basalaktivität zu besitzen, was in einer späteren Anwendung von Vorteil sein kann. Auch die richtige Lokalisation der beiden Cytochrome scheint in diesem Fall erneut gegeben zu sein.

Nachdem die Expression von CymA und STC in den Stämmen JG963 und JG964 unter photoorganoheterotrophen Bedingungen nachgewiesen werden konnte, sollte dies auch mit den Stämmen JG965 und JG966 erfolgen. Diese verfügten jeweils über einen Licht- und Hypoxie-induzierbaren pPUC-Promotor. Der Vorteil dieser beiden Stämme war hierbei, dass unter den zuvor genannten Bedingungen keine Zugabe eines chemischen Induktors mehr notwendig wäre.

Auch in diesem Fall erfolgte die Kultivierung der Stämme JG582, JG965 und JG966, wie zuvor beschrieben, in RS-OH-Medium unter anaeroben Bedingungen im Licht. Dadurch befanden sich die Stämme JG965 (ohne His) und JG966 (His C-term) aufgrund des pPUC-Promotors beide in induziertem Zustand. Nach der Zellernte und dem Zellaufschluss wurden von allen Kulturen Membran- und Periplasmafraktionen hergestellt und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt.

Bei den Membranfraktionen ist bei allen Stämmen ein Signal im Bereich von 34 kDa zu erkennen (Abb. 51 a). Weiterhin zeigt die Probe von JG965 eine weitere Bande im Bereich von 29 kDa. Die zu erwartenden Signale im Bereich des theoretischen Molekulargewichts von CymA konnten jedoch weder bei JG965 noch bei JG966 nachgewiesen werden. Bei den Periplasmafraktionen ist ausschließlich bei Stamm JG966 im Bereich von 11-22 kDa ein, für STC charakteristisches, breites Signal zu erkennen. Diese Annahme konnte durch eine korrespondierende Bande im zugehörigen Western Blot bestätigt werden (Abb. 51 b). Weitere Signale konnten nicht detektiert werden, was die zuvor angedeutete fehlende Expression von CymA in JG965 wie JG966 bestätigt.

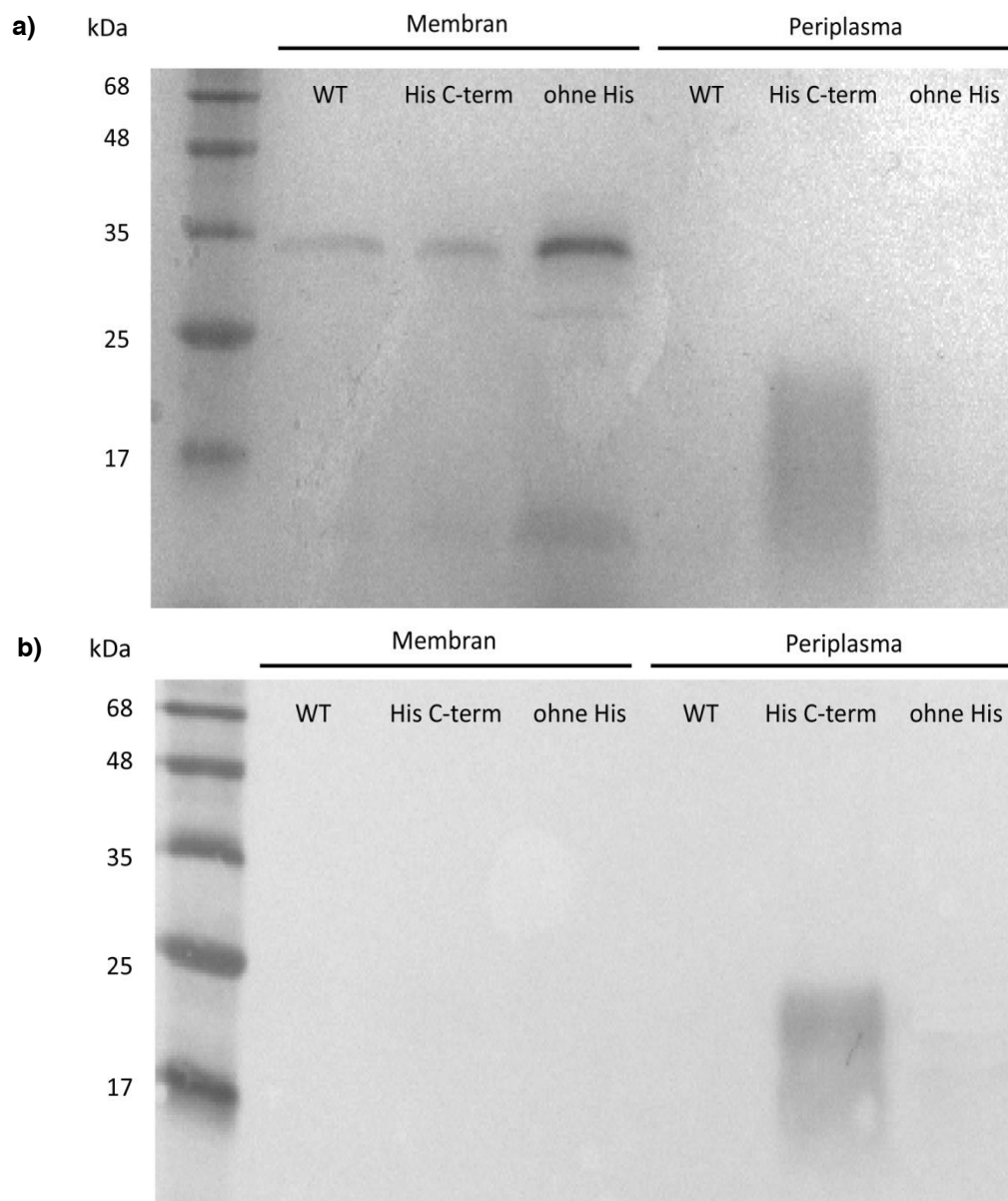


Abb. 51: Expressionsmuster der Membran- und der Periplasmafraktionen von *R. sphaeroides* WT, pPUC *cymA-stc* (JG965) & pPUC *cymA-stc*-His (JG966) unter photoorganoheterotropen Bedingungen. Die Zellen wurden in RS-OH-Medium im Licht kultiviert, wobei die induzierten Proben mit 50 μ M IPTG versetzt wurden. Die Zellernte erfolgte bei einer OD_{650} von 0,6. Die Membran- und Periplasmafraktionen wurden präpariert mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden je Membranfraktion 15 μ g und je Periplasmafraktion 30 μ g Protein aufgetragen. (a) zeigt die Hämgruppenfärbung des Gels, (b) den für His-Tags spezifischen Western Blot.

Folglich scheinen die beiden über den pPUC-Promotor regulierten Stämme entweder nur STC (JG966) oder keines der beiden Cytochrome (JG965) exprimieren zu können.

Betrachtet man nun die Expression von CymA und STC in *R. sphaeroides* nochmals zusammengefasst, kann Folgendes festgehalten werden: Für die beiden mittels IPTG induzierbaren Stämme JG963 und JG964 konnte die Expression der beiden Cytochrome

eindeutig unter chemoorganoheterotrophen, wie photoorganoheterotrophen Bedingungen nachgewiesen werden. Bei den über Licht und Sauerstoffmangel induzierbaren Stämmen JG965 und JG966 konnte nur bei der letzteren Mutante die Expression von STC unter photoheterotrophen Bedingungen gezeigt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte nun eine bioelektrochemische Charakterisierung einiger dieser Stämme erfolgen. Dies wird im nächsten Abschnitt im Einzelnen dargestellt.

3.2 Einfluss EET-assoziiertes *c*-Typ Cytochrome auf die bioelektrochemischen Eigenschaften von *R. sphaeroides*

Nachdem die Expressionseigenschaften der einzelnen erzeugten Stämme unter verschiedenen Bedingungen untersucht waren, sollte abschließend der Einfluss der eingebrachten Cytochrome auf die bioelektrochemischen Eigenschaften von *R. sphaeroides* näher beleuchtet werden. Dazu wurden drei verschiedene Stämme in einer M3C (siehe Abschnitt 1.1.2) bezüglich ihrer Elektronenaufnahmekapazität untersucht. Neben dem WT wurden hierbei die Stämme JG963 und JG966 herangezogen. Für JG963 sprach, dass sowohl CymA als auch STC unter photoorganoheterotrophen Bedingungen exprimiert wurden. Dabei sollte eine Störung der Funktionalität der beiden Cytochrome durch das Fehlen der jeweiligen His-Tags verringert werden. Bei JG966 konnte nur die Expression von STC unter photoorganoheterotrophen Bedingungen nachgewiesen werden. Daher sollte untersucht werden, ob das alleinige Einbringen dieses periplasmatischen Cytochroms ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Elektronenaufnahmekapazität von *R. sphaeroides* hat.

Generell war bei der Untersuchung der potentiellen elektrotrophen Eigenschaften von *R. sphaeroides* die Quantifizierung der von der Arbeitselektrode abfließenden Elektronen eine wichtige Größe. Entscheidend dabei war, dass die Arbeitselektrode im beschriebenen Versuchsaufbau den einzigen, potentiellen Elektronendonator darstellte. Des Weiteren wurde der Versuch unter photolithoautotrophen Bedingungen durchgeführt. Dies diente zum einen der grundlegenden Energieversorgung der Zellen über den zyklischen Elektronentransfer der anoxygenen Photosynthese. Dabei wurde Licht als zusätzliche Energiequelle genutzt, um mögliche Limitierungen (z.B. ATP-Mangel) einer ausschließlich kathodenabhängigen chemolithoautotrophen Lebensweise in dieser Phase der Stammcharakterisierung zu vermeiden. Zum anderen sollten weitere, durch die Arbeitselektrode abiotisch reduzierbare Medienkomponenten auf ein Minimum reduziert werden. Da unter photolithoautotrophen Bedingungen Minimalmedien zum Einsatz kommen, die kaum potentielle Elektronendonoren

oder -akzeptoren aufweisen, sollte durch deren Einsatz ein stabiler und geringer Hintergrundstrom (Stromfluss ohne Zellen) gewährleistet werden.

Für die Durchführung des Experiments wurden zunächst die Vorkulturen der Stämme JG582, JG963 und JG966, wie in Kapitel II Abschnitt 3.2 beschrieben, hergestellt und anschließend in RS-PLA-Medium überführt. Diese Kulturen wurden im Anschluss jeweils in die vorbereiteten M3Cs gefüllt und die Messung gestartet (siehe Kapitel II Abschnitt 13.2). Dabei wurde die Stromstärke gegenüber der Zeit gemessen und anschließend auf die geometrische Arbeitselektrodenfläche bezogen. Da bei Potentiostaten ein Elektronenabfluss von der Arbeitselektrode definitionsgemäß über ein negatives Vorzeichen gekennzeichnet wird, wurde zur besseren Darstellung ggf. der Betrag der resultierenden Stromdichte angegeben. Die Messung jedes Stammes erfolgte im biologischen Duplikat, wobei zusätzlich eine Negativkontrolle mit zellfreiem RS-PLA-Medium angefertigt wurde.

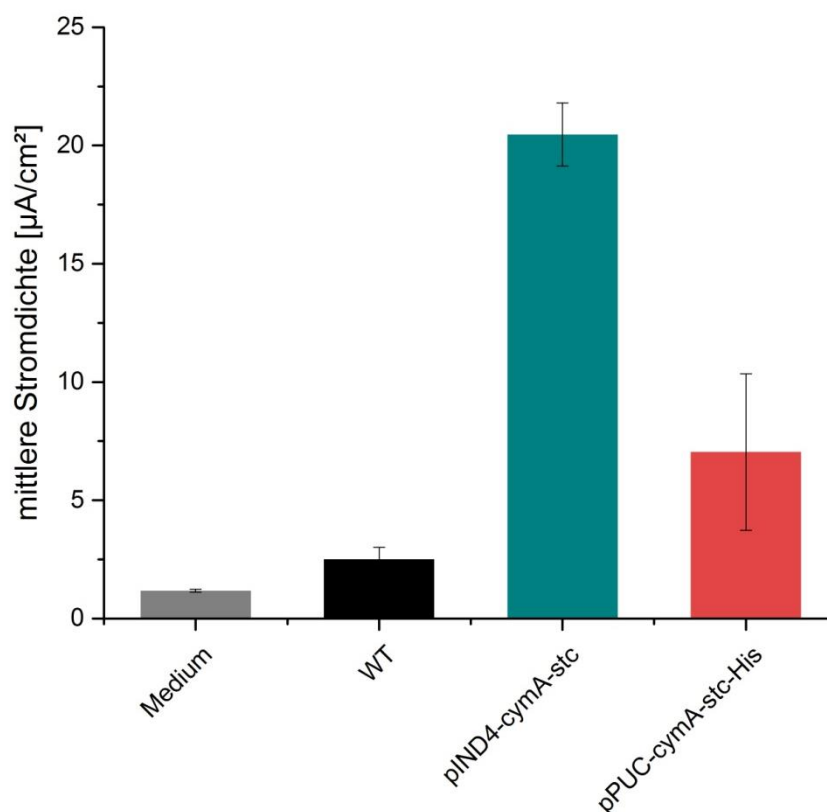


Abb. 52: Erreichte mittlere Stromdichte von *R. sphaeroides* WT (JG582), pIND4-cymA-stc (JG963) & pPUC-cymA-stc-His (JG966) im Vergleich zur Medienkontrolle in einer M3C. Das Arbeitselektrodenpotential betrug -500 mV vs. SHE.

Um den Einfluss von CymA und STC auf die elektrotrophen Eigenschaften von *R. sphaeroides* genauer zu verstehen, wurden in einem ersten Schritt die mittleren

Stromdichten der Stämme J582, JG963 und JG966, sowie der Medienkontrolle, über den gesamten Versuchszeitraum berechnet (siehe Kapitel II Abschnitt 13.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt. Die Medienkontrolle zeigt hierbei eine mittlere Stromdichte von $1,175 \pm 0,064 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Die mittlere Stromdichte des Stammes JG582 beträgt $2,497 \pm 0,505 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und ist damit in etwa doppelt so hoch wie die der Kontrolle. Weiterhin weist JG963 mit $20,459 \pm 1,336 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ im Vergleich zu JG582 eine über 8-fach höhere mittlere Stromdichte auf. JG966 hingegen zeigt mit einer erreichten Stromdichte von $7,036 \pm 3,305 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ im Vergleich zum WT einen nur knapp 3-mal so hohen Wert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die mittlere Stromdichte und somit auch der Elektronenabfluss von der Arbeitselektrode bei den beiden Cytochrom-exprimierenden Mutanten deutlich über dem Niveau des WTs lag. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass auch Bestandteile von lysierten Zellen für eine elektrochemische Reaktion an einer Kathode verantwortlich sein können, wurde weiterhin die Entwicklung der OD über den gesamten Versuchsverlauf untersucht (Yates *et al.*, 2014).

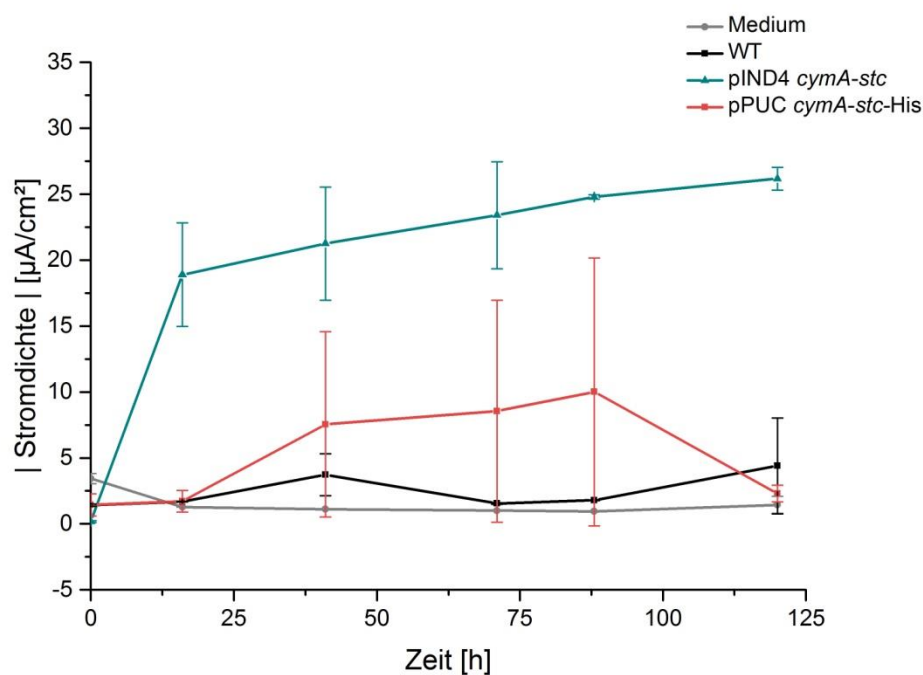


Abb. 53: Zeitlicher Verlauf des Betrages der Stromdichte von *R. sphaeroides* WT (JG582), pIND4-*cymA-stc* (JG963) und pPUC-*cymA-stc-His* (JG966) in einer M3C. Die Grafik zeigt die gemessenen Stromdichten der Medienkontrolle und der *R. sphaeroides*-Stämme bei einem Arbeitselektrodenpotential von -500 mV vs. SHE zum Zeitpunkt der Probenentnahme für die Bestimmung der OD₆₅₀ und des pH-Wertes.

Zudem erfolgte auch eine Messung der pH-Werte, da eine starke Veränderung dieser ebenfalls einen Einfluss auf die Leitfähigkeit und somit die gemessene Stromdichte gehabt

hätte. Aus diesem Grund wurden zu mehreren Zeitpunkten Proben aus den verschiedenen M3Cs entnommen, deren OD- und pH-Werte bestimmt und diese gegenüber der Zeit aufgetragen (Abb. 54 & Abb. 55). Weiterhin wurde jeweils der Betrag der aktuellen Stromdichte zum jeweiligen Probenzeitpunkt aus der Stromdichtemessung extrahiert und ebenfalls gegenüber der Zeit aufgetragen (Abb. 53). Dies soll eine direkte Korrelation der optischen Dichte und des pH-Wertes mit der gemessenen Stromdichte ermöglichen.

Zunächst sollten die Stromdichten der verschiedenen Stämme in diesem Kontext betrachtet werden. Die Medienkontrolle zeigt hierbei am Startpunkt ihr Maximum von $3,441 \pm 0,383 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und pendelt sich danach auf einen durchgehend stabilen Wert um $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ein. Die Stromdichte des JG582-Stammes verläuft mit Ausnahme des Startpunktes leicht pendelnd oberhalb der Medienkontrolle und erreicht ihr Maximum nach 120 h bei $4,394 \pm 3,639 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. JG963 zeigt initial sogar eine geringere Stromdichte als alle anderen Ansätze. Daraufhin steigt diese jedoch stark an und erhöht sich bis zum Versuchsende (120 h) kontinuierlich auf einen maximalen Wert von $26,171 \pm 0,872 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

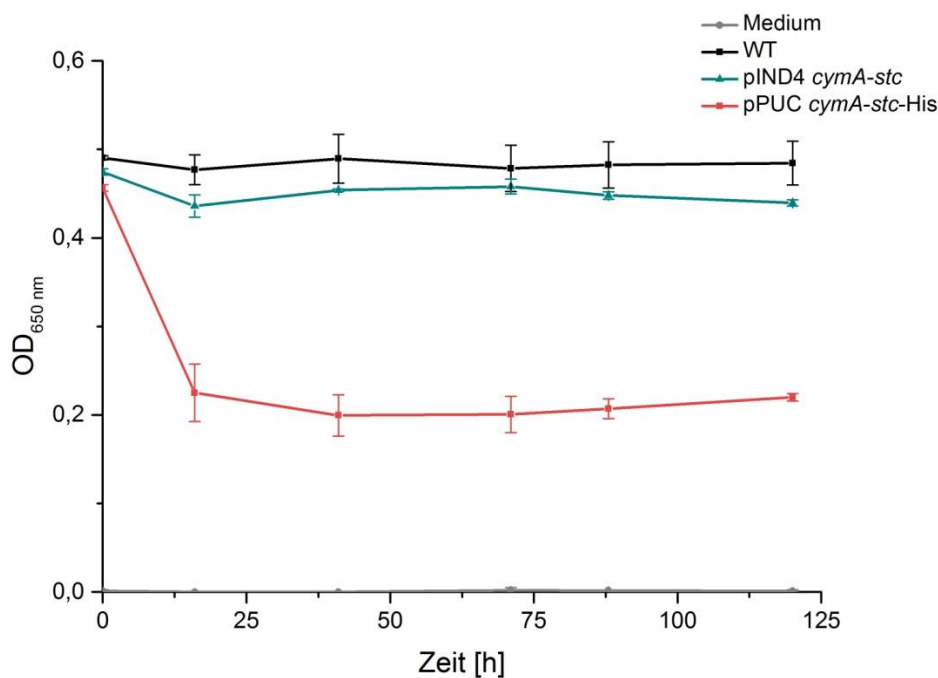


Abb. 54: Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte von *R. sphaeroides* WT (JG582), pIND4-*cymA-stc* (JG963) und pPUC-*cymA-stc-His* (JG966) in einer M3C. Die Grafik zeigt die gemessenen optischen Dichten der Medienkontrolle und der *R. sphaeroides*-Stämme bei einem Arbeitselektrodenpotential von -500 mV vs. SHE zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

JG966 weist zu Beginn ein identisches Verhalten zu JG582 auf. Anschließend beginnt die Stromdichte bis auf ein Maximum von $10,006 \pm 10,165 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ nach 88 h zu steigen, um zum

Ende der Messung knapp über das Niveau der Medienkontrolle abzufallen. Um diese Beobachtungen besser einordnen zu können sollte im nächsten Schritt der Verlauf der OD betrachtet werden (Abb. 54).

Wie zu erwarten verändert sich die OD der Medienkontrolle über den gesamten Zeitraum nicht und pendelte um einem Wert von $0,001 \pm 0,001$. Die OD von JG582 betrug initial $0,490 \pm 0,002$ und blieb über den gesamten Versuchsverlauf annähernd stabil ($\pm 0,010$). Bei JG963 fiel die Start-OD von $0,475 \pm 0,004$ zunächst auf $0,463 \pm 0,013$ ab und blieb anschließend ebenfalls im Bereich von $\pm 0,020$ stabil. JG966 zeigte hingegen ein völlig anderes Verhalten. Die Start-OD fiel von $0,457 \pm 0,004$ innerhalb der ersten 16 h auf $0,225 \pm 0,033$ ab. Anschließend sank der Wert noch weiter auf $0,200 \pm 0,023$ und pendelte sich auf diesem Niveau ($\pm 0,010$) bis zum Versuchsende ein.

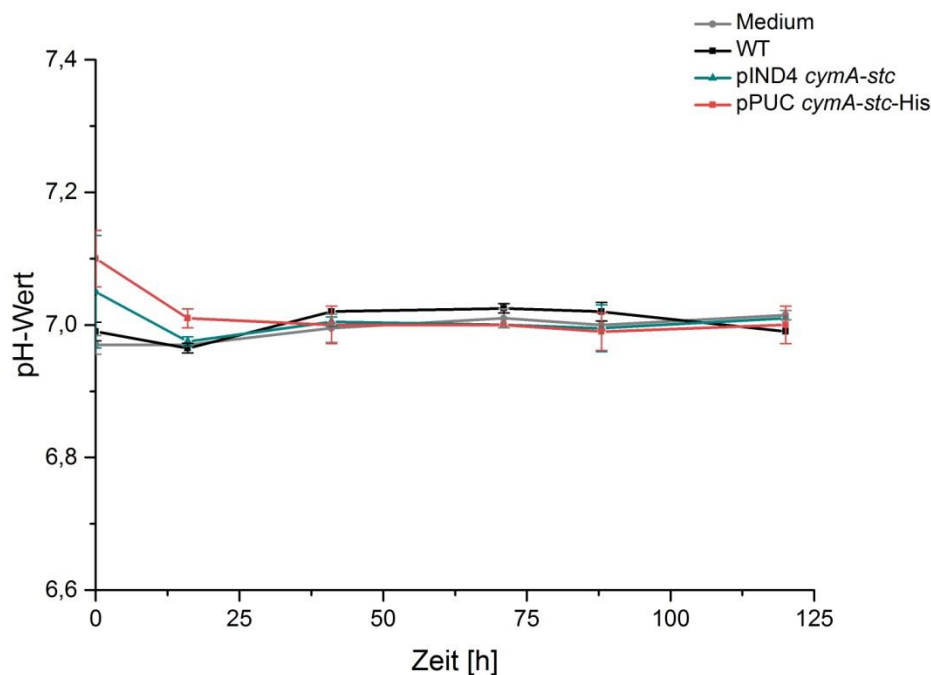


Abb. 55: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes von *R. sphaeroides* WT (JG582), pIND4-*cymA-stc* (JG963) und pPUC-*cymA-stc-His* (JG966) in einer M3C. Die Grafik zeigt die gemessenen pH-Werte der Medienkontrolle und der *R. sphaeroides*-Stämme bei einem Arbeitselektrodenpotential von -500 mV vs. SHE zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Da bei diesen Ansätzen keine Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden konnte, scheinen die Zellen von JG966 im Gegensatz zu jenen von JG582 und JG963 zumindest zu Beginn des Versuches in großem Maße zu lysieren. Um diese Beobachtung mit den anderen Daten zu einem Gesamtbild zusammenzufassen, sollte abschließend noch der Verlauf der pH-

Werte betrachtet werden (Abb. 55). Dieser ist bei allen Ansätzen aufgrund des täglichen Nachjustierens in einem Bereich von $7,000 \pm 0,030$ sehr stabil. Nur zu Beginn des Versuches zeigten die Stämme JG963 und JG966 mit Werten von $7,050 \pm 0,014$ bzw. $7,100 \pm 0,042$ eine größere Abweichung.

Zusammenfassend lässt sich somit folgendes festhalten: Die Medienkontrolle zeigt über den gesamten Versuchsverlauf im Vergleich sehr geringe Stromdichten, keine Zunahme der OD und keine großen Schwankungen des pH-Wertes. Daher scheint das Medium über die gemessene Hintergrundstromdichte hinaus keinen Einfluss auf die Messung der Stromdichte der *R. sphaeroides*-Ansätze zu haben. Dies spricht dafür, dass *R. sphaeroides* die wichtigste elektrochemisch aktive Komponente in diesem System zu sein scheint. Weiterhin zeigt JG582 eine etwa um Faktor 2 höhere mittlere Stromdichte als die Medienkontrolle, bei einer über die Zeit stabilen OD und einem stabilen pH-Wert. Daher scheint dieser Stamm schon von Natur aus in der Lage zu sein, geringe Elektronenmengen von einer Kathode nutzen zu können. JG963 zeigt eine gegenüber JG582 eine etwa 8-fach erhöhte mittlere Stromdichte, ebenfalls eine über die Zeit stabile OD und einen stabilen pH-Wert. Hierbei scheint die Expression von CymA und STC zu einer enormen Steigerung der Elektronenaufnahmekapazität von *R. sphaeroides* geführt zu haben. Von dieser könnte man auch im Fall von JG966, bezogen auf die gegenüber JG582 3-fach erhöhte mittlere Stromdichte, ausgehen. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass die Abnahme der OD in etwa mit dem Anstieg der Stromstärke korrelierte. Weiterhin ist im selben Zeitraum eine verhältnismäßig starke Abnahme des pH-Wertes zu erkennen. Daher könnte der Großteil der gemessenen Stromdichte auf die Interaktion der Arbeitselektrode mit Bestandteilen von lysierten Zellen zurückzuführen sein.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die Expression von CymA und STC zu einer deutlichen Verbesserung der elektrotrophen Eigenschaften von *R. sphaeroides* gegenüber dem WT geführt zu haben.

IV Diskussion

1 Entwicklung neuer bioelektrochemischer Systeme

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer, bioelektrochemischer Systeme, die zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen im Bereich der Bioelektrochemie genutzt werden können. Hierbei wurden zum einen zwei Versionen einer vielseitig einsetzbaren M3C und zum anderen ein BES für die Abwasserbehandlung entworfen. Dabei wurden verschiedene Anforderungen bei der Konzeption dieser Systeme formuliert, die bei der darauffolgenden Konstruktion umgesetzt werden sollten. Im Folgenden sollen der Aufbau der Systeme und deren Funktionskonzepte, sowie die dabei aufgetretenen Probleme diskutiert werden.

1.1 Entwicklung einer vielseitig einsetzbaren mikrobiellen 3-Elektrodenzelle

1.1.1 Mikrobielle 3-Elektrodenzelle mit 2000 ml Arbeitsvolumen (Version A)

Die im ersten Schritt entwickelte M3C war jene Version mit einem Arbeitsvolumen von 2000 ml. Dieses folgte vom Grundkonzept her einem, in mehreren Arbeiten verwendeten System, bei dem ebenfalls alle Messelemente in den Deckel integriert waren (Marsili *et al.*, 2008b; Ross *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit entwickelte Zelle baute auf einem Glaszylinder auf, welcher mit einem abnehmbaren, über verspannen fixierbaren, Kunststoffdeckel versehen wurde. In diesen Deckel konnten alle für das bioelektrochemische Experiment erforderlichen Elemente, wie z.B. Elektroden oder Begasungsrohre, integriert werden. Dabei konnten Messungen mit bis zu zwei 3-Elektroden-Anordnungen, bestehend aus Arbeits-, Bezugs- und Gegenelektrode, in einem Aufbau verwirklicht werden. Weiterhin bestand die Möglichkeit Gase, wie z.B. Stickstoff, über den Deckel zuzuführen und über weitere Anschlüsse eine Beprobung oder den Anschluss von weiteren Peripheriegeräten vorzunehmen. Mittels eines Magnetrührstabs konnte die Zelle bei Bedarf aktiv und definiert durchmischt werden.

Bei der grundlegenden Konzipierung dieser M3C wurde im ersten Schritt das Arbeitsvolumen definiert. Dieses ist in den vielen der bisher beschriebenen BES dieser Art teilweise deutlich kleiner (Marsili *et al.*, 2008b; Kloke *et al.*, 2010). Da die Zelle ursprünglich für eine Langzeitanwendung zur Anreicherung elektrotropher, thermophiler Organismen entworfen wurde, schien hierbei die Problematik einer starken Verdunstung des Kulturmediums von

großer Bedeutung zu sein. Weiterhin kam im Falle eines Langzeitexperiments auch die hohe Zahl an zu entnehmenden Proben hinzu. Daher wurde das Volumen im Verhältnis zur Arbeitselektrodenfläche sehr groß gewählt. Dank dieser Konzeption konnte die M3C erfolgreich bei hohen Umgebungstemperaturen zum Einsatz gebracht werden (Reiner, 2015; Geiger, 2016). Dennoch ergeben sich in diesem Zusammenhang auch Nachteile. Da das Verhältnis des Arbeitsvolumens im Vergleich zur Arbeitselektrode sehr groß ist, ist der Anteil der planktonischen Zellen gegenüber der, sich an der Arbeitselektrode befindlichen, sessilen Zellen ebenfalls sehr groß. Dies stellt vor allem ein Problem dar, wenn Organismen zur Anwendung kommen, die maßgeblich über einen direkten EET mit der Arbeitselektrode in Kontakt stehen. Als Beispiel kann hier *G. sulfurreducens* genannt werden, welcher keine endogenen Shuttle bildet und somit Elektronen ausschließlich über einen direkten EET auf unlösliche Elektronenakzeptoren übertragen kann (Straub & Schink, 2003). Daher scheint diese M3C vor allem für Experimente geeignet zu sein, bei denen der Kontakt zur Arbeitselektrode überwiegend über einen indirekten EET erfolgt (Sturm-Richter *et al.*, 2015). Ein weiterer Nachteil des großen Arbeitsvolumens sind die benötigten großen Mengen an Vorkulturen und Kulturmedium, sowie der große Platzbedarf der M3C.

Nach der Festlegung des Arbeitsvolumens erfolgte die Konzeption des Deckels. Ein wichtiges Kriterium dabei war, dass dieser mit allen integrierten Elementen abgenommen und auf ein anderes Zylinderglas aufgesetzt werden konnte, um beispielweise das Kulturmedium möglichst schnell auszutauschen zu können. Weiterhin wurde der Deckel so ausgelegt, dass eine möglichst variable Nutzung der eingebrachten Öffnungen möglich war. So konnte die Anordnung der einzelnen Elemente prinzipiell vollständig frei gewählt werden. In diesem Zusammenhang war vor allem ein geringer Abstand der Messelektroden untereinander von Bedeutung, da mit zunehmender Distanz zwischen diesen eine Erhöhung des elektrischen Widerstands einhergeht. Dadurch entsteht ein Spannungsabfall, welcher insbesondere zwischen der Arbeits- und Bezugselektrode zu einer Verfälschung der gemessenen Potentialdifferenz führt (unkompensierter Widerstand). Diese Potentialdifferenz nutzt der Potentiostat in einer 3-Elektrodenanordnung, um das aktuell anliegende Arbeitselektrodenpotential zu bestimmen. Über die Polarisation der Gegenelektrode wird dieses Potential daraufhin wieder dem vorgegebenen Sollwert angeglichen. Daher ist für eine präzise Regelung entscheidend, dass der Spannungsabfall und somit die Distanz zwischen Arbeits- und Bezugselektrode möglichst gering ist (Metrohm Autolab B.V, 2011).

Die Platingegenelektrode wurde in diesem Aufbau aufgrund der ursprünglichen Anwendung bei hohen Temperaturen nicht durch eine PEM, sondern durch eine feinporige Glasfritten-

Filterkerze vom Arbeitselektrodenkompartiment abgetrennt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass der Separator über einen längeren Zeitraum bei hohen Temperaturen und niedrigem pH-Wert funktionstüchtig bleibt. Dies schien beim Einsatz einer PEM nicht sichergestellt zu sein, da gezeigt werden konnte, dass deren Leitfähigkeit durch hohe Temperaturen wie z.B. beim Autoklavieren beeinträchtigt werden könnte (Alberti & Narducci, 2009). Ferner musste auch beim Gegenelektrodenkompartiment der Verdunstungsproblematik begegnet werden. Die Glasfritte diente aufgrund ihrer Porengröße hierbei nur als Separator gegenüber den im Arbeitselektrodenkompartiment befindlichen Organismen. Das Kulturmedium hingegen konnte frei diffundieren und diente somit auch als Elektrolyt im Gegenelektrodenbereich. Je nach Anwendung und dem daraus resultierenden Gegenelektrodenpotential, kann es an der Gegenelektrode zudem zur Wasserspaltung kommen. Aus diesen zwei Gründen schien die Möglichkeit eines Nachströmens von Elektrolyt in das, im Verhältnis sehr kleine, Gegenelektrodenkompartiment in diesem Anwendungsgebiet von Vorteil zu sein.

Dennoch ergaben sich auch Nachteile dieser Anordnung. So kann das Kulturmedium, wie schon erwähnt, frei zwischen beiden Kompartimenten diffundieren, was je nach Anwendung zu Problemen führen kann. Als Beispiel wäre eine Kultivierung strikt anaerober, potentiell elektrotropher Organismen zu nennen, die durch den an der Gegenelektrode, im Falle eines Wasserspaltungsprozesses, entstehenden Sauerstoff gehemmt würden. Weiterhin kann auch eine unspezifische, nicht mit dem untersuchten Organismus in Verbindung stehende, Reduktion bzw. Oxidation von Redoxshuttles an der Gegenelektrode erfolgen. Dies würde zu einem erhöhten Hintergrundstrom führen. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Größe der Gegenelektrode durch die Platzierung in der Filterkerze limitiert war. Wie schon erwähnt, erfolgt die Steuerung des Arbeitselektrodenpotentials über die Polarisierung der Gegenelektrode (Metrohm Autolab B.V, 2011). Aufgrund der großen Oberflächendifferenz zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode liegen, je nach Regelbedarf, verhältnismäßig hohe Potentiale (je nach Anwendung positiv oder negativ) an der Gegenelektrode an. Dadurch kann es zu unerwünschten elektrochemischen Reaktionen kommen, bei denen für die verwendeten Organismen potentiell toxische Substanzen, wie z.B. elementares Chlor (Cl_2/Cl^- ; $E^0 = +1,396 \text{ V}$) entstehen (Bratsch, 1989).

Abgesehen von den konzeptionsbedingten Nachteilen, gab es auch noch zwei konstruktionsbedingte Probleme. So war die Kontaktierung der Arbeits- und der Gegenelektrode mittels eines Platindrahtes nicht robust genug, was z.T. zum Abbruch von Experimenten führte. Weiterhin war die Positionierung der Arbeits- und Bezugslektrode

zueinander, aufgrund einer nichtvorhandenen Bezugselektrodenhalterung, nicht konstant. Dadurch schwankte deren Abstand und somit auch die Größe des unkompensierten Widerstands.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass bei dieser M3C trotz einiger konzeptioneller wie konstruktiver Nachteile die Vorteile bei vielen Anwendungen überwiegen. Vor allem im höheren Temperaturbereich hat sich die Konstruktion, wie durch die oben erwähnten wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt werden konnte, bewährt. Aufgrund der angeführten Probleme schien es jedoch sinnvoll eine weitere, kleinere Version dieser M3C zu entwickeln. Dabei sollten durch konzeptionelle, wie konstruktive Anpassungen einige der zuvor beschriebenen Nachteile für bestimmte Anwendungen beseitigt werden. Dies wird im Folgenden dargestellt.

1.1.2 Mikrobielle 3-Elektrodenzelle mit 280 ml Arbeitsvolumen (Version B)

Die im zweiten Schritt entwickelte M3C mit einem Arbeitsvolumen von 280 ml, basierte vom Grundkonzept her auf der ersten Version. So baute auch diese auf einem, nun kleineren, Glaszylinder auf, welcher erneut mit einem abnehmbaren, über verspannen fixierbaren, Kunststoffdeckel versehen war. Mit einer deutlichen Verkleinerung des Arbeitsvolumens, erfolgte auch eine Reduzierung der Deckelgröße. Dadurch konnten nur noch Messungen mit einer einzelnen 3-Elektroden-Anordnung durchgeführt werden. Wie auch schon zuvor, bestand die Möglichkeit Gase zuzuführen und über weitere Anschlüsse eine Beprobung, oder den Anschluss von weiteren Peripheriegeräten vorzunehmen. Auch hier konnte die Zelle mittels eines Magnetrührstabes aktiv und definiert durchmischt werden.

Die erste Veränderung gegenüber der ersten Version betraf das Arbeitsvolumen. Durch dessen deutliche Verkleinerung bei gleichzeitiger Erhöhung der geometrisch zugänglichen Arbeitselektrodenfläche, konnte das Verhältnis des Zellenvolumens zur Arbeitselektrodenfläche deutlich verringert werden. Folglich ist diese Version der M3C für Anwendungen, die neben einem indirekten auch maßgeblich auf einen direkten EET angewiesen sind, deutlich besser geeignet. Weiterhin konnte durch die Verkleinerung des Arbeitsvolumens auch die Menge an benötigtem Kulturmedium und an benötigten Vorkulturen reduziert werden. Auch der Platzbedarf dieser M3Cs fiel deutlich geringer als bei der ersten Version aus.

Eine weitere wichtige Veränderung betraf die Gestaltung des Arbeits- und Gegenelektrodenhalters sowie des Gegenelektrodenkompartiments. Neben der schon

erwähnten Vergrößerung der zugänglichen Oberfläche, wurde auch die Installation der Arbeitselektrode im Deckel über einen neuen Halter optimiert. Dieser bietet zum einen eine verlässliche Fixierung der Elektrode und zum anderen eine deutlich verbesserte Form der Elektrodenkontaktierung über einen Edelstahlstromsammeler. Weiterhin ist in diesem Zuge auch die Abdichtung des Halters gegenüber der Zelleumgebung verbessert worden. Auch der Gegenelektrodenhalter konnte deutlich optimiert werden. Zum einen wurde die Kontaktierung der Elektrode über eine robuste Verspannung des Platindrahtes verbessert. Zum anderen wurde die geometrische Fläche der Gegenelektroden im Vergleich zur ersten Version verdoppelt, was im Bezug auf die Arbeitselektrodenfläche sogar einer relativen Vervierfachung entspricht. Daher sollte die oben erwähnte, für die Steuerung des Arbeitselektrodenpotentials benötigte, Gegenelektrodenpolarisierung deutlich niedriger ausfallen. Dies würde in der Folge auch zu einer geringeren Generierung potentiell toxischer Substanzen führen. Weiterhin wurde der verbesserte Halter in ein neues Gegenelektrodenkompartiment integriert. Auch bei diesem wurde die Installation im Zellendeckel optimiert. Weiterhin erfolgte die Abtrennung der beiden Kompartimente über eine am Gegenelektrodenkompartiment verspannte PEM. Zwar konnte auch für diese Art des Separators ein Massentransport von Acetat und Sauerstoff nachgewiesen werden, jedoch scheint dieser deutlich geringer als jener für die 2000 ml M3C beschriebene Glasfritte zu sein (Kim *et al.*, 2007). Daher sollte die abiotische Reduktion bzw. Oxidation potentieller Redoxshuttles sowie die Entstehung von Sauerstoff an der Gegenelektrode einen deutlich geringeren Einfluss auf das Arbeitselektrodenkompartiment haben. Die verbesserte Abtrennung hatte jedoch auch einen Nachteil. So war die Elektrolytmenge durch das fehlende Nachströmen in das Kompartiment limitiert, wodurch im Falle eines Wasserspaltungsprozesses an der Gegenelektrode ein Nachfüllen des Elektrolyten von außen nötig war. Durch die verbesserte Installation der Arbeits- und Gegenelektrode in den Deckel, konnte zusammen mit einem speziellen Bezugselektrodenhalter auch die zuvor erwähnte Problematik der schwankenden Elektrodenabstände beseitigt werden. Auch die Abdichtung der verschiedenen, eingeschraubten Elemente gegenüber dem Deckel wurde durch den Einsatz zusätzlicher Dichtungen verbessert.

Trotz dieser vielen erfolgreichen Optimierungsmaßnahmen, konnten bei manchen Anwendungen auch einige wenige Nachteile identifiziert werden. So war für Experimente unter strikt anoxischen Bedingungen eine kontinuierliche Begasung mit sauerstofffreiem Inertgas nötig, um eine Diffusion von Sauerstoff durch den Kunststoffdeckel in den Zellinnenraum zu verhindern. Bei einem Experiment, bei welchem beispielsweise die Menge

und die Zusammensetzung von, in der Zelle entstehendem, Gas bestimmt werden soll, ist das Zuführen von Inertgas jedoch nicht möglich. Daher kann in diesem Fall die Diffusion von Sauerstoff einen unerwünschten Einfluss auf das Experiment haben. Dieses Problem konnte im Vergleich zur ersten Version nicht behoben werden. Weiterhin war für Anwendungen, die viele Peripheriegeräte erforderten, die Anzahl der noch frei verfügbaren Zugänge im Deckel i.d.R. zu gering. Ein weiteres Problem war, dass die Reinigung der aus PTFE gefertigten Elektrodenhalter nach einem abgeschlossenen Experiment sich teilweise als schwierig erwies. So war eine vollständige Entfernung von verschiedenen, zugesetzten Redoxshuttles, wie z.B. Methylenblau, kaum möglich.

Insgesamt stellt die entwickelte 280 ml M3C für die meisten Anwendungen trotz der beschriebenen Probleme eine klare Verbesserung gegenüber der ersten Version dar. So wurde diese Zelle in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten verwendet und ist im Forschungsbetrieb (Abteilung für angewandte Biologie, KIT) nach wie vor täglich in Gebrauch (Bursać, 2015; Prokhorova *et al.*, 2016, in revision).

1.2 Entwicklung eines BES für die Abwasserbehandlung

Das in dieser Arbeit entwickelte BES für die Abwasserbehandlung folgte einem Konzept, das eine möglichst lange Prozessierstrecke des Abwassers mit einer geringen Grundfläche verband. Daher wurde eine mäanderförmige Grundstruktur gewählt, bei der zunächst das Anoden- und im Anschluss das Kathodenkompartiment mit Abwasser durchströmt wurde. Dabei waren die Seitenwände über die gesamte Strecke der Struktur mit Elektrodenmaterial versehen, um die nutzbare Elektrodenfläche sowohl im Anoden- wie Kathodenbereich zu maximieren. Die dichte Anordnung der Elektroden war nur möglich mithilfe spezieller Elektrodenhalter. Diese erlaubten trotz des eingeschränkten Bauraums eine einfache Fixierung des Elektrodenmaterials entlang der Mäanderstruktur. Weiterhin war der Grundkörper durch einen abnehmbaren Deckel verschließbar. Dieser enthielt verschiedene Zugänge, die für die Beprobung, die Begasung sowie die Druckentlastung des Systems vorgesehen waren. Verspannt wurde der Deckel über einen externen Rahmen aus Aluminiumprofilen.

Zum besseren Verständnis des Systems soll zunächst auf dessen theoretische Funktionsweise eingegangen werden. Im zuerst durchströmten, anoxischen Anodenbereich sollten maßgeblich drei Prozesse erfolgen: Dies war vor allem die Interaktion exoelektrogener Organismen mit der Anode, wobei eine elektrodengekoppelte Oxidation von im Abwasser vorhandenen

Kohlenstoffverbindungen stattfinden sollte. Das nutzbare Substratspektrum vieler dieser Organismen ist unter diesen Bedingungen weitgehend auf Fermentationsendprodukte beschränkt (Lovley *et al.*, 2004). Daher sind Fermentationsprozesse durch weitere, im Abwasser vorhandene Organismen, für die Bereitstellung von Substraten, wie Laktat oder Acetat, entscheidend. Ein dritter möglicher Prozess wäre die Definitrifikation, welche unter anoxischen Bedingungen durch die Oxidation organischer Kohlenstoffverbindungen erfolgen kann. Dabei muss erwähnt werden, dass die gemessene Konzentration an Nitrat und Nitrit im Zulauf des BES am später geplanten Standort (Klärwerk Emschermündung) recht gering war (siehe Analyse Ablauf Vorklärung, Kapitel VII, Abschnitt 3), wodurch dieser Prozess nur in geringem Maße ablaufen sollte.

Nach dem Durchfließen des Anodenkompartimentes folgte das Kathodenkompartiment. In dieses wurde in regelmäßigen Abständen Druckluft eingeblasen, was die Schaffung von oxischen und mikro- bis anoxischen Bereichen in diesem Kompartiment ermöglichen sollte. Dabei wechseln sich diese Bereiche entlang der Mäanderstruktur ab, was in der Theorie folgende Reaktionen ermöglicht: In den oxischen Teilbereichen sollte zum einen die Sauerstoffreduktion an der Kathode erfolgen. Zum anderen war auch die Oxidation nicht vergärbare Kohlenstoffverbindungen durch aerobe Stoffwechselprozesse von großer Bedeutung. Neben diesen Prozessen sollte in diesem Schritt vor allem auch eine Nitrifikation reduzierter Stickstoffverbindungen erfolgen. Die mikro- bis anoxischen Bereiche waren für die Denitrifikation vorgesehen. Hierbei sollte die Kathode als Elektronendonator dienen, was auch schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Gregory *et al.*, 2004; Clauwaert *et al.*, 2007). Der Einfluss der theoretisch ebenfalls an der Kathode ablaufenden Sauerstoffreaktion ist hierbei jedoch unklar. So liegt das theoretische Kathodenpotential der Sauerstoffreduktion ($E'_0[\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}] = +820 \text{ mV vs. SHE}$) im Vergleich höher als das der Nitratreduktion ($E'_0[\text{NO}_3^-/\text{N}_2] = +750 \text{ mV vs. SHE}$) (Rabaey & Rozendal, 2010). Sollte sich daher aufgrund der Sauerstoffreaktion ein höheres Kathodenpotential einstellen, könnte in diesem Fall eine kathodenabhängige Denitrifikation nicht erfolgen. Da auch in diesen Bereichen des BES wahrscheinlich weiterhin verwertbare, organische Kohlenstoffverbindungen für eine konventionelle Denitrifikation zur Verfügung stehen, sollte hier eine Entfernung von Nitrat und Nitrit aus dem Abwasser dennoch möglich sein.

Das hier beschriebene BES wurde, wie zuvor erwähnt, aus einer Vorgängerversion entwickelt, wobei viele konstruktive, wie konzeptionelle Probleme dieses ersten Systems gelöst werden sollten. Neben einer deutlichen Verbesserung der Benutzerfreundlichkeit, war

ebenso eine Verbesserung der Beprobungsmöglichkeiten von großem Interesse. Aufgrund der konstruktiven Komplexität des Systems sollte auch der Produktionsaufwand verringert werden, was durch die Verwendung möglichst vieler Gleichteile gelöst wurde. Im Folgenden soll auf die einzelnen Bereiche des BES und deren Optimierungen eingegangen werden.

Zunächst sollte der Einsatz der Mäanderstruktur vereinfacht und effizienter gestaltet werden. Diese Art der Struktur kam bei BES-Anwendungen zur Abwasserbehandlung bisher erst einmal zum Einsatz (Min & Logan, 2004). Das in dieser Arbeit beschriebene Konzept unterschied sich bezüglich der Anordnung von Anode und Kathode, sowie des Durchflussprinzips und des Separators deutlich diesem ersten Ansatz. Der größte grundlegende Vorteil einer solchen mäanderförmigen Struktur ist, dass man eine geringe Grundfläche benötigt und eine, im Verhältnis dazu, lange Flusstrecke des Abwassers entlang eines Elektrodenkanals verwirklichen kann. Dabei wird durch eine dichte Staffelung der einzelnen Elektrodenabschnitte ein, im Verhältnis, kleines Abwasservolumen pro Elektrodenfläche geschaffen. Dies sollte in diesem Fall elektrodenabhängige, zur Behandlung des Abwassers beitragende Prozesse begünstigen. Von der konstruktiven Seite her wurde diese dichte Elektrodenanordnung über die beschriebenen einhäng- und einsteckbaren Elektrodenhalter verwirklicht.

Wie schon erwähnt wurde in dieser Anordnung zunächst das Anoden- und im Anschluss das Kathodenkompartiment durchflossen. Ein Grundproblem dieser Anordnung ist der sehr große Abstand zwischen Anoden- und Kathodenbereich. Dies ist im Besonderen deshalb kritisch, weil die Leitfähigkeit von kommunalem Abwasser i.d.R. relativ gering ist und daher per se schon zu hohen ohmschen Verlusten führt (Rozendal *et al.*, 2008). Um dieses konzeptionelle Problem zu verringern wurden fünf Bereiche in der Trennwand zwischen Anoden- und Kathodenbereich eingefügt, die mit einem Separator aus Glasfrittenplatten versehen waren. Durch diese Verbindungen sollte der Abstand von Anode und Kathode verringert und somit der Ladungstransport zwischen den Kompartimenten verbessert werden. Weiterhin schien dieses Material für einen Einsatz im Abwasser besser geeignet zu sein als eine PEM, da für letztere eine verstärkte Neigung zu Faulungsprozessen über die Zeit gezeigt werden konnte (Xu *et al.*, 2012). Neben der Langzeitstabilität spielten auch die höheren Kosten bei einer möglichen späteren Hochskalierung des Systems eine Rolle, was für die Verwendung des gesinterten Glasfrittenmaterials sprach. Dennoch mussten auch ein paar Nachteile dieses Materials in Kauf genommen werden. So stellt dieser Separator, für die löslichen Bestandteile des Abwassers ($<0,5 \mu\text{m}$) nur eine eingeschränkte Diffusionsbarriere dar. Aus diesem Grund ist es in der Folge möglich, dass weitgehend unbehandeltes Abwasser vor allem am Anfang

der Trennwand über die Separatorfenster in den Kathodenbereich übertritt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Sauerstoff von der Kathodenseite in den Anodenbereich diffundiert. Diese freie Diffusion kann sowohl Vor- als auch Nachteile haben: So kann einerseits durch das Übertreten von unbehandeltem Abwasser in den Kathodenraum zwar zusätzlicher organischer Kohlenstoff für eine Denitrifikation bereitgestellt werden, andererseits würde die gesamte Reinigungsleistung durch die deutlich verkürzte Behandlungsstrecke dieses Abwasseranteils absinken. Weiterhin würde der zusätzliche Sauerstoff im Anodenkompartiment zwar eine Nitrifikation zulassen, aber gleichzeitig auch als alternativer Elektronendonator für die Organismen im Anodenbereich dienen, was die Effizienz der Anodenreaktion negativ beeinflussen würde. Auch das Zellwachstum könnte durch den verfügbaren Sauerstoff in diesem Bereich höher ausfallen, was zu einer Verringerung der Permeabilität des Separators führen würde.

Neben den eingefügten Separatorfenstern, stellte auch die Art der Zuführung von Sauerstoff im Kathodenkompartiment einen wichtigen Bereich dar. So sollte, wie schon erwähnt, durch punktuellen Einblasen von Druckluft ein Sauerstoffgradient in jedem Mäandersegment des Kathodenkompartiments erzeugt werden. Durch diesen Gradienten sollten die zuvor, in diesem Zusammenhang, beschriebenen Reaktionen begünstigt werden. Was zu einem Vorteil im Bezug auf die Eliminierung von Stickstoffverbindungen führen kann, ist gleichzeitig ein Nachteil für die Sauerstoffreaktion an der Kathode und somit deren Leistungsfähigkeit. Dabei ist durch die punktuelle Begasung nur ein Bruchteil der Kathodenoberfläche optimal mit Sauerstoff versorgt und diese folglich im Verhältnis zur Anodenfläche zu klein. Dies kann zu einer Limitierung der Gesamtleistung des Systems führen. Aus diesem Grund konnte das BES nicht nur als MFC, sondern auch als M3C betrieben werden. So konnte eine mögliche Limitierung der Kathode zunächst verhindert werden, um optimale Bedingungen für das Anodenkompartiment in einer ersten Konditionierungsphase zu schaffen.

Trotz dieser vereinzelt, konzeptionellen Probleme stellt das hier entwickelte BES einen großen Fortschritt gegenüber der ersten Version dar. Es konnte neben der Handhabung auch die Elektrodendichte, der Ladungstransport und die Beprobung verbessert werden. Dennoch gibt es auch bei dieser Konstruktion Raum für Verbesserungen. So konnte die Abdichtung des Deckels nicht optimal gelöst werden. Weiterhin war auch PMMA als Fertigungsmaterial ungeeignet, da es bei Kontakt mit Alkoholen zur Rissbildung neigt.

Im nächsten Abschnitt wird auf die Charakterisierung des entwickelten BES für die Abwasserbehandlung in den zuvor beschriebenen Versuchsphasen eingegangen und die Funktionsfähigkeit des Systems anhand der zugehörigen Ergebnisse diskutiert.

2 Charakterisierung des entwickelten BES für die Abwasserbehandlung

Im nächsten Schritt erfolgte die Charakterisierung des zuvor entwickelten BES für die Abwasserbehandlung, wobei verschiedene Parameter wie die Stromdichte oder der Abbau von organischen Kohlenstoffverbindungen durch das System bestimmt wurden. Dies wurde in zwei Versuchsphasen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Überprüfung der prinzipiellen Funktionalität im Labor, bei der synthetisches Abwasser als Substrat diente. Im zweiten Schritt folgte eine Erprobung des BES unter realitätsnahen Bedingungen im Klärwerk Emschermündung.

2.1 Charakterisierung der ersten Betriebsphase mit synthetischem Abwasser

Nachdem das vorbereitete und angeschlossene BES mit den, zuvor am späteren Standort isolierten, potentiell exoelektrogenen Stämmen inkubiert war, wurde das System im 3-Elektrodenmodus in Betrieb genommen. Ein stabiles Anodenpotential sollte dabei in dieser ersten Versuchsphase der Schaffung optimaler elektrochemischer Bedingungen für diese Organismen dienen, um einen stabilen Anodenprozess zu etablieren. Dabei wurden in regelmäßigen Abständen die Stromdichte, die TOC- sowie TN-Konzentration und der pH-Wert bestimmt. Die Messungen der letzten drei Größen erfolgten dabei an drei verschiedenen Stellen des BES: am Zulauf, nach der Anode und nach dem Durchlaufen des gesamten Reaktors. Die Einordnung der verschiedenen Messgrößen wie z.B. die erreichte Stromdichte im Vergleich zu anderen Systemen, erscheint kompliziert, da die bisher publizierten BES im Bereich der Abwasserbehandlung sich in enorm vielen Parametern unterscheiden. Dies betrifft beispielsweise den elektrochemischen Betriebsmodus (MFC, MEC, M3C), die verwendeten Elektrodenmaterialien und -formen, das Elektrodenflächenverhältnis, die Retentionszeiten oder das verwendete Separatormaterial. Dennoch soll im Folgenden eine Einordnung des entworfenen Systems erfolgen.

Zunächst soll die erreichte Stromdichte betrachtet werden. Diese stieg zu Beginn des Versuches schnell an und pendelte sich im weiteren Verlauf des Versuchs im Bereich der mittleren Stromdichte von $43,44 \text{ mA/m}^2$ ein (Abb. 39). Dies weist auf eine schnelle Etablierung eines stabilen Anodenprozesses hin. Hierbei stellte sich die Frage, ob die hinzugefügten Isolate neben den ebenfalls zugegebenen, exoelektrogenen Modellorganismen (*S. oneidensis* & *G. sulfurreducens*) eine Rolle in diesem Prozess spielen. Bei der Isolierung

dieser Stämme diene Eisencitrat als alleiniger Elektronenakzeptor (Stefanie Epple, unveröffentlicht). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Eisencitrat, zumindest bei *S. oneidensis*, nur außerhalb der Zelle reduziert werden kann (Clemens Bücking *et al.*, 2010). Daher scheinen diese Isolate in der Lage zu sein, Elektronen aus dem Metabolismus über die Zellgrenzen hinweg in ihre Umgebung übertragen zu können. Weiterhin wurde zumindest für einige Gattungen der Isolate, wie z.B. *Clostridium*, schon eine Verwendung in MFCs gezeigt, wobei hierbei z.T. auch Redoxshuttles beteiligt waren (Du *et al.*, 2007). Folglich könnten diese Isolate auch am Anodenprozess beteiligt sein und so zur gemessenen Stromdichte beitragen. Gegenüber einem, bezüglich der Betriebsmodi vergleichbarem System (erst synthetisches, dann reales Abwasser; 3-Elektrodenmodus) konnten nur 6 % der Stromdichte erreicht werden (Keith *et al.*, 2014). Dabei muss jedoch angemerkt werden, dass dieses BES mit einem Anodenpotential von +397 mV vs. SHE betrieben wurde und weiterhin über eine große PEM-Fläche verfügte. Durch diese wurde das Kathodenkompartiment, welches nicht mit Abwasser durchströmt wurde, abgetrennt. Weiterhin wurde dieses BES mit einem synthetischen Abwasser mit höherer Leitfähigkeit betrieben, was zusammen mit dem deutlich höheren Anodenpotential und dem besseren Ladungstransport die im Verhältnis deutlich höhere Stromdichte erklären könnte.

Weiterhin wurde der zeitliche Verlauf der TOC-Konzentration gemessen (Abb. 40). Hierbei zeigten die Werte des Zulaufs überraschenderweise schwankende Werte. So sollte das synthetische Abwasser aufgrund seiner festen Zusammensetzung immer einen annähernd identischen TOC-Gehalt aufweisen. Da jedoch durch das Autoklavieren die Volumina der verschiedenen Abwasserchargen leicht schwankten, war in der Folge die TOC-Konzentration des Zulaufs nicht konstant. Weiterhin lag der mittlere gemessene TOC des Zulaufs rund 1/3 höher als der theoretisch errechnete TOC des synthetischen Abwassers. Dieser war ursprünglich an der durchschnittlichen Gesamtkonzentration von gebundenem Kohlenstoff im Ablauf der Vorklärung am späteren Standort orientiert (siehe Analytik Ablauf Vorklärung, Kapitel VII Abschnitt 3). Dieses Phänomen konnte auch schon in einer vorangegangenen Arbeit beobachtet werden (Klessing, 2015).

Nach dem Anodenkompartiment konnte im Mittel 26,4 % des im Abwasser enthaltenen organischen Kohlenstoff eliminiert werden. Die Eliminierungsleistung war dabei über einen weiten Zeitraum der Messung relativ konstant. In diesem Teil des BES stellte die Anode den größten und wichtigsten Elektronenakzeptor dar. Da weiterhin die Generierung der Stromdichte mit der Abnahme der TOC-Konzentration und somit der Oxidation des Elektronendonors korrelierte, scheint die mit einem exoelektrogenen Prozess in Verbindung

zu stehen. Nach dem Durchlaufen des Kathodenkompartiments konnte im Vergleich zum vorherigen Probenpunkt eine weitere TOC-Eliminierung nachgewiesen werden, die mit 13,01 % jedoch nur noch halb so hoch ausfiel. Im Kathodenkompartiment können in der Theorie weitere organische Kohlenstoffverbindungen über eine aerobe Atmung sowie einen Denitrifikationsprozess oxidiert werden. Da die Kathodenreaktion jedoch ebenfalls sauerstoffabhängig ist, könnte die Menge an zugeführten Sauerstoff für beide Reaktionen nicht ausreichen und somit die aerobe TOC-Eliminierung limitiert sein. Insgesamt konnte somit nur eine Eliminierung von etwa 39,41 % der im Zulauf vorhandenen organischen Kohlenstoffverbindungen erreicht werden. Im Vergleich zu dem schon zuvor erwähnten, ebenfalls mit synthetischen Abwasser betriebenen System, fiel die hier erreichte Eliminierung deutlich geringer aus. So konnte in jener Arbeit ein Substratverbrauch von 98 % alleine im Anodenkompartiment erreicht werden (Keith *et al.*, 2014). Dabei muss jedoch angemerkt werden, dass es sich in diesem Fall um Rezykulationssystem handelte, welches eine deutlich höhere, durchschnittliche Retentionszeit ermöglichte. Somit könnte eine bessere TOC-Eliminierung im in dieser Arbeit entwickelten System scheinbar durch eine Verlängerung der Retentionszeit erreicht werden. Da jedoch eine Erhöhung der Retentionszeit des Abwassers zu einer starken Verschiebung der pH-Werte zwischen Anode und Kathode in den ersten Vorexperimenten führte, konnte die Problematik durch diese Maßnahmen nicht gelöst werden.

Nachdem die grundlegende Funktionalität des BES in Bezug auf die Generierung von Strom und die Eliminierung von organischen Kohlenstoffverbindungen gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt auf die TN-Eliminierung eingegangen (Abb. 41). So zeigte die TN-Konzentration des Zulaufs ebenfalls eine Fluktuation. Der Gründe hierfür waren, wie schon zuvor beschrieben, die Volumenschwankungen der verschiedenen Chargen des synthetischen Abwassers. Weiterhin konnte nach dem Durchlaufen des Anodenkompartiments, entgegen den Erwartungen, eine leichte Abnahme der mittleren TN-Konzentration gegenüber dem Ausgangswert um 10,1 mg/l festgestellt werden. Da sich der TN des synthetischen Abwassers ausschließlich aus zugesetztem oder bei einer Desaminierung von Aminosäuren freigesetztem Ammonium zusammensetzte, muss für dessen Eliminierung zunächst eine Nitrifikation erfolgen. Diese sollte im Anodenkompartiment aus folgenden Gründen eigentlich nicht möglich sein: So wurde das System initial nur mit Organismen inokuliert, die eigentlich nicht zu einer Nitrifikation befähigt sind. Weiterhin wurde eine für die Stickstoffeliminierung benötigte Denitrifikation bei diesen Organismen nur für *G. sulfurreducens* gezeigt, wobei diese an eine Kathode als Elektronendonator gebunden war (Clauwaert *et al.*, 2007). Zusätzlich

ist im Anodenkompartiment kein oder nur im geringen Maße Sauerstoff vorhanden, was ebenfalls gegen einen Nitrifikationsprozess spricht. Um dieses Phänomen besser verstehen zu können wäre die Zusammensetzung des TNs nach dem Anodenkompartiment von Bedeutung. Da diese jedoch nicht bestimmt wurde, bleibt eine weitere Interpretation dieser Daten schwierig. Nach dem Durchlaufen des Kathodenkompartiments waren die gemessenen TN-Werte stark schwankend und lagen mit 124,1 mg/l im Mittel sogar leicht über dem Ausgangswert. Somit konnte in diesem Fall im Durchschnitt keine Eliminierung von Stickstoff gegenüber dem Zulauf festgestellt werden. Ein Grund für die fehlende TN-Eliminierung in diesem Kompartiment könnte hierbei das schon zuvor erwähnte Fehlen eines nitrifizierenden Organismus bei der Inokulation sein. Weiterhin wäre eine Denitrifikation durch *G. sulfurreducens* an der Kathode, wie zuvor beschrieben, theoretisch möglich. Aufgrund des M3C-Modus könnte das gesteuerte Kathodenpotential für diese Reaktion hierbei jedoch zu hoch liegen (Clauwaert *et al.*, 2007). Insgesamt konnte folglich nach dem Durchlaufen des gesamten Systems im Mittel keine Eliminierung von Stickstoff nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf eine fehlende Nitrifikation zurückzuführen ist.

Abschließend sollte noch die zeitliche Entwicklung der pH-Werte in verschiedenen Bereichen des BES betrachtet werden (Abb. 42). So waren diese im Zulauf im Bereich von 7,98 bis 8,53 ebenfalls leicht schwankend. Nach dem Durchfließen des Anodenkompartiments waren die Werte weitgehend im leicht sauren Bereich und stabilisierten sich gegen Ende des Experiments (5,81 bis 6,5). Dies entsprach den Erwartungen, da es bei der Anodenreaktion in der Theorie zu einer Freisetzung von Protonen kommt (Logan *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2007). Weiterhin wurde nach dem Durchlaufen des gesamten BES in einer ersten Phase Werte im Bereich des Zuflusses gemessen, die anschließend auf ein mittleres Niveau von 7,52 sanken. Da bei der Reduktion von Sauerstoff an der Kathode für die Bildung von Wasser Protonen benötigt werden, ist damit ein Anstieg des pH-Wertes verbunden. Dies konnte auch in diesem Fall beobachtet werden. Somit liegt der pH-Wert des Abwassers nach der Behandlung in diesem BES nahe des neutralen pH-Bereichs, wodurch weitere Nachbehandlung nicht nötig sein sollte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Eliminierung von organischen Kohlenstoffverbindungen in dieser Versuchsphase erreicht wurde. Dabei war die Abhängigkeit dieses Prozesses von exoelektrogenen Organismen sehr wahrscheinlich. Weiterhin konnte in dieser Versuchsphase im Mittel keine Stickstoffeliminierung nachgewiesen werden. Da der Fokus in dieser Phase auf der Etablierung einer stabilen

elektrochemischen Anodenreaktion lag, war die fehlende TN-Eliminierung hierbei zunächst von untergeordneter Bedeutung. Zudem sollte in der nächsten Versuchsphase reales Abwasser zum Einsatz kommen. Dadurch werden weitere Organismen in das System zugeführt, was zur Lösung dieser Problematik beitragen sollte. Die Entwicklung des pH-Wertes hingegen verlief in dieser Versuchsphase wie erwartet. Somit konnte die prinzipielle Funktionalität des Systems zumindest für eine TOC-gekoppelte Generierung von elektrischem Strom gezeigt werden.

2.2 Charakterisierung der zweiten Betriebsphase mit kommunalem Abwasser

In der zweiten Versuchsphase wurde das BES im Technikum der EMG im Klärwerk Emschermündung reinstalled. Dabei diente fortan der Überlauf der Vorklärung als Substrat. Auch in dieser Versuchsphase wurde das BES als M3C betrieben, um eine möglichst schnelle Anpassung des Systems an die neuen Umgebungsbedingungen zu ermöglichen. Wie bereits zuvor wurden hier ebenfalls die Stromdichte, die TOC- sowie die TN-Konzentrationen und der pH-Wert an den drei beschriebenen Punkten gemessen.

Die Stromdichte zeigte über den gesamten Versuchsverlauf eine deutlich stärkere Schwankung, als in der ersten Versuchsphase (Abb. 43). Dennoch konnte die mittlere Stromdichte im Vergleich um das 3,8-fache auf 165,09 mA/m² gesteigert werden. Ein Grund hierfür könnte die andere Zusammensetzung des zugeführten Abwassers gegenüber der ersten Phase sein. So könnte der Anteil an, für die exoelektrogenen Organismen nutzbaren, Substraten, wie z.B. Lactat oder Acetat, größer sein (Lovley *et al.*, 2004). Weiterhin variierten neben der Zusammensetzung auch der pH-Wert und die Leitfähigkeit des zugeführten Abwassers, was die starken Schwankungen der Stromdichte erklären könnte. Um die Verbesserung der, in dieser Versuchsphase erreichten, mittleren Stromdichte einordnen zu können, bietet sich erneut ein Vergleich mit dem schon oben erwähnten System an. Auch dieses wurde in einer späteren Phase mit dem Überlauf des Vorklärbeckens eines kommunalen Klärwerks beschickt und ebenfalls als Durchflusssystem betrieben. Dabei wurden im Durchschnitt 360 mA/m² erreicht (Keith *et al.*, 2014). Somit konnte in dieser Versuchsphase der Unterschied der Stromdichten der beiden Systeme auf 50 % reduziert werden, was einer deutlichen Verbesserung des in dieser Arbeit entwickelten System unter realitätsnahen Bedingungen entspricht. Im letzten Drittel des Versuchs fällt die Stromdichte

auf ein niedrigeres Niveau ab. Um die Ursache für diesen Abfall zu erklären, muss zunächst der Verlauf des TOC betrachtet werden.

Der TOC-Gehalt des Zulaufs war, wie zu erwarten, über den gesamten Versuchsverlauf sehr schwankend, wobei die durchschnittliche TOC-Konzentration in den ersten zwei Dritteln der Versuchszeit mit 149,5 mg/l deutlich über der Konzentration des letzten Drittels lag (71,8 mg/l; Abb. 44). Hierbei schien eine Absenkung der mittleren TOC-Konzentration unter einen Wert von 87 mg/l, unabhängig von der Zulaufkonzentration, nicht möglich zu sein. Auch nach dem Durchlaufen des Kathodenkompartiments konnte nur eine weitere mittlere Eliminierung von 12,7 mg/l erreicht werden. Insgesamt konnte in dieser Versuchsphase somit eine mittlere TOC-Eliminierung von 49,81 mg/l erreicht werden, was etwa 40,2 % entspricht. Vergleichbare Systeme, die ebenfalls mit dem Überlauf der Vorklärung einer kommunalen Kläranlage beschickt und bei denen auch beide Elektrodenkompartimente mit Abwasser durchströmt wurden, zeigten bei den organischen Kohlenstoffverbindungen mit 25,8 bzw. 23,6 % niedrigere Eliminierungswerte (Ahn & Logan, 2010; Hiegemann *et al.*, 2016). Ein Grund für die beschränkte TOC-Eliminierung könnte zum einen erneut eine limitierte Verfügbarkeit von Sauerstoff in Kathodenkompartiment sein. Weiterhin könnte es sich um sehr schwer oxidierbare Kohlenstoffverbindungen handeln, die auch bei höheren Sauerstoffkonzentrationen und Verweilzeiten nicht degradiert werden können.

Im nächsten Schritt wurde die erreichte, mittlere TOC-Eliminierung der Labor- und Klärwerkphase miteinander verglichen (Abb. 47). Hierbei fällt auf, dass die absolute Eliminierung in der ersten Versuchsphase fast dreimal höher war, als in der zweiten Phase. Gleichzeitig war die Stromdichte in der zweiten Phase annähernd viermal so hoch, wie in der ersten Phase. Dies scheint, vor allem was den Anteil an TOC-Eliminierung im Anodenkompartiment betrifft, nicht zusammen zu passen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass aufgrund der partikulären Struktur des realen Abwassers, ein größerer Anteil des Gesamt-TOCs in der zweiten Versuchsphase nicht erfasst wurde, aber dennoch zur Generierung der erreichten Stromdichte beitrug. Weiterhin schien die Nutzbarkeit des, in der ersten Versuchsphase verwendeten, synthetischen Abwassers für die Organismen aufgrund einer höheren Eliminierung besser zu sein. Dies führte unter Umständen zu einer verstärkten Biomassebildung von Organismen, die bei der Nutzung dieses Substrats nicht oder nur eingeschränkt an der Anodenreaktion beteiligt sind. Lagern sich diese dennoch an der Anode an, würde einerseits deren TOC-Gehalt in der Flüssigphase nicht mitgemessen und andererseits die aktive Anodenfläche reduziert werden. Die prozentuale Eliminierungsleistung fiel in beiden Versuchsphasen hingegen sehr ähnlich aus, wobei deren anodenspezifischer

Anteil in der zweiten Phase höher war. Auch diese Verteilung stärkt die zuvor beschriebene These, dass das reale Abwasser ein besser nutzbares Substrat für die enthaltenen exoelektrogenen Organismen darstellte.

Im folgenden Abschnitt wird auf die TN-Eliminierung in der zweiten Versuchsphase eingegangen. So zeigte der Zulauf, wie zu erwarten, ebenfalls eine starke Schwankung der Einzelwerte, wobei die mittlere Konzentration über den Versuchsverlauf abnahm (Abb. 45). Die mittlere TN-Eliminierung nach dem Anodenkompartiment war mit 15,2 mg/l höher als in der ersten Versuchsphase. Durch das Zuführen von realem Abwasser bestand die Möglichkeit weitere, für einen Stickstoffabbau verantwortliche, Organismen in das System einzubringen. Somit könnte im Anodenkompartiment im Bereich der Separatorfenster Sauerstoff aus dem Kathodenbereich für eine Nitrifikation genutzt werden. Dies wäre jedoch nur möglich, wenn die lokale Konzentration an einem alternativen organischen Elektronendonator sehr gering wäre. Weiterhin könnte im Anschluss eine Denitrifizierung erfolgen, wodurch es zu einer Stickstoffeliminierung käme. Im Kathodenkompartiment wurde entgegen den Erwartungen wiederum kaum Stickstoff eliminiert (4,9 mg/l), obwohl durch die fortlaufende Inkubation mit Abwasser theoretisch Nitrifizierer und Denitrifizierer in das System eingebracht wurden. Weiterhin sollten, durch die in Abschnitt 1.2 beschriebene Konzeption, verschiedene Zonen im Kathodenkompartiment geschaffen werden, die mittels dieser Organismen eine TN-Eliminierung ermöglichen. Im Vergleich zur ersten Versuchsphase konnte hierbei immerhin eine geringe TN-Eliminierung erreicht werden, wobei diese deutlich niedriger als erwartet ausfiel. Das Problem einer geringen Stickstoffeliminierung konnte auch schon bei anderen Durchflusssystemen festgestellt werden. So zeigte ein ebenfalls mit dem Überlauf der Vorklärung einer kommunalen Kläranlage betriebenes BES mit einer niedrigeren Last an organischen Kohlenstoff auch nur eine TN-Eliminierung von weniger als 5 % (Ahn & Logan, 2010). Ein Grund hierfür könnte die Verhinderung einer Biofilmbildung von Nitrifizierern sein. So konnte zwar *Nitrosomonas europaea* in einem Konsortium von Organismen an einer Kathode schon nachgewiesen werden, allerdings handelte es sich hierbei nicht um eine M3C mit der Kathode als Steuerelement (Kim *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2012). Da an der Kathode in diesem Modus auch höhere Potentiale anliegen können, könnte dies einen negativen Einfluss auf das Wachstum dieser Organismen haben. Weiterhin ist die Verdopplungszeit von Nitrifizierer-Reinkulturen unter optimalen Bedingungen mit 8-35 h vergleichsweise hoch (Prosser, 2005). Da die Sauerstoffversorgung in vielen Bereichen der Kathode nicht optimal war, könnte dies die Verdopplungszeit weiter verlängert haben. Die Gründe für diese Sauerstofflimitierung könnten neben der Art der Belüftung und der abiotischen

Kathodenreaktion, weiterhin noch andere, schneller wachsende Organismen sein, die durch die immer noch hohe TOC-Konzentration ebenfalls Sauerstoff reduzieren. Wie auch schon bei der TOC-Eliminierung angemerkt könnte zudem die mit 9,3 h recht kurze theoretische hydraulische Verweildauer im Kathodenbereich ein weiterer Grund für die schlechte TN-Eliminierung sein.

Abschließend wurde erneut die zeitliche Entwicklung des pH-Wertes betrachtet (Abb. 46). Nach dem Durchfließen des gesamten BES, war dieser zunächst in den basischen Bereich verschoben und sank im Laufe des ersten Drittels des Experiments auf das schwach basische Niveau des Zulaufs ab (7,46). Ein Grund für diesen initialen Anstieg war wahrscheinlich die Adaptation des BES aufgrund der Umstellung auf reales Abwasser. So scheint in dieser Phase der Protonenumsatz an der Kathode höher gewesen zu sein, als die Generierung von Protonen im Anodenbereich.

Zusammenfassend kann Folgendes festgehalten werden: Das in dieser Arbeit entwickelte BES für die Abwasserbehandlung war in der Lage in beiden Versuchsphasen etwa 40 % der zugeführten organischen Kohlenstoffverbindungen zu eliminieren. Dabei wurde in beiden Fällen elektrischer Strom generiert, der in der zweiten Versuchsphase im Mittel um annähernd Faktor 4 gesteigert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte in ersten Phase kein und in der zweiten Phase sehr wenig Stickstoff eliminiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass dieses System auch unter realitätsnahen Bedingungen funktioniert, wobei vor allem die Stickstoffeliminierung des Systems weiter verbessert werden muss. Hierbei handelt es sich um das Hauptproblem des Systems, da das Kohlenstoff zu Stickstoff-Verhältnis des Abwassers grundsätzlich verschlechtert wird.

3 Generierung und Charakterisierung eines elektrotrophen *R. sphaeroides*-Stammes

Das Ziel des letzten Teils dieser Arbeit war die Erzeugung und Charakterisierung eines elektrotrophen *R. sphaeroides*-Stammes. Die Entscheidungsgrundlage für die Nutzung dieses Nichtschwefelpurpurbakteriums als Zielorganismus war dessen vielfältiger Stoffwechsel, dessen gute genetische Zugänglichkeit, dessen Fähigkeit *c*-Typ Cytochrome zu maturieren und dessen optional nutzbare, phototrophe Lebensweise. Der Ausgangspunkt für die Herstellung eines elektrotrophen Organismus war hierbei die heterologe Expression von

Teilen einer verlängerten Elektronentransportkette. Diese entstammten dem exoelektrogenen γ - Proteobakterium *S. oneidensis* MR1. Bei diesem Organismus konnte gezeigt werden, dass dessen verlängerte Elektronentransportkette prinzipiell auch in umgekehrter Richtung funktioniert, was auf eine generell bidirektionale Funktionalität aller, an diesem Elektronentransfer, beteiligten Elemente hinweist. Bei der Auswahl der beiden *c*-Typ Cytochrome waren zwei Kriterien entscheidend: Zum einen übernimmt CymA in *S. oneidensis* als universeller Eintrittspunkt für Elektronen ins Periplasma eine Schlüsselrolle und ist in der Lage eine große Zahl an verschiedenen Cytochromen zu reduzieren (Myers & Myers, 2000; Schwalb *et al.*, 2002; Schuetz *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2013). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass STC neben FccA ebenfalls eine sehr wichtige Rolle im Elektronentransfernetzwerk von *S. oneidensis* zu spielen scheint (Sturm *et al.*, 2015). Weiterhin zeigte ein Vergleich der Reduktionsraten von CymA gegenüber verschiedenen periplasmatischen Cytochromen, dass die Übertragung von Elektronen auf STC deutlich höher war, als jene auf FccA. Da STC zudem ein geringeres Molekulargewicht als FccA aufweist, wurde dieses als periplasmatisches Cytochrom ausgewählt (Sturm-Richter *et al.*, 2015). Daraufhin wurden diese beiden *c*-Typ Cytochrome in *R. sphaeroides* eingebracht, um deren Effekt auf die elektrotrophen Eigenschaften des Organismus zu untersuchen. Der erste Schritt hierbei war die molekularbiologische Integration der Elemente in *R. sphaeroides* und die anschließende Überprüfung der Expression dieser beiden Elemente in den erzeugten Mutanten. In der abschließenden bioelektrochemischen Charakterisierung sollte die Elektronenaufnahmekapazität der erzeugten Mutanten von einer Kathode gegenüber dem WT untersucht werden.

3.1 Einbringung und Expression EET-assoziiertes *c*-Typ Cytochrome in *R. sphaeroides*

Nachdem die vier, zuvor beschriebenen Expressionsplasmide generiert und in *R. sphaeroides* transformiert waren, wurde die Expression der beiden *c*-Typ Cytochrome in den vier resultierenden *R. sphaeroides*-Stämmen JG963 (pIND4-*cymA-stc*), J964 (pIND4-*cymA-stc*-His), JG965 (pPUC-*cymA-stc*) und JG966 (pPUC-*cymA-stc*-His) untersucht.

3.1.1 Expression von CymA und STC unter chemoorganoheterotrophen Bedingungen

Zunächst sollte überprüft werden, ob die beiden Cytochrome grundsätzlich in *R. sphaeroides* exprimiert werden können. Dabei wurden im ersten Schritt die Stämme JG582 (WT), JG963 und JG964 unter chemoorganoheterotrophen Bedingungen kultiviert und im Anschluss über eine Hämgruppenfärbung und einen Western-Blot analysiert. Dabei konnte in der Hämgruppenfärbung der Membranfraktion bei JG963 sowie JG964 im Bereich von 21 kDa je ein Signal detektiert werden, welches bei JG582 nicht nachweisbar war (Abb. 48a). Weiterhin zeigte der zugehörige Western-Blot ausschließlich bei JG964 ein Signal bei 21 kDa (Abb. 48b). CymA wäre als Cytoplasmamembranprotein in der Membranfraktion vorzufinden und weist ein theoretisches Molekulargewicht von 20,8 kDa auf. Daher kann bei beiden Stämmen von einer Expression von CymA ausgegangen werden. Weiterhin wurden bei der Hämgruppenfärbung bei allen Proben Signale im Bereich von 28 und 35 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich um weitere membrangebundene *c*-Typ Cytochrome oder Peroxidasen, die jedoch nicht weiter zugeordnet werden konnten.

Bei den Periplasmafraktionen konnte in der Hämgruppenfärbung für JG963 und J964 jeweils ein breites Signal im Bereich von 11-22 kDa nachgewiesen werden, welches bei JG582 nicht auftrat (Abb. 48a). Ein entsprechendes Signal wurde beim Western-Blot ausschließlich für JG964 nachgewiesen. (Abb. 48b). Wie schon erwähnt liegt das theoretische Molekulargewicht von STC bei 9,7 kDa. Da andere Arbeiten ebenfalls ein breites Laufverhalten von STC nachweisen konnten, scheint dieses charakteristisch für STC zu sein (Sturm-Richter *et al.*, 2015; Sturm *et al.*, 2015). Da JG963 und JG964 jeweils diese Art von Signal zeigten und JG964 ein entsprechendes, positives His-Tag Signal im Western-Blot aufwies, kann bei beiden Stämmen von einer Expression von STC ausgegangen werden. Weiterhin wurden bei der Hämgruppenfärbung bei allen Proben Signale im Bereich von 11 und 13 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich um periplasmatische *c*-Typ Cytochrome oder Peroxidasen, die jedoch auch hier nicht weiter zugeordnet werden konnten. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von CymA und STC in *R. sphaeroides* grundsätzlich möglich ist.

3.1.2 Expression von CymA und STC unter photoorganoheterotrophen Bedingungen

Der nächste Schritt war der Nachweis der beiden Cytochrome in JG963 und JG964 im Vergleich zu JG582 unter photoorganoheterotrophen Bedingungen. Diese wurden gewählt, um eine gegenüber der photolithoautotrophen Kultivierung vergleichsweise schnelle Anzucht der Zellen zu erreichen und die Expression des Photosyntheseapparates sicherzustellen. Dadurch sollte auch die Umstellung auf einen photolithoautotrophen Stoffwechsel im späteren Charakterisierungsversuch beschleunigt werden. Weiterhin wurde die Basalaktivität des bei diesen Stämmen verwendeten, IPTG-induzierbaren Promotors untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Hämgruppenfärbung und ein Western-Blot von induzierten und nicht induzierten Stämmen angefertigt.

Bei der Hämgruppenfärbung der Membranfraktion konnte bei den induzierten Proben von JG963 und JG964 jeweils ein Signal im Bereich des Molekulargewichts von CymA detektiert werden. Dies war bei JG582 und den nicht induzierten Proben der beiden Stämme nicht der Fall (Abb. 49a). Weiterhin zeigte der zugehörige Western-Blot ausschließlich bei der induzierten Probe von JG964 ein Signal im für CymA typischen Bereich (Abb. 50). Daher kann bei beiden induzierten Stämmen von einer CymA-Expression ausgegangen werden. Weiterhin wurden bei der Hämgruppenfärbung bei allen Proben schwache Signale im Bereich von 25, 29 und 33 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich um weitere membrangebundene *c*-Typ Cytochrome oder Peroxidasen, die auch in diesem Fall nicht weiter zugeordnet werden konnten.

Bei den Periplasmafraktionen konnte bei der Hämgruppenfärbung für die induzierten Proben von JG963 und JG964, jeweils erneut ein breites, für STC charakteristisches Signal nachgewiesen werden, welches bei JG582 nicht auftrat (Abb. 49b). Ein entsprechendes Signal wurde beim Western-Blot ausschließlich für die induzierte Probe von JG964 nachgewiesen. (Abb. 50). Daher kann auch hier bei beiden Stämmen von einer Expression von STC ausgegangen werden. Weiterhin wurde bei der Hämgruppenfärbung bei allen Proben ein Signal bei ca. 13 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein weiteres periplasmatisches *c*-Typ Cytochrom, oder eine Peroxidase, die jedoch auch hier nicht genauer zugeordnet werden konnten.

Folglich konnte nachgewiesen werden, dass CymA und STC von *R. sphaeroides* unter photoorganoheterotrophen Bedingungen exprimiert wird. Weiterhin konnte bei allen nicht induzierten Proben von JG963 und JG964 weder ein Signal für CymA, noch für STC

detektiert werden. Daher konnte gezeigt werden, dass der IPTG-abhängige Promotor unter diesen Bedingungen eine sehr geringe Basalaktivität aufweist.

Zuletzt wurde noch die Expression der beiden Cytochrome unter Kontrolle des Hypoxie- und Licht-induzierbaren pPUC-Promotors untersucht. Der Vorteil hierbei war, dass unter anoxischen Bedingungen im Licht keine Zugabe eines chemischen Induktors mehr benötigt wurde. Wie schon zuvor wurden auch diese Zellen unter photoorganoheterotrophen Bedingungen kultiviert und im Anschluss eine Hämgruppenfärbung und ein Western-Blot der Stämme JG965 und JG966 angefertigt. Bei der Hämgruppenfärbung der Membranfraktion konnte bei beiden Stämmen kein Signal im zu erwartenden Bereich von 21 kDa detektiert werden (Abb. 51a). Weiterhin zeigte auch der zugehörige Western-Blot bei JG966 in diesem Bereich keine Bande (Abb. 51b). Daher konnte bei beiden Stämmen scheinbar keine Expression von CymA nachgewiesen werden. Die einzigen bei der Hämgruppenfärbung sichtbaren Banden befanden sich bei allen Proben im Bereich von 34 kDa und bei JG965 zusätzlich bei 29 kDa. Hierbei handelt es sich wie schon zuvor um weitere membrangebundene *c*-Typ Cytochrome oder Peroxidasen, die auch in diesem Fall nicht weiter zugeordnet werden konnten.

Bei den Periplasmafraktionen konnte in der Hämgruppenfärbung nur bei JG966 das breite, für STC charakteristische Signal nachgewiesen werden, welches bei JG582 und JG965 nicht auftrat (Abb. 51a). Ein entsprechendes Signal wurde beim Western-Blot ausschließlich bei JG966 nachgewiesen. (Abb. 51b). Somit konnte aufgrund des positiven His-Tag Signals im Western-Blot nur bei JG966 eine Expression von STC nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei JG965 weder eine Expression von CymA noch von STC unter diesen Bedingungen erfolgte. Bei JG966 konnte nur eine Expression von STC nachgewiesen werden. Als Ursache könnte hierbei eine Veränderung im Promotorbereich zugrunde liegen. So könnte bei JG965 eine Mutation im Bereich der Transkriptionsregulation des Promotors dafür sorgen, dass die Funktion des Repressors PpsR gestört wird (Gomelsky & Kaplan, 1995). Dadurch wäre eine Transkription von *cymA* und *stc* nicht mehr möglich und in der Folge die Expression der beiden Cytochrome nicht nachweisbar. Weiterhin kann eine fehlende Expression von Proteinen durch einen stressbedingten, post-transkriptionalen Abbau von mRNA begründet sein (Arraiano *et al.*, 2010). Da mit dem IPTG-induzierbaren Promotor die Expression von CymA und STC unter identischen Rahmenbedingungen nachgewiesen werden konnte, scheint diese Ursache hierbei jedoch eher unwahrscheinlich zu sein. Bei

JG966 konnte nur die Expression von STC nachgewiesen werden. Bei dem in diesen Stamm eingebrachten Plasmid (pPUC-*cymA-stc*-His) folgt auf den Promotor zunächst *cymA* und anschließend *stc*. Da jedoch die Expression des an letzter Stelle liegenden Gens nachgewiesen werden konnte, scheint in diesem Fall kein Problem im Bereich der Transkription vorzuliegen. Daher könnte eine Mutation im Bereich der Ribosomenbindestelle von *cymA*, welche sich in diesem Fall im Promotorbereich befindet, die Initiation der Translation dieses Gens verhindern. Somit könnte CymA in diesem Fall nicht exprimiert werden.

3.2 Einfluss EET-assoziiertes *c*-Typ Cytochrome auf die bioelektrochemischen Eigenschaften von *R. sphaeroides*

Nach der erfolgten Untersuchung der Expression von CymA und STC in den vier erzeugten *R. sphaeroides*-Mutanten, wurden aufgrund der erzielten Ergebnisse, neben dem WT (JG582,) die Stämme JG963 und JG966 auf ihre elektrotrophen Eigenschaften untersucht. Dabei war von Interesse, welchen Einfluss eine gemeinsame Expression von CymA und STC (JG963) sowie eine alleinige Expression von STC (JG966) auf die Elektronenaufnahmekapazität von *R. sphaeroides* im Vergleich zum WT hat. Zu diesem Zweck wurden die oben genannten Stämme in der, in dieser Arbeit entwickelten, 280 ml M3C untersucht. Dabei diente die Kathode als einziger, relevanter Elektronendonator des Systems. Weiterhin erfolgte die Untersuchung unter photolithoautotrophen Bedingungen, um den Zellen über den zyklischen Elektronentransfer der anoxygenen Photosynthese ausreichend Energie zur Verfügung zu stellen. Bei der Messung der drei Stämme wurde, neben der Stromdichte, auch der zeitliche Verlauf der OD und des pH-Wertes bestimmt. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

Der Vergleich der mittleren erreichten Stromdichten zeigte ein erstes deutliches Bild (Abb. 52). So konnte beim CymA und STC exprimierenden JG963-Stamm im Vergleich zum WT eine mehr als 8-fache Erhöhung der mittleren Stromdichte erreicht werden. JG966, der nur STC exprimierte, zeigte hingegen nur knapp eine Verdreifachung des Wertes im Vergleich zum WT. Somit scheint die Expression von CymA und STC in *R. sphaeroides* zu einer deutlichen Steigerung des Elektronenabflusses von der Kathode zu führen, was bei einer alleinigen Expression von STC nicht in diesem Maße der Fall war. Um zu klären, ob die gemessenen Stromdichten auch mit einer Elektronenaufnahme von *R. sphaeroides* einhergehen, war es wichtig den Verlauf der Stromdichte der einzelnen Stämme mit dem der OD und des pH-Wertes zu vergleichen.

Bei der Medienkontrolle konnte über die gesamte Versuchsdauer eine weitgehend konstante, vergleichsweise geringe Stromdichte (Abb. 53), bei einer sehr niedrigen, stabilen OD (Abb. 54) und einem konstanten, im neutralen Bereich liegenden pH-Wert, gemessen werden (Abb. 55). Aufgrund dieser Daten kann eine Veränderung der Leitfähigkeit durch pH-Schwankungen sowie eine biologische Kontamination ausgeschlossen werden. Daher ist die hier gemessene Stromdichte des Kulturmediums als Hintergrundstrom zu verstehen, welcher auf den im Medium enthaltenen Ladungsträgern beruht. Weiterhin kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass jeglicher Stromfluss oberhalb des Niveaus der Medienkontrolle auf *R. sphaeroides* zurückzuführen sein muss und dieser somit die wichtigste elektrochemisch aktive Komponente in dem untersuchten System darstellt. Der WT zeigte über die gesamte Versuchsdauer im Vergleich zur Medienkontrolle mit $2,497 \pm 0,505 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ eine etwa doppelt so hohe mittlere Stromdichte, wobei die OD annähernd auf dem Niveau der Start-OD verblieb (Abb. 53 & Abb. 54). Weiterhin zeigten auch die pH-Werte einen stabilen Verlauf im neutralen Bereich (Abb. 55). Aufgrund der stabilen OD im gesamten Versuchszeitraum kann eine Lyse der Zellen und somit eine einhergehende Freisetzung potentiell elektrochemisch aktiver Zellbestandteile, wie z.B. Cytochrome, annähernd ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde auch in diesem Fall keine pH-Wert-bedingte Schwankung der Leitfähigkeit beobachtet. Daher scheint auch schon der WT von *R. sphaeroides* geringe Elektronenmengen von einer Kathode nutzen zu können. JG963 zeigte von Beginn an im Vergleich zum WT eine deutlich höhere Stromdichte, die über die gesamte Versuchsdauer bis auf $26,171 \pm 0,872 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ anstieg (Abb. 53). Die OD sank hierbei zunächst leicht ab, um sich bei $0,463 \pm 0,013$ bis zum Versuchsende einzupendeln (Abb. 54). Der pH-Wert zeigte eine vergleichbare Charakteristik und pendelte sich im Bereich zuvor erwähnter Werte ein (Abb. 55). Die leichte initiale Abnahme der OD könnte durch eine leichte Zelllyse oder eine im Vergleich zum WT leicht verbesserte Adhäsion der Zellen an der Kathode bedingt sein. Da der pH-Wert in diesem Fall ebenfalls zunächst leicht absank, scheint die erste Variante jedoch wahrscheinlicher zu sein. Da sich die OD und die pH-Werte anschließend jedoch stabilisierten und die Stromdichte weiter anstieg, scheint die Expression von CymA und STC die Elektronenaufnahmekapazität von JG963 im Vergleich zum WT deutlich zu steigern. Dies kann durch die Versuchsdaten von JG966 weiter untermauert werden. Dieser Stamm zeigte nach 16 h zunächst einen Anstieg der Stromdichte, welche gegen Ende des Experiments wieder auf das WT-Niveau abfiel (Abb. 53). Weiterhin fiel die OD im Gegensatz zu den anderen beiden Stämmen in den ersten 16 h massiv auf einen Wert von $0,225 \pm 0,033$ ab und verblieb anschließend auf diesem Niveau (Abb. 54). Auch der pH-Wert zeigte initial eine verhältnismäßig starke Abnahme und

pendelte sich anschließend im neutralen Bereich ein (Abb. 55). Da bei allen drei Stämmen keine Bildung von Zellaggregaten in den M3Cs beobachtet werden konnte, schien es bei JG966 in der ersten Versuchsphase zu einer starken Lyse von Zellen gekommen zu sein. Da der Zeitpunkt der Zellyse und der Anstieg der Stromdichte in etwa korrelierten, könnten elektrochemisch aktive Bestandteile der Zellen für einen großen Anteil der gemessenen Stromdichte verantwortlich sein. Somit scheint eine alleinige Expression von STC keinen positiven Einfluss auf die elektrotrophen Eigenschaften von *R. sphaeroides* zu besitzen. Weiterhin konnte so auch gezeigt werden, dass der Anteil von möglicherweise lysierten JG963-Zellen an der gemessenen Stromdichte sehr gering war. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die maximale Stromdichte von JG966 immer noch deutlich unter der initialen Stromdichte von JG963 lag. Da zu diesem Zeitpunkt bei JG963 jedoch nur eine vergleichsweise geringe Zellyse feststellbar war, muss der überwiegende Teil der Stromdichte auf die Elektronenaufnahme von *R. sphaeroides* zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Expression von CymA und STC zu einer deutlichen Verbesserung der elektrotrophen Eigenschaften von *R. sphaeroides* geführt hat. Dies konnte bei einer alleinigen Expression von STC nur begrenzt festgestellt werden. Somit konnte ein erstes, vorläufiges Funktionsmodell aufgestellt werden (Abb. 56):

Die Elektronen werden im ersten Schritt von der Kathode über die äußere Membran hinweg auf STC im Periplasma übertragen. Da in den beschriebenen Stämmen keine zusätzlichen Elemente für die Verlängerung der Elektronentransportkette zur Zelloberfläche in die äußere Membran eingebracht wurden, scheinen für diesen Schritt unspezifische Prozesse von Bedeutung zu sein. Ein weit verbreitetes Prinzip für den Transport von Elektronen über die äußere Membran hinweg, sind porenbildende äußere Membranproteine. Diese interagieren mit einem periplasmatischen Cytochrom und bringen dieses theoretisch mit der Zelloberfläche in Kontakt (z.B. PioB & PioA, *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1; MtoB & MtoA, *Sideroxydans lithotrophicus*) (Jiao & Newman, 2007; Liu *et al.*, 2012). Obwohl in *R. sphaeroides* diesbezüglich keine homologen Proteine gefunden werden konnten, scheint eine unspezifische Interaktion von STC mit einem porenbildenden Protein in der äußeren Membran möglich zu sein. Neben dieser Hypothese könnten weiterhin auch von *R. sphaeroides* sekretierte Verbindungen, die als eine Art endogenes Shuttle fungieren, für einen Transport von Elektronen über die äußere Membran verantwortlich sein.

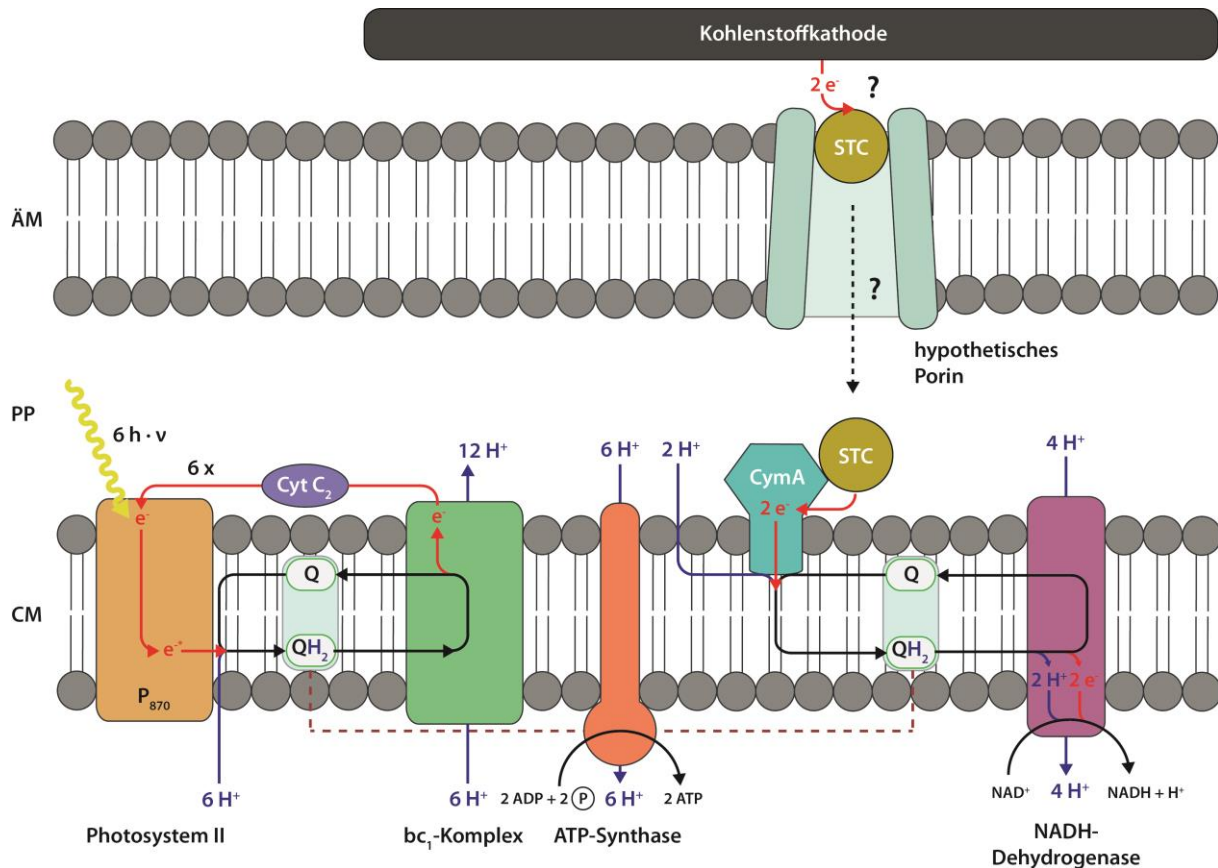


Abb. 56: Modell der CymA & STC abhängigen Elektrotrophie in *R. sphaeroides*. Das Modell beschreibt den von CymA und STC abhängigen Elektronentransfer von der Kathode über die äußere Membran (ÄM), durch das Periplasma (PP), in den Ubichinonpool der Cytoplasmamembran (CM). Weiterhin ist die Kopplung des Chinonpools an den anoxygenen Photosyntheseapparat sowie die NADH-Dehydrogenase dargestellt. Dabei dient der durch die Photosynthese erzeugte Protonengradient zum einen der ATP-Synthase und zum anderen der Generierung von Reduktionsäquivalenten (NADH) über eine rückläufige Elektronentransportkette. Der gezeigte Mechanismus für die Überwindung der ÄM ist hierbei als rein hypothetisch zu betrachten. Das gesamte Modell wurde auf die Generierung eines NADH-Moleküls bezogen.

Nach der Reduktion von STC, folgt im nächsten Schritt die Übertragung der Elektronen auf CymA, was durch das breite Potentialfenster dieser beiden Cytochrome gewährleistet wird (Firer-Sherwood *et al.*, 2008). Anschließend fließen die Elektronen von CymA in den Chinonpool. Dabei muss angemerkt werden, dass *R. sphaeroides* unter phototrophen Bedingungen einen Ubichinon-, *S. oneidensis* hingegen unter anaeroben Bedingungen einen Menachinonpool aufweist (Verméglio & Joliot, 1999; Myers & Myers, 2000). Daher stellte sich die Frage, ob eine Interaktion von CymA mit Ubichinon prinzipiell möglich ist. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass CymA mit Menachinon als gebundenem Co-Faktor in der Lage ist Ubichinon zu reduzieren (McMillan *et al.*, 2012). Weiterhin ist das Gen für die Demethylmenachinol-Methyl-Transferase, welche den letzten Schritt der

Menachinon-Synthese katalysiert, im Genom von *R. sphaeroides* vorhanden (Koike-Takeshita *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 2011). Somit könnte der Chinonpool, welcher sich unter diesen Bedingungen maßgeblich aus Ubichinon zusammensetzt, auch geringe, katalytische Mengen an Menachinon aufweisen. In diesem Fall würde die Interaktion von CymA und Ubichinon ermöglicht werden, was auch durch die Verhältnisse der Redoxpotentiale dieser beiden Verbindungen unterstützt wird. So liegen die Redoxpotentiale von Menachinol/Menachinon bei $E_0' = -74$ mV und von Ubiquinol/Ubichinon bei $E_0' = +45$ mV (Fierer-Sherwood *et al.*, 2008; Fuchs & Schlegel, 2014). Daher wird die Reduktion von Ubichinon durch CymA (Mittelpunktpotential $E_m^{app} = -200$ mV) aufgrund der höheren Redoxpotentialdifferenz im Vergleich zum Menachinon zusätzlich begünstigt (Fierer-Sherwood *et al.*, 2008). Im letzten Schritt können die so in den Ubichinonpool eingeschleusten Elektronen über eine rückläufige Elektronentransportkette für die Reduktion von Reduktionsäquivalenten wie $NAD(P)^+$ genutzt werden. Weiterhin ist der Chinonpool mit dem anoxygenen Photosyntheseapparat gekoppelt, welcher für die Erzeugung des Protonengradienten zuständig ist. Dieser Gradient ist zum einen für den Ablauf der rückläufigen Elektronentransportkette und zum anderen für die ATP-Synthese in *R. sphaeroides* entscheidend.

Basierend auf diesem Modell scheint eine photoelektroautotrophe Lebensweise von *R. sphaeroides* durch die Expression von CymA und STC möglich zu sein. Dennoch müssen in diesem Zusammenhang noch viele Fragestellungen, wie z.B. der Elektronentransfer über die äußere Membran hinweg, geklärt werden.

V Ausblick

1 Entwicklung neuer bioelektrochemischer Systeme

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden insgesamt drei BES entwickelt, wobei es sich zum einen um zwei Versionen einer M3C und zum anderen um ein System für die Abwasserbehandlung handelte. Die Funktionalität der drei Systeme konnte, in den für sie vorgesehenen Anwendungen, weitgehend demonstriert werden. Trotzdem gab es bei allen Konstruktionen auch Raum für Verbesserungen.

Im Falle der M3Cs konnten durch die Entwicklung der 280 ml Version, schon einige Probleme des ersten Systems gelöst werden. Trotz vieler Verbesserungen, wie z.B. im Bereich der Elektrodenbefestigung und -abdichtung, sollten für bestimmte Anwendungen noch weitere Maßnahmen ergriffen werden. So könnte in einem ersten Schritt das Verhältnis des Arbeitsvolumens zur Arbeitselektrodenfläche weiter reduziert werden. Damit wäre es möglich die elektrochemische Effizienz des Systems noch weiter zu steigern. Ferner stellte auch die unerwünschte Diffusion von Gasen durch den Kunststoffdeckel der M3C ein Problem dar. So konnten Experimente, die keine Begasung mit Inertgas erlaubten, in diesen Aufbauten kaum durchgeführt werden. Daher wäre eine Optimierung der Gasdichtigkeit der Systeme eine wichtige Verbesserungsmaßnahme. Hierbei könnte der Einsatz eines Materials wie z.B. Edelstahl weiterhin auch die Langlebigkeit der Zellen verbessern, da der bisher verwendete Kunststoff durch häufiges Autoklavieren sehr strapaziert wird.

Auch beim BES für die Abwasserreinigung konnte die prinzipielle Funktionalität demonstriert werden. Allerdings ist, wie schon erwähnt, die fehlende Stickstoffeliminierung ein großes Problem dieses Systems. Von der konstruktiven Seite her war vor allem das verwendete Fertigungsmaterial nicht geeignet und müsste in der nächsten Version des Systems gegen einen, gegenüber Alkoholen, unempfindlicheren Werkstoff ausgetauscht werden. Zudem müsste auch die Abdichtung des Deckels verbessert werden, um das Risiko einer Havarie zu reduzieren. Eine weitere konstruktive Optimierungsmaßnahme wäre eine, im Verhältnis zur Anodenfläche, deutliche Vergrößerung der Kathodenfläche. Dies würde vor allem im Betrieb als Vollzelle, der in der nächsten Versuchsphase erfolgen soll, zu einer Leistungsverbesserung führen, da in diesem Fall die Kathodenreaktion der limitierende Faktor ist.

2 Charakterisierung des entwickelten BES für die Abwasserbehandlung

Wie schon zuvor erwähnt war beim BES für die Abwasserbehandlung die fehlende Stickstoffeliminierung ein Problem. Um die möglichen Ursachen besser nachvollziehen zu können, wäre zunächst eine detaillierte Analyse der verschiedenen Stickstoffverbindungen in den jeweiligen Kompartimenten ein erster, wichtiger Schritt. Weiterhin wäre auch die Forcierung des TN-Eliminierungsprozesses durch zusätzliches Einbringen von Nitrifizierer- und Denitrifizierer-Kulturen eine denkbare Maßnahme. Ferner könnte auch eine Rezirkulierung im Zusammenspiel mit den zuvor genannten Schritten, zu einem verbesserten Abbau von Stickstoff- und organischen Kohlenstoffverbindungen beitragen. Neben der Eliminierung dieser Substanzen, spielt auch die Generierung von Elektrizität eine entscheidende Rolle in dieser Art von Systemen. Hier wäre der nächste Schritt das BES als Vollzelle zu betreiben, und so, im Gegensatz zum M3C-Modus, elektrische Leistung ohne das aktive Eingreifen eines Potentiostaten zu generieren. Dabei sollte auch der Einfluss auf die Eliminierungsleistung beobachtet werden.

3 Generierung und Charakterisierung eines elektrotrophen *R. sphaeroides*-Stammes

Bei einem der in dieser Arbeit modifizierten *R. sphaeroides*-Stämme, konnte die Elektronenaufnahmekapazität gegenüber dem WT deutlich gesteigert werden. Verantwortlich hierfür war die Expression der beiden *c*-Typ Cytochrome CymA und STC aus *S. oneidensis*. Der zweite, in der M3C getestete, Stamm verfügte über einen Hypoxie- und Licht-induzierbaren Promotor. Leider konnte hier nur die Expression von STC nachgewiesen werden. Da die Induktion dieses Promotors unter den Versuchsbedingungen auch ohne die Zugabe eines chemischen Induktors erfolgt, wäre dieser eigentlich ideal für diese Anwendung geeignet. Daher wäre es wichtig, den Promotor auf mögliche Fehler hin zu analysieren, um auch in diesem Fall die Expression beider Cytochrome zu erreichen. Ferner könnte über eine gezielte Einbringung weiterer Elemente einer verlängerten Elektronentransportkette, der Elektronentransfer von der Zelloberfläche ins Periplasma weiter verbessert werden. Dies könnte u. U. auch durch eine gezielte Störung der Integrität der äußeren Membran erreicht werden. Sollte dieser Prozess durch die zuvor erwähnten Maßnahmen weiter verbessert

werden, würde auch die Optimierung des Metabolismus von *R. sphaeroides* in den Fokus rücken. Somit könnte es möglich sein mit diesem Organismus CO₂ zu verwertbaren Basischemikalien zu reduzieren. Ob in diesem Zusammenhang Licht benötigt würde oder ob der Prozess auch ausschließlich mit einer Kathode als Energiequelle ablaufen könnte, wäre ein weiterer Aspekt, den es zu klären gilt.

VI Referenzen

- Ahn, Y., and Logan, B.E. (2010) Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour Technol* **101**: 469–475.
- Alberti, G., and Narducci, R. (2009) Evolution of permanent deformations (or memory) in Nafion 117 membranes with changes in temperature, relative humidity and time, and its importance in the development of medium temperature PEMFCs. *Fuel Cells* **9**: 410–420.
- Ali, M., and Okabe, S. (2015) Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. *Chemosphere* **141**: 144–153.
- Anraku, Y. (1988) Bacterial electron transport chains. *Annu Rev Biochem* **57**: 101–132.
- Argyle, M.D., and Bartholomew, C.H. (2015) Heterogeneous catalyst deactivation and regeneration: A review. *Catalysts* **5**: 145–269.
- Arraiano, C.M., Andrade, J.M., Domingues, S., Guinote, I.B., Malecki, M., Matos, R.G., Moreira, R.N., Pobre, V., *et al.* (2010) The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 883–923.
- Aulenta, F., Canosa, A., Majone, M., Panero, S., Reale, P., and Rossetti, S. (2008) Trichloroethene dechlorination and H₂ evolution are alternative biological pathways of electric charge utilization by a dechlorinating culture in a bioelectrochemical system. *Environ Sci Technol* **42**: 6185–6190.
- Batlle-Vilanova, P., Puig, S., Gonzalez-Olmos, R., Vilajeliu-Pons, A., Baneras, L., Dolors Balaguer, M., and Colprim, J. (2014) Assessment of biotic and abiotic graphite cathodes for hydrogen production in microbial electrolysis cells. *Int J Hydrogen Energy* **39**: 1297–1305.
- Beliaev, A.S., and Saffarini, D.A. (1998) *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol* **180**: 6292–6297.
- Beliaev, A.S., Saffarini, D.A., McLaughlin, J.L., and Hunnicutt, D. (2001) MtrC, an outer membrane decahaem *c* cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol Microbiol* **39**: 722–730.
- Bird, L.J., Bonnefoy, V., and Newman, D.K. (2011) Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends Microbiol* **19**: 330–340.

- Bonanni, P.S., Massazza, D., and Busalmen, J.P. (2013) Stepping stones in the electron transport from cells to electrodes in *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Phys Chem Chem Phys* **15**: 10300–10306.
- Bose, A., Gardel, E.J., Vidoudez, C., Parra, E.A., and Girguis, P.R. (2014) Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria. *Nat Commun*: 1-5. DOI: 10.1038/ncomms4391
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Bratsch, S.G. (1989) Standard electrode potentials and temperature coefficients in water. *J Phys Chem Ref data* **18**: 1–21.
- Bretschger, O., Obraztsova, A., Sturm, C.A., In, S.C., Gorby, Y.A., Reed, S.B., Culley, D.E., Reardon, C.L., *et al.* (2007) Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7003–7012.
- Bücking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S., and Gescher, J. (2010) Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol Lett* **306**: 144–151.
- Bursac, T. (2015) Mikroben-Elektroden-Interaktion als Werkzeug in der mikrobiellen Biotechnologie. Masterarbeit, Institut für angewandte Biowissenschaften, KIT.
- Canfield, J.H., Goldner, B.H., and Lutwack, R. (1963) Utilization of human wastes as electrochemical fuels. *NASA Tech Rep Magna Corp* 63.
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X., and Logan, B.E. (2009) A new method for water desalination using microbial desalination cells. *Environ Sci Technol* **43**: 7148–7152.
- Cartron, M.L., Olsen, J.D., Sener, M., Jackson, P.J., Brindley, A.A., Qian, P., Dickman, M.J., Leggett, G.J., *et al.* (2014) Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1837**: 1769–1780.
- Charette, S.J., and Cosson, P. (2004) Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques* **36**: 574–575.
- Cheng, S., and Logan, B.E. (2007) Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18871–18873.

- Cheng, S., Liu, H., and Logan, B.E. (2006) Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing. *Environ Sci Technol* **40**: 2426–2432.
- Cheng, S., Xing, D., Call, D.F., and Logan, B.E. (2009) Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. *Environ Sci Technol* **43**: 3953–3958.
- Christgen, B., Scott, K., Dolfing, J., Head, I.M., and Curtis, T.P. (2015) An evaluation of the performance and economics of membranes and separators in single chamber microbial fuel cells treating domestic wastewater. *PLoS One* **10**: 1–13.
- Clauwaert, P., Rabey, K., Aelterman, P., Schamphelaire, L.D., Pham, T.H., Boeckx, P., Boon, N., and Verstraete, W. (2007) Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol* **41**: 3354–3360.
- Cogdell, R.J., Gardiner, A.T., Roszak, A.W., Law, C.J., Southall, J., and Isaacs, N.W. (2004) Rings, ellipses and horseshoes: How purple bacteria harvest solar energy. *Photosynth Res* **81**: 207–214.
- Daud, S.M., Kim, B.H., Ghasemi, M., and Daud, W.R.W. (2015) Separators used in microbial electrochemical technologies: Current status and future prospects. *Bioresour Technol* **195**: 170–179.
- Deutzmann, J.S., Sahin, M., and Spormann, A.M. (2015) Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis. *MBio* **6**: 1–8.
- Dixon, R., and Kahn, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 621–631.
- Dolch, K. (2014) Stabilität und Leistungsfähigkeit von gezielt gezüchteten Biofilmen auf Anoden. Dissertation, Institut für angewandte Biowissenschaften, KIT.
- Donohue, T.J., McEwan, A., and Kaplan, S. (1986) Cloning, DNA sequence, and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c2* gene. *J Bacteriol* **168**: 962–972.
- Du, Z., Li, H., and Gu, T. (2007) A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv* **25**: 464–482.
- DWA - Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall (2016) Politikmemorandum 2016. Hennef.
- Firer-Sherwood, M., Pulcu, G.S., and Elliott, S.J. (2008) Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window. *J Biol Inorg Chem* **13**: 849–854.

- Fonseca, B., Paquete, C., Neto, S., Pacheco, I., Soares, C., and Louro, R. (2013) Mind the gap: Cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem J* **449**: 101–108.
- Förster, A.H. (2014) Produktion von Basischemikalien in den Modellorganismen *Escherichia coli* und *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Institut für angewandte Biowissenschaften, KIT.
- Freguia, S., Tsujimura, S., and Kano, K. (2010) Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes. *Electrochim Acta* **55**: 813–818.
- Fricke, K. (2009) Umwelt Bundesamt, Energieeffizienz kommunaler Kläranlagen.
- Friedman, E., Miller, K., Lipson, D., and Angenent, L. (2013) Potentiostatically poised electrodes mimic iron oxide and interact with soil microbial communities to alter the biogeochemistry of arctic peat soils. *Minerals* **3**: 318–336.
- Fuchs, G., and Schlegel, H.-G. (2014) *Allgemeine Mikrobiologie*. 9. Auflage., Thieme Verlag.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., and Hegemann, P. (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* **55**: 869–881.
- Geiger, K. (2016) Wachstum an Kathoden: Ökologische, physiologische und molekulare Untersuchung zur stromgetriebenen Autotrophie. Dissertation, Institut für angewandte Biowissenschaften, KIT.
- Gibson, J.L., and Tabita, F.R. (1993) Nucleotide sequence and functional analysis of *cbbR*, a positive regulator of the calvin cycle operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **175**: 5778–5784.
- Golitsch, F., Bücking, C., and Gescher, J. (2013) Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosens Bioelectron* **47**: 285–291.
- Gomelsky, M., and Kaplan, S. (1995) Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of *puc* and *bchF* expression. **177**: 1634–1637.
- Gong, Y., Radachowsky, S.E., Wolf, M., Nielsen, M.E., Girguis, P.R., and Reimers, C.E. (2011) Benthic microbial fuel cell as direct power source for an acoustic modem and seawater oxygen/temperature sensor system. *Environ Sci Technol* **45**: 5047–5053.

- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., *et al.* (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11358–11363.
- Gralnick, J.A., and Newman, D.K. (2007) Extracellular respiration. *Mol Microbiol* **65**: 1–11.
- Gray, M.J., and Escalante-Semerena, J.C. (2009) In vivo analysis of cobinamide salvaging in *Rhodobacter sphaeroides* strain 2.4.1. *J Bacteriol* **191**: 3842–3851.
- Gregory, K.B., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004) Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ Microbiol* **6**: 596–604.
- Harrington, T.D., Mohamed, A., Tran, V.N., Biria, S., Gargouri, M., Park, J.J., and Beyenal, H. (2015) Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. *Bioresour Technol* **195**: 57–65.
- Hartshorne, R.S., Jepson, B.N., Clarke, T.A., Field, S.J., Fredrickson, J., Zachara, J., Shi, L., Butt, J.N., *et al.* (2007) Characterization of *Shewanella oneidensis* MtrC: A cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron transport to extracellular electron acceptors. *J Biol Inorg Chem* **12**: 1083–1094.
- Hatch, J.L., and Finneran, K.T. (2008) Influence of reduced electron shuttling compounds on biological H₂ production in the fermentative pure culture *Clostridium beijerinckii*. *Curr Microbiol* **56**: 268–273.
- Hernández-Fernández, F.J., Pérez de los Ríos, A., Salar-García, M.J., Ortiz-Martínez, V.M., Lozano-Blanco, L.J., Godínez, C., Tomás-Alonso, F., and Quesada-Medina, J. (2015) Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. *Fuel Process Technol* **138**: 284–297.
- Hiegemann, H., Herzer, D., Nettmann, E., Lübken, M., Schulte, P., Schmelz, K.-G., Gredigk-Hoffmann, S., and Wichern, M. (2016) An integrated 45L pilot microbial fuel cell system at a full-scale wastewater treatment plant. *Bioresour Technol* **218**: 115–122.
- Higson, S. (2012) Biosensors for medical applications. Woodhead Publishing Limited, Philadelphia.
- Huang, D.-Y., Zhou, S.-G., Chen, Q., Zhao, B., Yuan, Y., and Zhuang, L. (2011) Enhanced anaerobic degradation of organic pollutants in a soil microbial fuel cell. *Chem Eng J* **172**: 647–653.
- Ilbert, M., and Bonnefoy, V. (2013) Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1827**: 161–175.

- Imhoff, J.F., Truper, H.G., and Pfennig, N. (1984) Rearrangement of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **34**: 340–343.
- Ind, A.C., Porter, S.L., Brown, M.T., Byles, E.D., Beyer, J.A. De, Godfrey, S.A., and Armitage, J.P. (2009) Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6613–6615.
- International Energy Agency (2013) World Energy Outlook 2013.
- International Energy Agency (2015) World Energy Outlook 2015 - Summary.
- IPCC (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.
- Ishii, T., Kawaichi, S., Nakagawa, H., Hashimoto, K., and Nakamura, R. (2015) From chemolithoautotrophs to electrolithoautotrophs: CO₂ fixation by Fe(II)-oxidizing bacteria coupled with direct uptake of electrons from solid electron sources. *Front Microbiol* **6**: 1-9.
- Jiang, J., and Kappler, A. (2008) Kinetics of microbial and chemical reduction of humic substances: Implications for electron shuttling. *Environ Sci Technol* **42**: 3563–3569.
- Jiao, Y., and Newman, D.K. (2007) The *pio* operon is essential for phototrophic Fe(II) oxidation in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *J Bacteriol* **189**: 1765–1773.
- Jiao, Y., Kappler, A., Croal, L.R., and Newman, D.K. (2005) Isolation and characterization of a genetically tractable photoautotrophic Fe (II)-oxidizing bacterium, *Rhodopseudomonas palustris* strain TIE-1. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4487–4496.
- Jong, E.D., Higson, A., Walsh, P., and Wellisch, M. (2011) Bio-based chemicals - Value added products from biorefineries. IEA publication.
- Kato, S. (2015) Biotechnological aspects of microbial extracellular electron transfer. *Microbes Environ* **30**: 133–139.
- Keith, R., Harnisch, F., Wirth, S., Wahlandt, H., Dockhorn, T., Dichtl, N., and Schröder, U. (2014) Evaluating the effects of scaling up on the performance of bioelectrochemical systems using a technical scale microbial electrolysis cell. *Bioresour Technol* **163**: 206–213.
- Kiley, P.J., and Kaplan, S. (1987) Cloning, DNA sequence, and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* light-harvesting B800-850 α and B800-850 β genes. *J Bacteriol* **169**: 3268–3275.
- Kim, J.R., Cheng, S., Oh, S.-E., and Logan, B.E. (2007) Membranes in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol* **41**: 1004–1009.

- Kim, J.R., Zuo, Y., Regan, J.M., and Logan, B.E. (2008) Analysis of ammonia loss mechanisms in microbial fuel cells treating animal wastewater. *Biotechnol Bioeng* **99**: 1120–1127.
- Kim, K.Y., Yang, W., Ye, Y., Barge, N. La, and Logan, B.E. (2016) Performance of anaerobic fluidized membrane bioreactors using effluents of microbial fuel cells treating domestic wastewater. *Bioresour Technol* **208**: 58–63.
- Klessing, T. (2015) Machbarkeitsstudie zum Einsatz einer mikrobiellen Brennstoffzelle in einem kommunalen Klärwerk. Masterarbeit, Institut für angewandte Biowissenschaften, KIT.
- Kloke, A., Rubenwolf, S., Bücking, C., Gescher, J., Kerzenmacher, S., Zengerle, R., and von Stetten, F. (2010) A versatile miniature bioreactor and its application to bioelectrochemistry studies. *Biosens Bioelectron* **25**: 2559–2565.
- Koikie-Takeshita, A., Koyama, T., and Ogura, K. (1997) Identification of a novel gene cluster participating in menaquinone (vitamin K2) biosynthesis. *J Biol Chem* **272**: 12380–12383.
- Kotloski, N.J., and Gralnick, J.A. (2013) Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio* **4**: 10–13.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **225**: 680–685.
- Lee, J.K., and Kaplan, S. (1995) Transcriptional regulation of *puc* operon expression in *Rhodobacter sphaeroides*: Analysis of the CIS-acting downstream regulatory sequence. *J Biol Chem* **270**: 20453–20458.
- Lee, J.K., Kiley, P.J., and Kaplan, S. (1989) Posttranscriptional control of *puc* operon expression of B800-850 light-harvesting complex formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **171**: 3391–3405.
- Liu, H., and Logan, B.E. (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ Sci Technol* **38**: 4040–4046.
- Liu, H., Ramnarayanan, R., and Logan, B.E. (2004) Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol* **38**: 2281–2285.
- Liu, H., Cheng, S., and Logan, B.E. (2005) Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Env Sci Technol* **39**: 5488–5493.

- Liu, J., Wang, Z., Belchik, S.M., Edwards, M.J., Liu, C., Kennedy, D.W., Merkley, E.D., Lipton, M.S., *et al.* (2012) Identification and characterization of MtoA: A decaheme *c*-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1. *Front Microbiol* **3**: 1–11.
- Lloyd, J.R. (2003) Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 411–425.
- Logan, B.E. (2009) Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol* **7**: 375–381.
- Logan, B.E., and Rabaey, K. (2012) Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science (80-)* **337**: 686–690.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., *et al.* (2006) Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ Sci Technol* **40**: 5181–5192.
- Lohner, S.T., Deutzmann, J.S., Logan, B.E., Leigh, J., and Spormann, A.M. (2014) Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *ISME J* **8**: 1673–1681.
- Lorenzo, V. de, Cases, I., Herrero, M., and Timmis, K.N. (1993) Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: Identification of postexponential promoters in *Pseudomonas putida* with *lacZ-tet* bicistronic reporters. *J Bacteriol* **175**: 6902–6907.
- Lovley, D.R. (2006) Bug juice: Harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**: 497–508.
- Lovley, D.R. (2011) Powering microbes with electricity: Direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environ Microbiol Rep* **3**: 27–35.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., and Nevin, K.P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Physiol* **49**: 219–286.
- Lovley, D.R., and Phillips, E.J. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1472–1480.
- Lovley, D.R., and Nevin, K.P. (2013) Electrobiocommodities: Powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity. *Curr Opin Biotechnol* **24**: 385–390.
- Lovley, D.R., and Malvankar, N.S. (2015) Seeing is believing: Novel imaging techniques help clarify microbial nanowire structure and function. *Environ Microbiol* **17**: 2209–2215.

- Luo, H., Jenkins, P.E., and Ren, Z. (2010) Concurrent desalination and hydrogen generation using microbial electrolysis and desalination cells. *Environ Sci Technol* **45**: 340-344.
- Lutz, R., and Bujard, H. (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I₁-I₂ regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **25**: 1203–1210.
- Mackenzie, C., Eraso, J.M., Choudhary, M., Roh, J.H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, A., and Kaplan, S. (2007) Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annu Rev Microbiol* **61**: 283–307.
- Madigan, M.T., Martinenko, J.M., Dunlap, P. V., and Clark, D.P. (2009) Biology of microorganisms. 12th ed., Pearson Education Inc., San Francisco.
- Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., *et al.* (2011) Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat Nanotechnol* **6**: 573–579.
- Malvankar, N.S., Lau, J., Nevin, K.P., Franks, A.E., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012a) Electrical conductivity in a mixed-species biofilm. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5967–5971.
- Malvankar, N.S., Mester, T., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012b) Supercapacitors based on *c*-type cytochromes using conductive nanostructured networks of living bacteria. *ChemPhysChem* **13**: 463–468.
- Malvankar, N. S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012c) Lack of cytochrome involvement in long-range electron transport through conductive biofilms and nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. *Energy Environ Sci* **5**: 8651.
- Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K., Tremblay, P.-L., Evans-Lutterodt, K., Nykypanchuk, D., Martz, E., Tuominen, M.T., *et al.* (2015) Structural basis for metallic-like conductivity in microbial nanowires. *mBio* **6**: 1–10.
- Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2008a) *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3968–3973.
- Marsili, E., Rollefson, J.B., Baron, D.B., Hozalski, R.M., and Bond, D.R. (2008b) Microbial biofilm voltammetry: Direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7329–7337.
- McMillan, D.G.G., Marritt, S.J., Butt, J.N., and Jeuken, L.J.C. (2012) Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. *J Biol Chem* **287**: 14215–14225.

- Metrohm Autolab B.V (2011) Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT) – Electrochemical cell setup.
- Metz, S., Jäger, A., and Klug, G. (2012) Role of a short light, oxygen, voltage (LOV) domain protein in blue light and singlet oxygen-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **158**: 368–379.
- Min, B., and Logan, B.E. (2004) Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ Sci Technol* **38**: 5809–5814.
- MKULNV NRW (2012) Lagebericht zu Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in Nordrhein-Westfalen 2012. Düsseldorf.
- Molisch, H. (1907) Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen. G. Fischer, Jena.
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., and Bernet, N. (2016) Electro-Fermentation: How to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends Biotechnol* **34**: 856–865.
- Myers, C.R., and Myers, J.M. (2002) MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5585–5594.
- Myers, C.R., Nealson, K.H., Myers, C.R., and Nealson, K.H. (1988) Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* **240**: 1319–1321.
- Myers, J.M., and Myers, C.R. (2000) Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *J Bacteriol* **182**: 67–75.
- Myers, J.M., and Myers, C.R. (2001) Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. *Appl Environ Microbiol* **67**: 260–269.
- Nealson, K.H., and Saffarini, D. (1994) Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology and regulation. *Annu Rev Microbiol Rev Microbiol* **48**: 311–348.
- Nealson, K.H., Belz, A., and McKee, B. (2002) Breathing metals as a way of life: Geobiology in action. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 215–222.

- Nevin, K.P., Woodard, T.L., and Franks, A.E. (2010) Microbial electrosynthesis : Feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *Am Soc Microbiol* **1**: 1–4.
- Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., Snoeyenbos-West, O.L., and Lovley, D.R. (2011) Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2882–2886.
- Nie, H., Zhang, T., Cui, M., Lu, H., Lovley, D.R., and Russell, T.P. (2013) Improved cathode for high efficient microbial-catalyzed reduction in microbial electrosynthesis cells. *Phys Chem Chem Phys* **15**: 14290–14294.
- Oliveira, V.B., Simoes, M., Melo, L.F., and Pinto, A.M.F.R. (2013) Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochem Eng J* **73**: 53–64.
- Park, D.H., and Zeikus, J.G. (1999) Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: Physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *J Bacteriol* **181**: 2403–2410.
- Pasternak, G., Greenman, J., and Ieropoulos, I. (2016) Comprehensive study on ceramic membranes for low-cost microbial fuel cells. *ChemSusChem* **9**: 88–96.
- Pirbadian, S., Barchinger, S.E., Leung, K.M., Byun, H.S., Jangir, Y., Bouhenni, R.A., Reed, S.B., Romine, M.F., *et al.* (2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 12883–12888.
- Pitts, K.E., Dobbin, P.S., Reyes-Ramirez, F., Thomson, A.J., Richardson, D.J., and Seward, H.E. (2003) Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA: Expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *J Biol Chem* **278**: 27758–27765.
- Porter, S.L., Wilkinson, D.A., Byles, E.D., Wadhams, G.H., Taylor, S., Saunders, N.J., and Armitage, J.P. (2011) Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* strain WS8N. *J Bacteriol* **193**: 4027–4028.
- Potter, M.C. (1911) Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc R Soc B* **84**: 260–276.
- Prokhorova, A., Sturm-Richter, K., Doetsch, A., and Gescher, J. (2016) Resilience, dynamics and interactions within a multi-species exoelectrogenic model biofilm. *Am Environ Microbiol* **in revision**.

- Prosser, J. (2005) Nitrogen in soils - Nitrification. In *The encyclopedia of soils in the environment*. pp. 1707–1717.
- Rabaey, K., and Rozendal, R.A. (2010) Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Microbiol* **8**: 706–716.
- Rasmussen, M., Abdellaoui, S., and Minteer, S.D. (2016) Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosens Bioelectron* **76**: 91–102.
- Redwood, M.D., Paterson-Beedle, M., and MacAskie, L.E. (2009) Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: Towards the hydrogen economy. *Rev Environ Sci Biotechnol* **8**: 149–185.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435**: 1098–1101.
- Reimers, C.E., Tender, L.M., Fertig, S., and Wang, W. (2001) Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ Sci Technol* **35**: 192–195.
- Reiner, J.E. (2015) Isolierung von elektro-autotrophen Mikroorganismen. Masterarbeit, Institut für angewandte Biowissenschaften, KIT.
- Renslow, R.S., Babauta, J.T., Majors, P.D., and Beyenal, H. (2013) Diffusion in biofilms respiring on electrodes. *Energy Environ Sci* **6**: 595–607.
- Richter, K., Schicklberger, M., and Gescher, J. (2012) Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* **78**: 913–921.
- Rosenbaum, M., Schröder, U., and Scholz, F. (2005) *In situ* electrooxidation of photobiological hydrogen in a photobioelectrochemical fuel cell based on *Rhodobacter sphaeroides*. *Environ Sci Technol* **39**: 6328–6333.
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., and Angenent, L.T. (2011) Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour Technol* **102**: 324–333.
- Rosenbaum, M., and Franks, A.E. (2014) Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: Status quo, challenges and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 509–518.
- Ross, D.E., Ruebush, S.S., Brantley, S.L., Hartshorne, R.S., Clarke, T.A., Richardson, D.J., and Tien, M. (2007) Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5797–5808.
- Ross, D.E., Flynn, J.M., Baron, D.B., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2011) Towards electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism. *PLoS One* **6**: 1-9

- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2006) Effects of membrane cation transport on pH and microbial ruel. *Environ Sci Technol* **40**: 5206–5211.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Molenkamp, R.J., and Buisman, C.J.N. (2007) Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes. *Water Res* **41**: 1984–1994.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Rabaey, K., Keller, J., and Buisman, C.J.N. (2008) Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol* **26**: 450–459.
- Rozendal, R.A., Leone, E., Keller, J., and Rabaey, K. (2009) Efficient hydrogen peroxide generation from organic matter in a bioelectrochemical system. *Electrochem commun* **11**: 1752–1755.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463–5467.
- Sawyer, D.T., Sobkowiak, A., and Roberts, J.I. (1995) *Electrochemistry for chemists*. 2nd Edition., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Schröder, U. (2007) Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys Chem Chem Phys* **9**: 2619–2629.
- Schröder, U., Harnisch, F., and Angenent, L.T. (2015) Microbial electrochemistry and technology: Terminology and classification. *Energy Environ Sci* **8**: 513–519.
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A.M., and Gescher, J. (2009) Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7789–7796.
- Schwalb, C., Chapman, S.K., and Reid, G. a (2002) The membrane-bound tetrahaem *c*-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*. *Biochem Soc Trans* **30**: 658–662.
- Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M., and Fredrickson, J.K. (2007) Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: A key role for multihem *c*-type cytochromes. *Mol Microbiol* **65**: 12–20.
- Siegert, M., Li, X.F., Yates, M.D., and Logan, B.E. (2015) The presence of hydrogenotrophic methanogens in the inoculum improves methane gas production in microbial electrolysis cells. *Front Microbiol* **6**: 1–12.
- Snider, R.M., Strycharz-Glaven, S.M., Tsoi, S.D., Erickson, J.S., and Tender, L.M. (2012) Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 15467–15472.

- Sockett, R.E., Foster, J.C.A., and Armitage, J.P. (1990) Molecular biology of membrane-bound complexes in phototrophic bacteria. In *Molecular Biology of Membrane-Bound Complexes in Phototrophic Bacteria*. Drews, G., and Dawes, E.A. (eds). Springer US, Boston, MA. pp. 473–478.
- Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Schaap, J.D., Kampman, C., and Buisman, C.J.N. (2010) Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures. *Environ Sci Technol* **44**: 513–517.
- Straub, K.L., and Schink, B. (2003) Evaluation of electron-shuttling compounds in microbial ferric iron reduction. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 229–233.
- Strik, D.P., Timmers, R.A., Helder, M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V., and Buisman, C.J.N. (2011) Microbial solar cells: Applying photosynthetic and electrochemically active organisms. *Trends Biotechnol* **29**: 41–49.
- Strycharz, S.M., Glaven, R.H., Coppi, M.V., Gannon, S.M., Perpetua, L.A., Liu, A., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2011) Gene expression and deletion analysis of mechanisms for electron transfer from electrodes to *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry* **80**: 142–150.
- Stuetz, R. (2009) *Principles of Water and Wastewater Treatment Processes*. first., IWA Publishing, London.
- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R.O., and Gescher, J. (2015) A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J* **9**: 1802–1811.
- Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., Kerzenmacher, S., and Gescher, J. (2015) Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresour Technol* **186**: 89–96.
- Summers, Z.M., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2013) Cultivation of an obligate Fe(II) - oxidizing lithoautotrophic. *MBio* **4**: 1–5.
- Tartakovsky, B., and Guiot, S.R. (2006) A comparison of air and hydrogen peroxide oxygenated microbial fuel cell reactors. *Biotechnol Prog* **22**: 241–246.
- Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D., Pilobello, K., Fertig, S.J., *et al.* (2002) Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat Biotechnol* **20**: 821–825.

- Tender, L.M., Gray, S.A., Groveman, E., Lowy, D.A., Kauffman, P., Melhado, J., Tyce, R.C., Flynn, D., *et al.* (2008) The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *J Power Sources* **179**: 571–575.
- United Nations ESA Population Division (2015) World population prospects: The revision 2015. New York.
- United Nations FCCC (2015) *Framework Convention on Climate Change*.
- van Niel, C.B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol Rev* **8**: 1–118.
- Vargas, M., Malvankar, N.S., Tremblay, P.-L., Leang, C., Smith, J.A., Patel, P., Synoeyenbos-West, O., Nevin, K.P., *et al.* (2013) Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. *MBio* **4**: 1–6.
- Venkataraman, A., Rosenbaum, M., Arends, J.B.A., Halitschke, R., and Angenent, L.T. (2010) Quorum sensing regulates electric current generation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in bioelectrochemical systems. *Electrochem Commun* **12**: 459–462.
- Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., Ringelberg, D.B., White, D.C., *et al.* (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 705–724.
- Verma, N., and Bhardwaj, A. (2015) Biosensor technology for pesticides—A review. *Appl Biochem Biotechnol* **175**: 3093–3119.
- Verméglio, A., and Joliot, P. (1999) The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends Microbiol* **7**: 435–440.
- Verméglio, A., Lavergne, J., and Rappaport, F. (2016) Connectivity of the intracytoplasmic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*: A functional approach. *Photosynth Res* **127**: 13–24.
- Virdis, B., Rabaey, K., Rozendal, R.A., Yuan, Z., and Keller, J. (2010) Simultaneous nitrification, denitrification and carbon removal in microbial fuel cells. *Water Res* **44**: 2970–2980.
- Wang, H., and Ren, Z.J. (2013) A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol Adv* **31**: 1796–1807.
- Weber, K., Achenbach, L., and Coates, J.D. (2006) Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* **4**: 752–764.

- Webster, D.P., TerAvest, M.A., Doud, D.F.R., Chakravorty, A., Holmes, E.C., Radens, C.M., Sureka, S., Gralnick, J.A., *et al.* (2014) An arsenic-specific biosensor with genetically engineered *Shewanella oneidensis* in a bioelectrochemical system. *Biosens Bioelectron* **62**: 320–324.
- Wei, J., Liang, P., and Huang, X. (2011) Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour Technol* **102**: 9335–9344.
- Winfield, J., Gajda, I., Greenman, J., and Ieropoulos, I. (2016) A review into the use of ceramics in microbial fuel cells. *Bioresour Technol* **215**: 296–303.
- Xu, J., Sheng, G.-P., Luo, H.-W., Li, W.-W., Wang, L.-F., and Yu, H.-Q. (2012) Fouling of proton exchange membrane (PEM) deteriorates the performance of microbial fuel cell. *Water Res* **46**: 1817–1824.
- Yan, H., Saito, T., and Regan, J.M. (2012) Nitrogen removal in a single-chamber microbial fuel cell with nitrifying biofilm enriched at the air cathode. *Water Res* **46**: 2215–2224.
- Yates, M.D., Siegert, M., and Logan, B.E. (2014) Hydrogen evolution catalyzed by viable and non-viable cells on biocathodes. *Int J Hydrogen Energy* **39**: 16841–16851.
- Zhang, X., Cheng, S., Huang, X., and Logan, B.E. (2010) The use of nylon and glass fiber filter separators with different pore sizes in air-cathode single-chamber microbial fuel cells. *Energy Environ Sci* **3**: 659–664.
- Zhang, X., Liang, P., Shi, J., Wei, J., and Huang, X. (2013a) Using a glass fiber separator in a single-chamber air-cathode microbial fuel cell shortens start-up time and improves anode performance at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour Technol* **130**: 529–535.
- Zhang, X., Zhu, F., Chen, L., Zhao, Q., and Tao, G. (2013b) Removal of ammonia nitrogen from wastewater using an aerobic cathode microbial fuel cell. *Bioresour Technol* **146**: 161–168.
- Zhao, F., Harnisch, F., Schröder, U., Scholz, F., Bogdanoff, P., and Herrmann, I. (2006) Challenges and constraints of using oxygen cathodes in microbial fuel cells. *Env Sci Technol* **40**: 5193–5199.
- Zuo, Y., Xing, D., Regan, J.M., and Logan, B.E. (2008) Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3130–3137.

VII Anhang

1 Generierung eines Codon-optimierten, synthetischen DNA-Fragments

Mean difference: 43,36 %

Ordinate (y-axis): relative adaptiveness

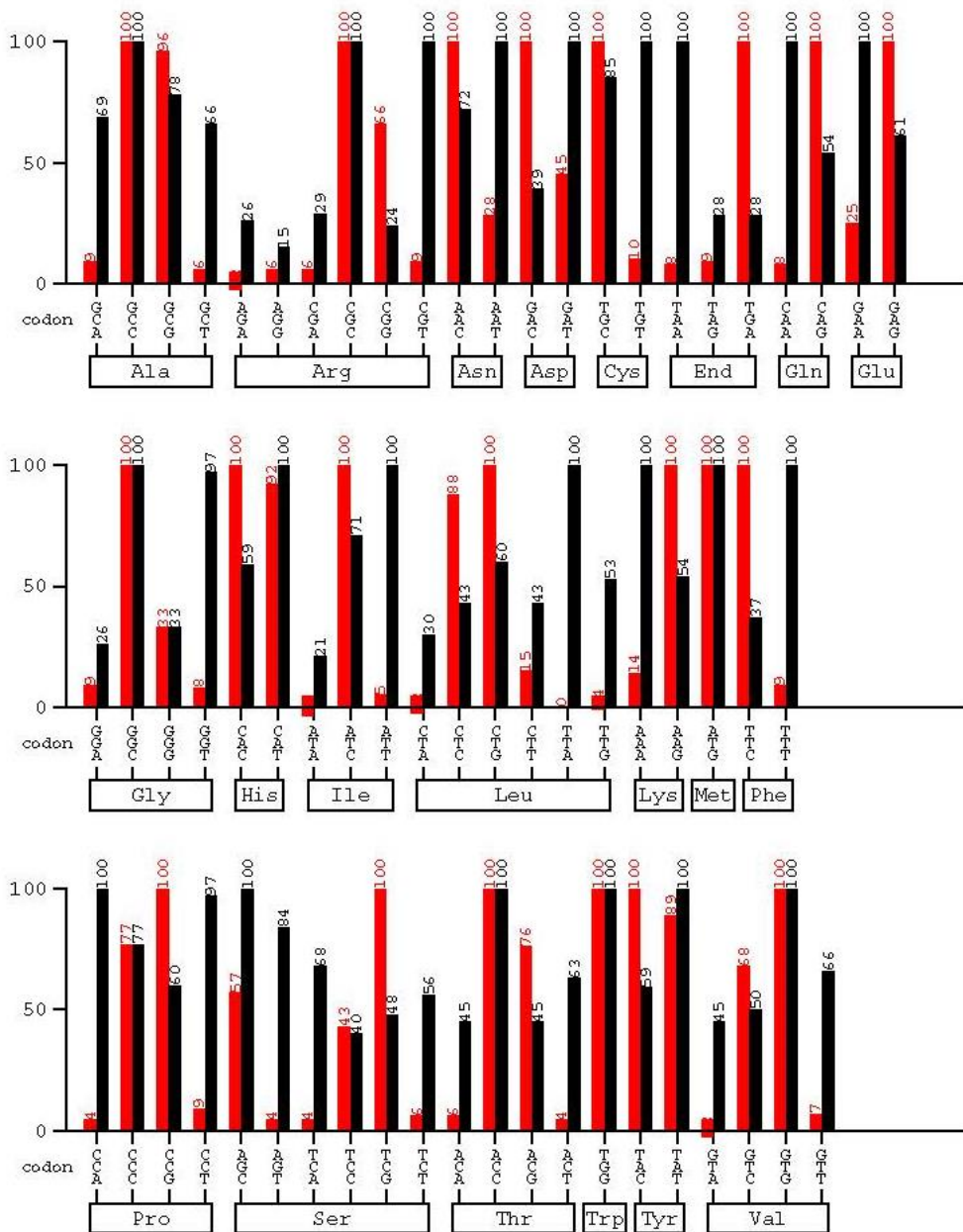


Abb. A 1: Vergleich der Codon-Nutzung von *R. sphaeroides* und *S. oneidensis*. Dargestellt ist die relative Häufigkeit an vorkommenden Codons in annotierten Genen im Genom von *R. sphaeroides* 2.4.1 (rot) und *S. oneidensis* MR-1 (schwarz).

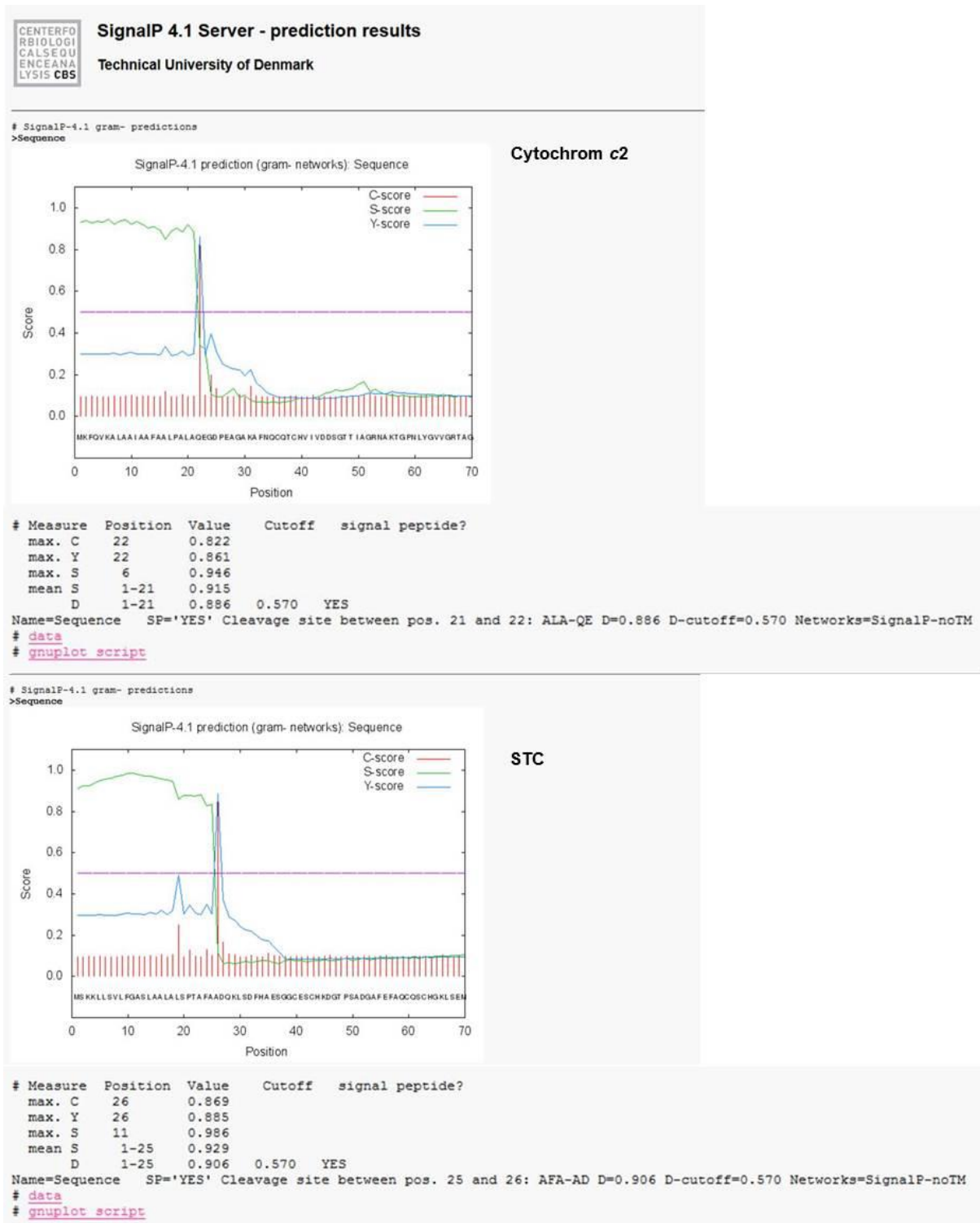


Abb. A 2: Detektion der Sekretionssequenzen von Cytochrom *c2* aus *R. sphaeroides* und STC aus *S. oneidensis*. Mit der Signalsequenzanalyse-Software SignalP 4.1 wurden die theoretischen Aminosäurepositionen für die Abspaltung der jeweiligen Sekretionssequenz ermittelt. Diese befanden sich bei Cytochrom *c2* zwischen AS 21 und 22 bzw. zwischen AS 25 und 26 bei STC. Die Aminosäuresequenz vom N-Terminus bis zur Schnittstelle wurde als Sekretionssequenz angenommen.

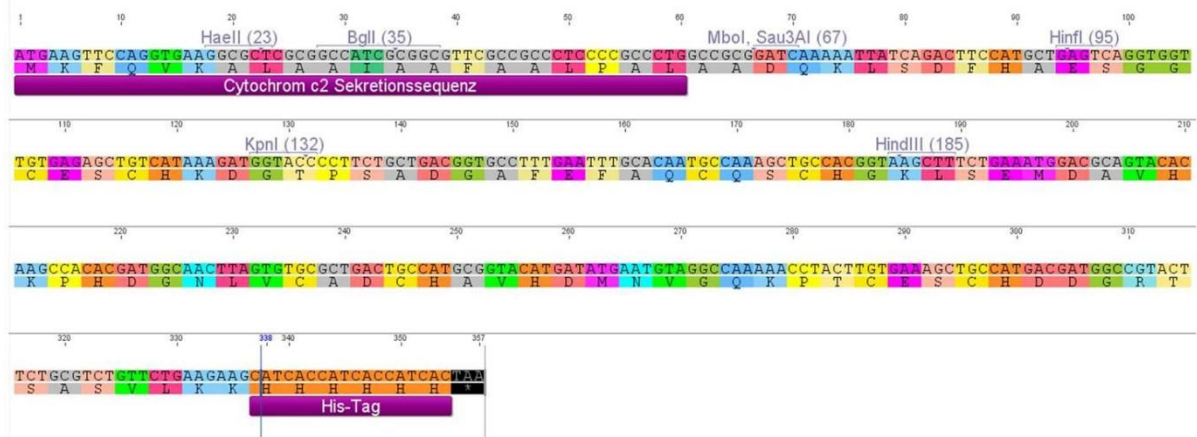
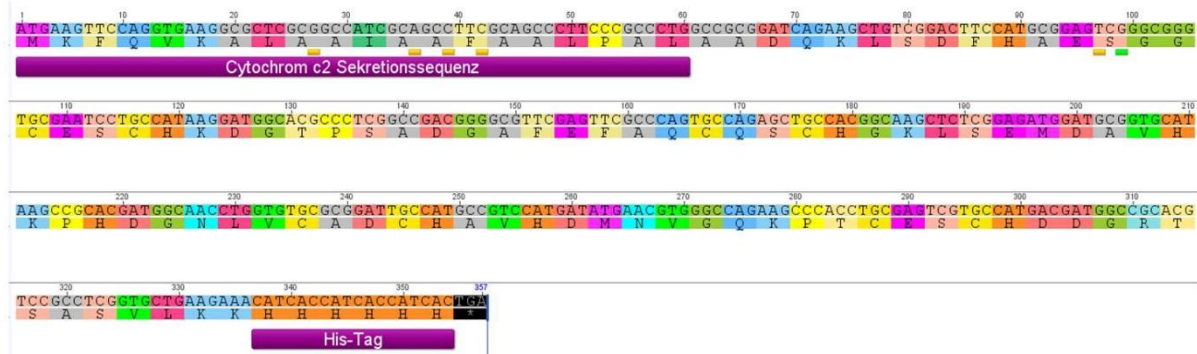
a) *stc* mit Cytochrom *c2* Sekretionssequenzb) *stc* mit Cytochrom *c2* Sekretionssequenz - Codon-optimiert

Abb. A 3: Sequenz des modifizierten *stc* vor und nach erfolgter Codon-Optimierung. a) *stc* wurde mit der Sekretionssequenz des Cytochroms *c2* aus *R. sphaeroides* versehen und eine Sequenz für einen C-terminalen His-Tag eingefügt. b) Anschließend wurde die Gesamtsequenz Codon-optimiert.

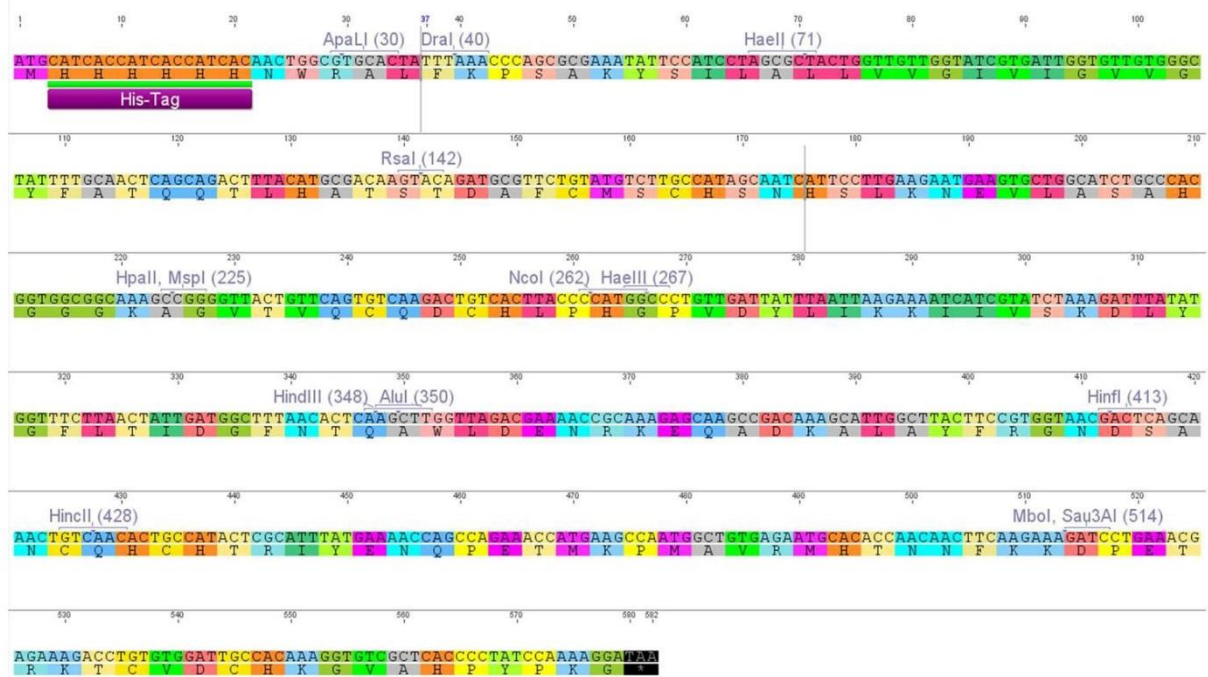
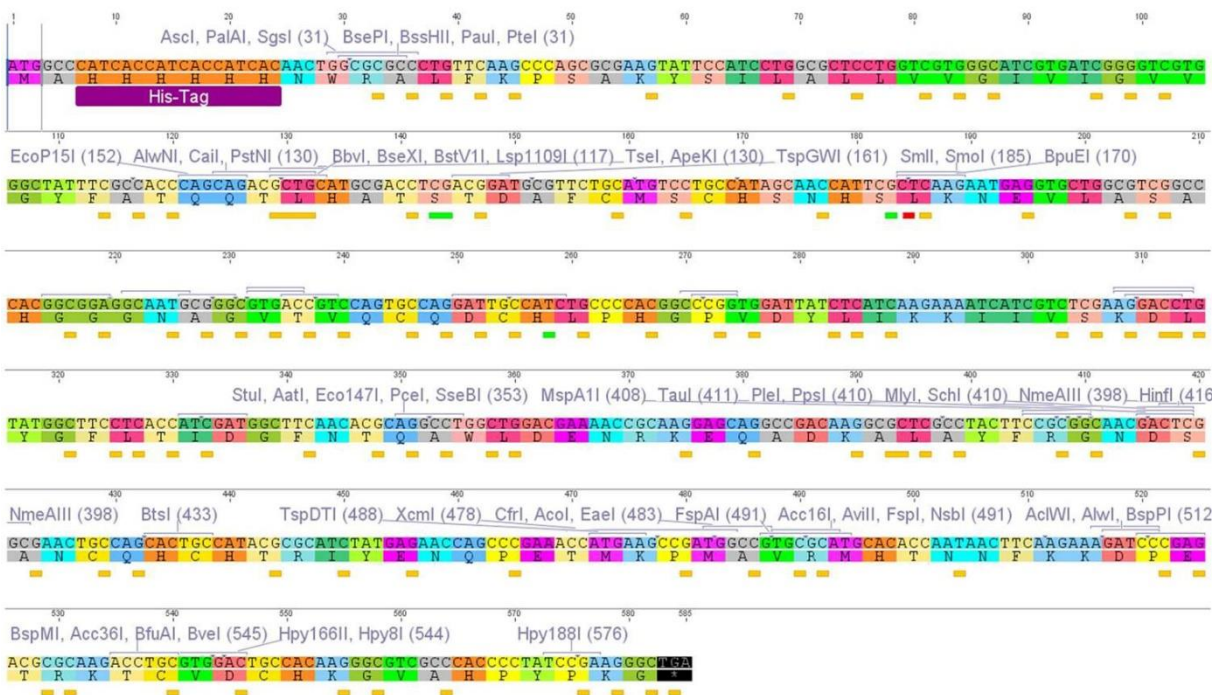
a) *cymA*b) *cymA* - Codon-optimiert

Abb. A 4: Sequenz des modifizierten *stc* vor und nach erfolgter Codon-Optimierung. a) *cymA* wurde mit der Sequenz für einen N-terminalen His-Tag versehen. b) Anschließend wurde die Gesamtsequenz Codon-optimiert.

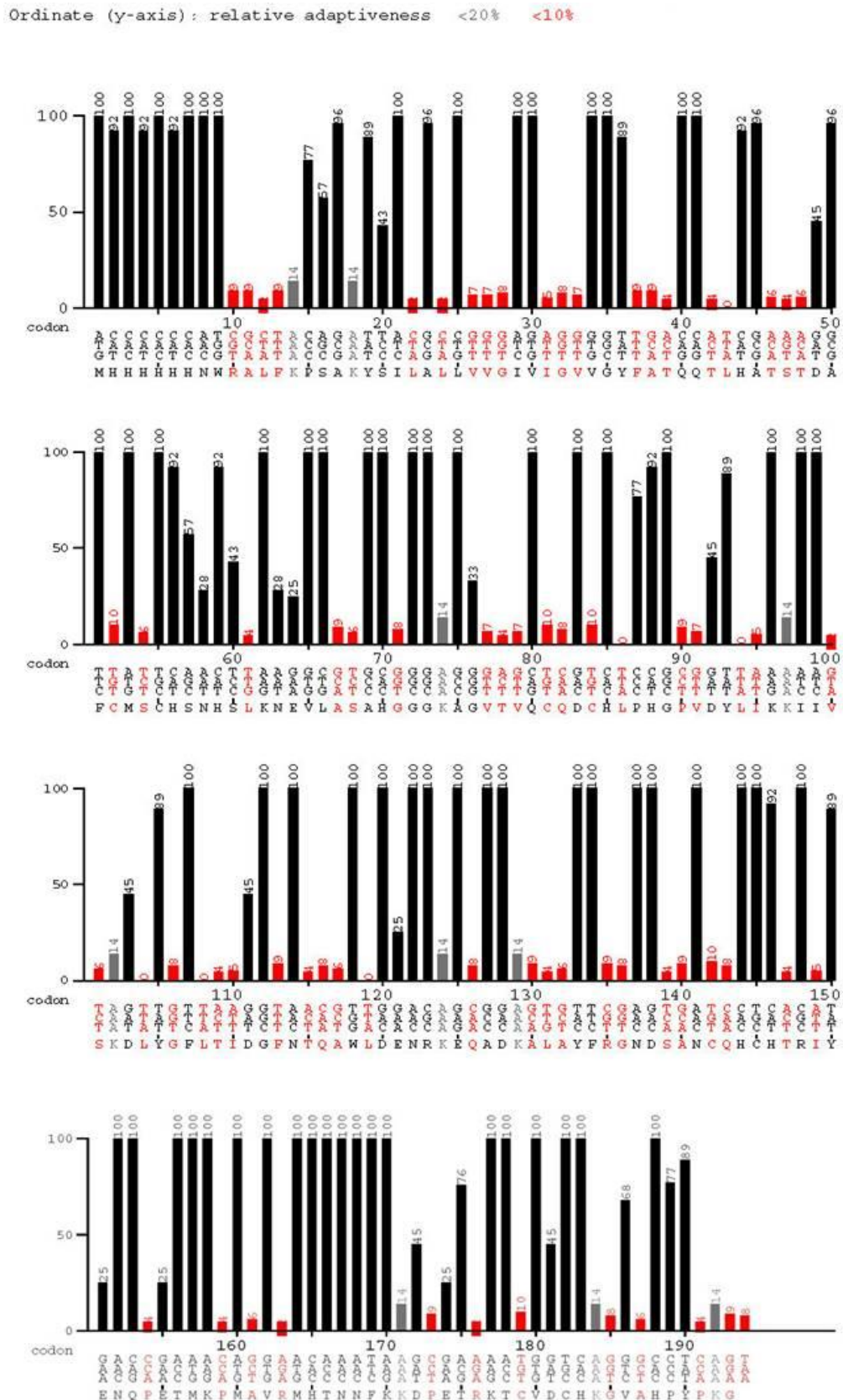
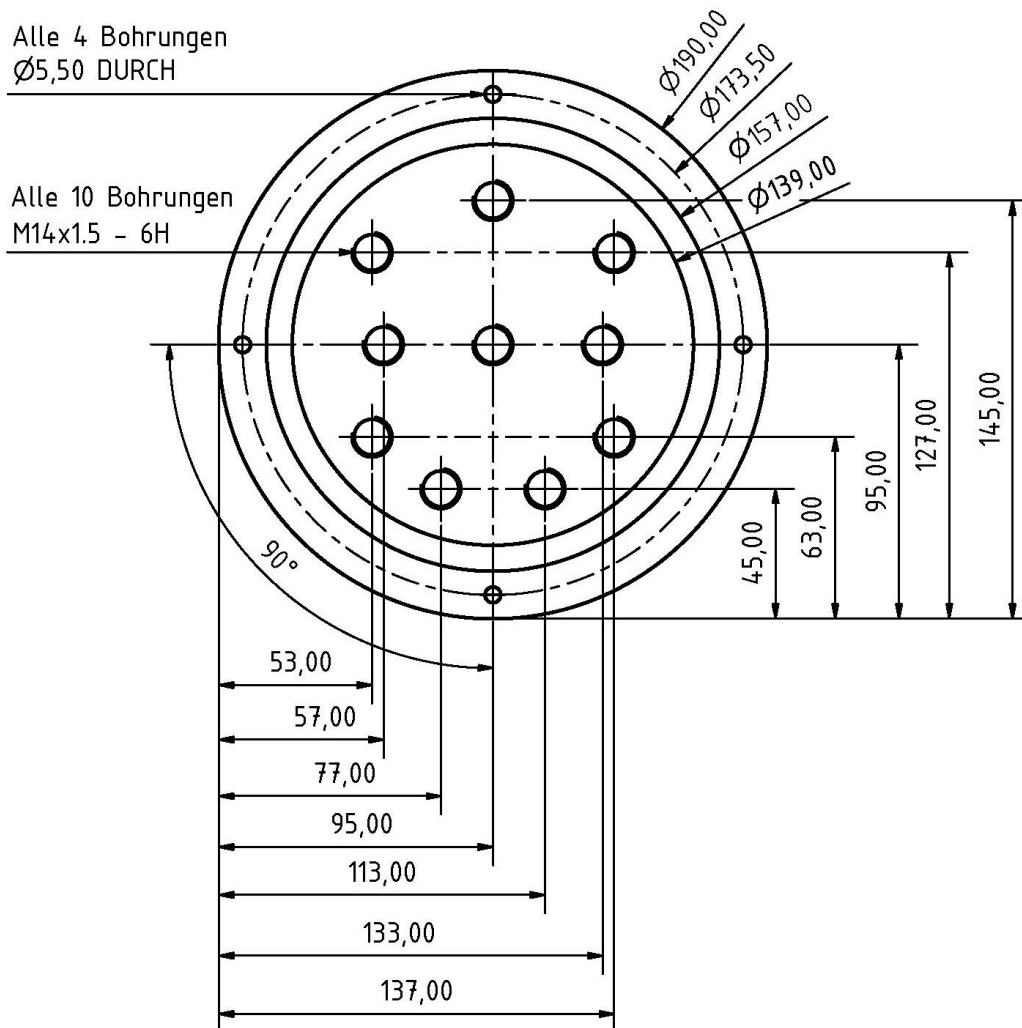


Abb. A 7: Analyse der Codon-Nutzung von *cymA* vor der Optimierung. Dargestellt ist die relative Anpassung einzelner Codons von *cymA* an die Codons der annotierten Gene im Genom von *R. sphaeroides* 2.4.1. Die in grau dargestellten Balken entsprechen einer Anpassung <15 %, die in rot dargestellten Balken einer Anpassung <10 %.

2 Technische Zeichnungen der entwickelten BES

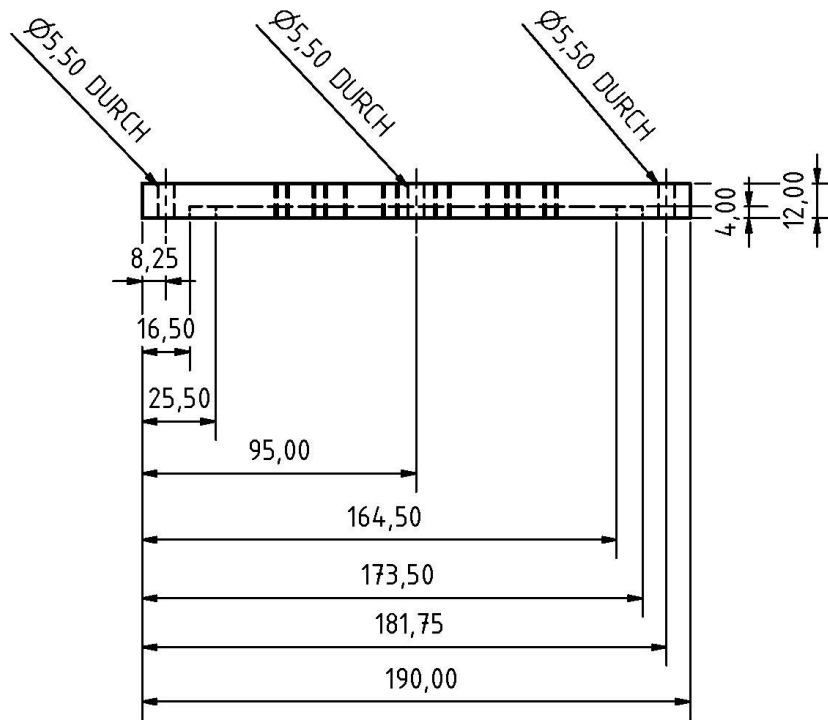
2.1 M3C mit 2000 ml Arbeitsvolumen (Version A)

Ansicht unten

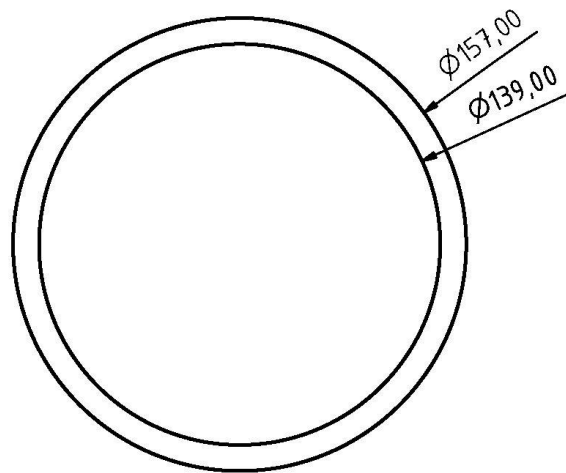
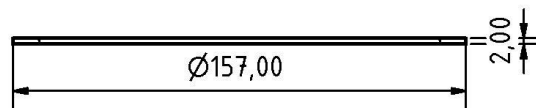


Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Deckel
Material	Polycarbonat 12 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	1 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht vorne

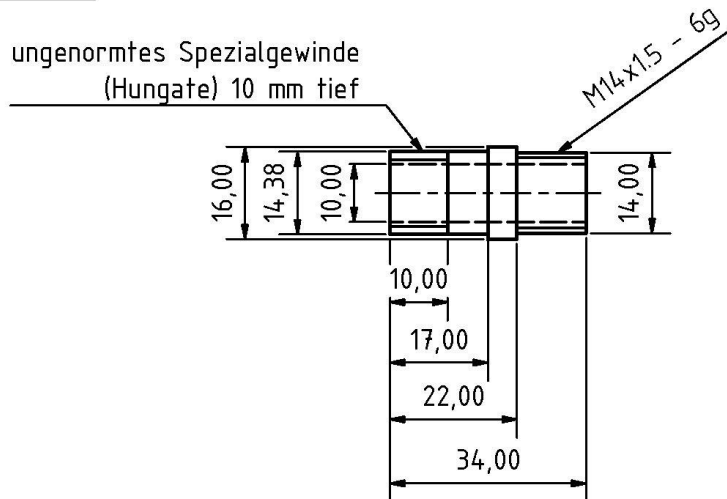


Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Deckel
Material	Polycarbonat 12 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	1 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

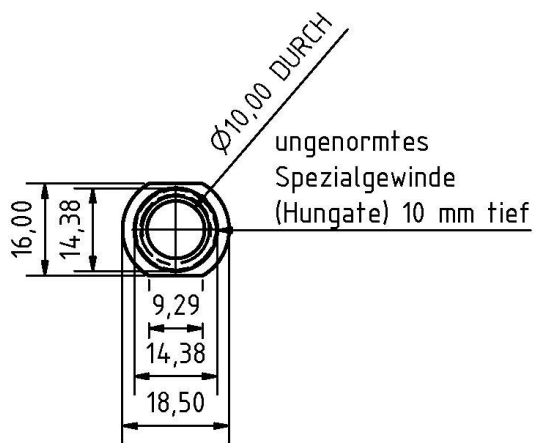
Ansicht obenAnsicht vorne

Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Deckeldichtung
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	2 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

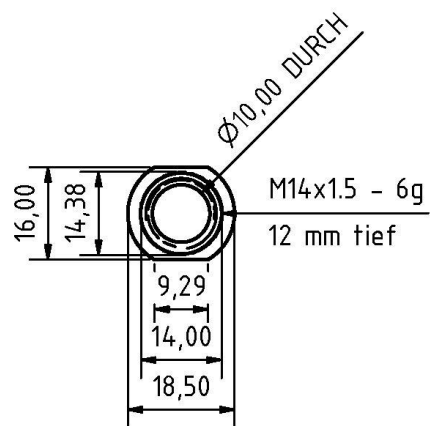
Ansicht vorne



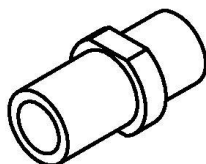
Ansicht links



Ansicht rechts

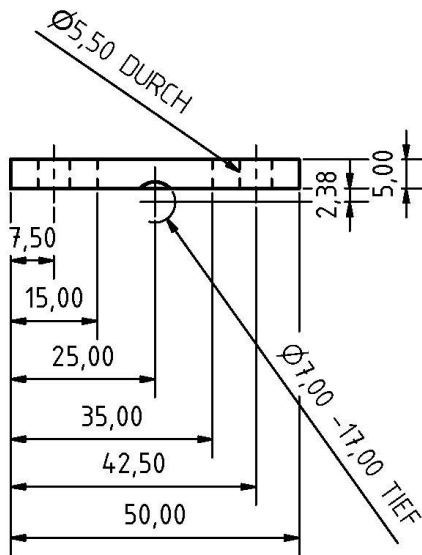


Ansicht ISO links

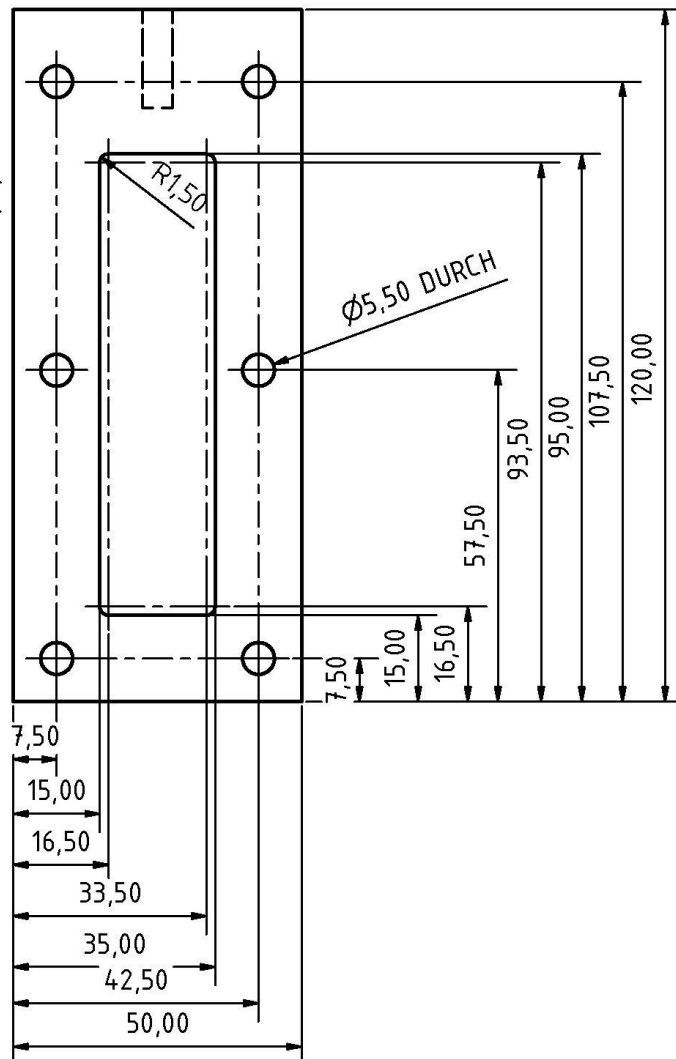


Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Schraubadapter
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	3 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht hinten

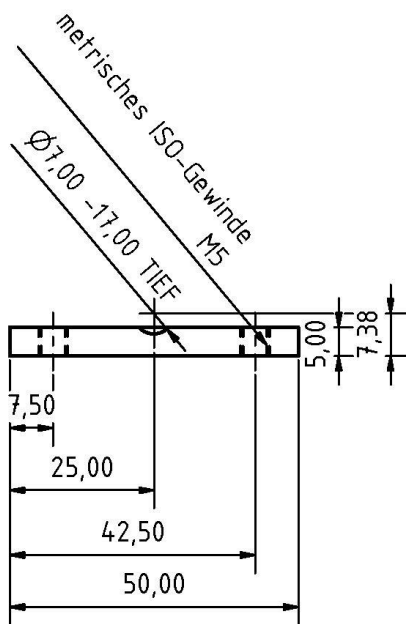


Ansicht oben

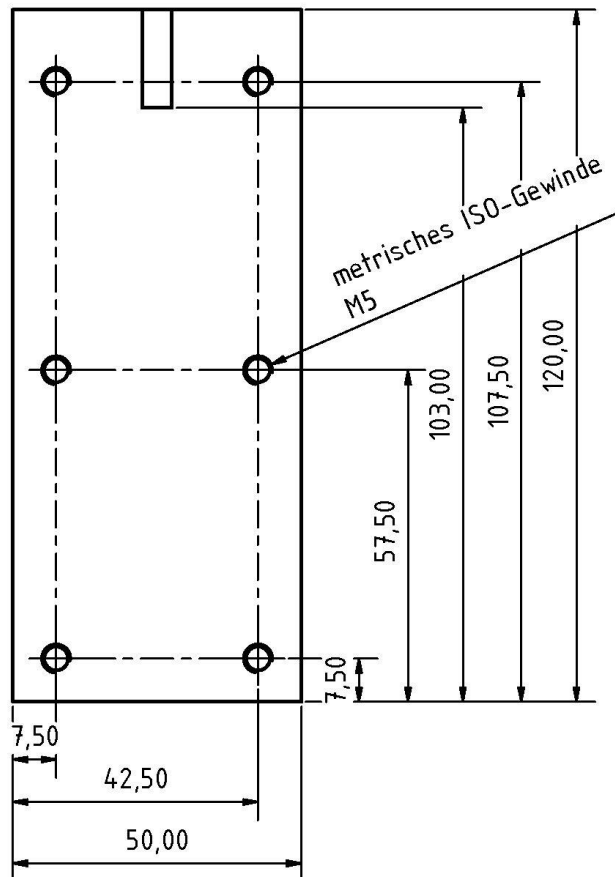


Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Arbeitselektrodenhalter Fassung
Material	Polycarbonat 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	4 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

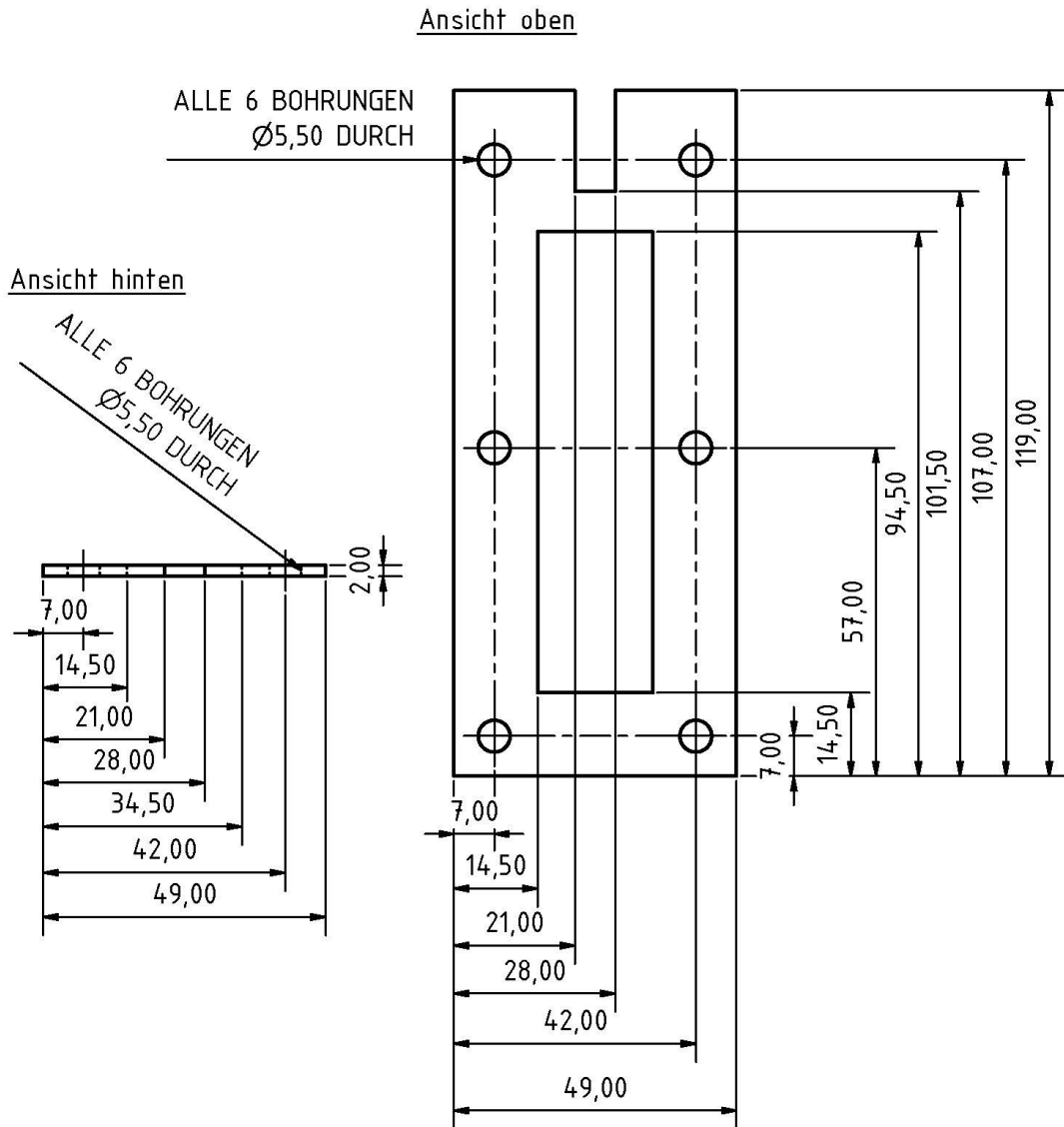
Ansicht hinten



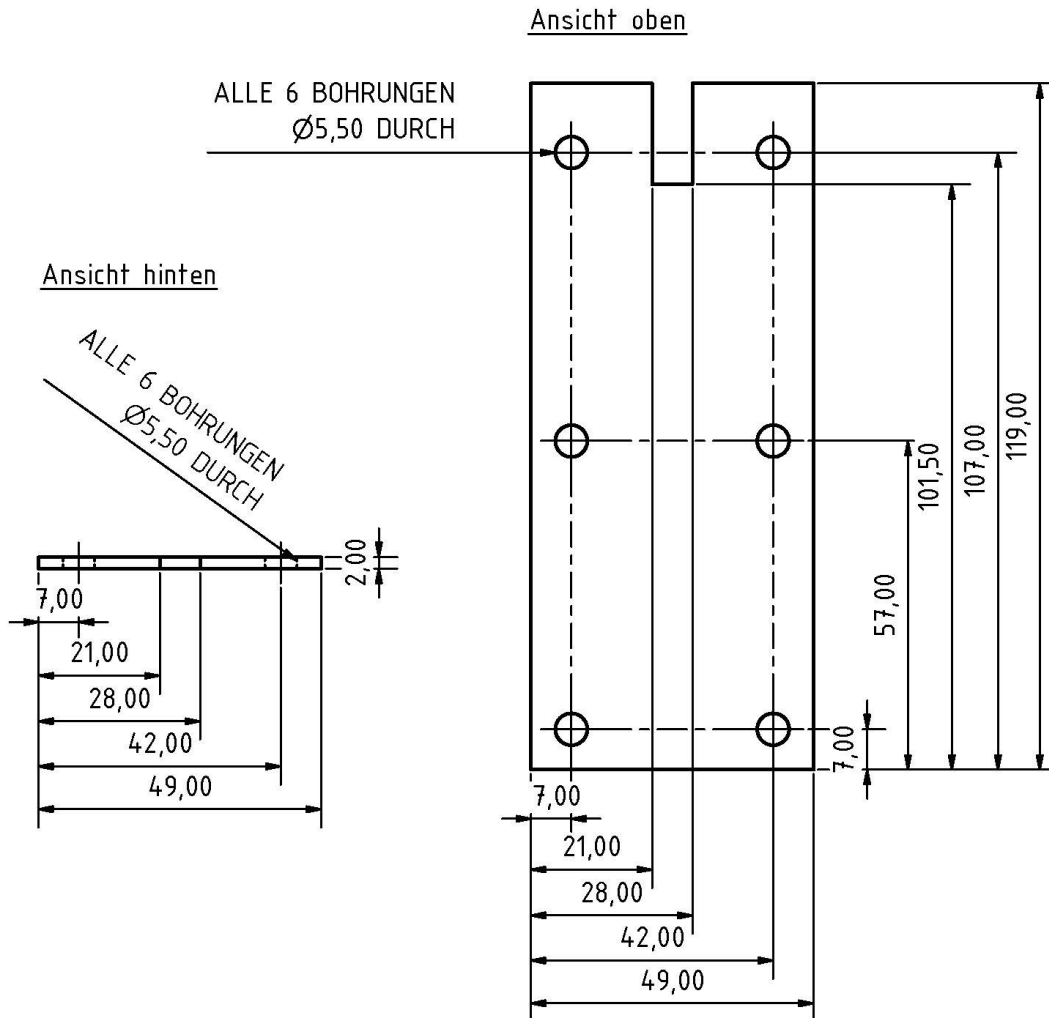
Ansicht oben



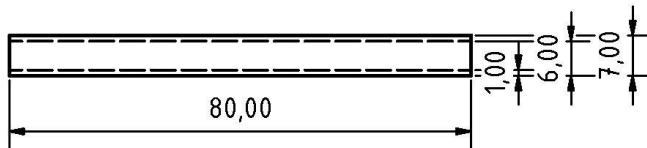
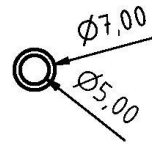
Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Arbeitselektrodenh. Grundplatte
Material	Polycarbonat 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	5 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	



Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Dichtung Arbeitselekt. Fassung
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	6 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

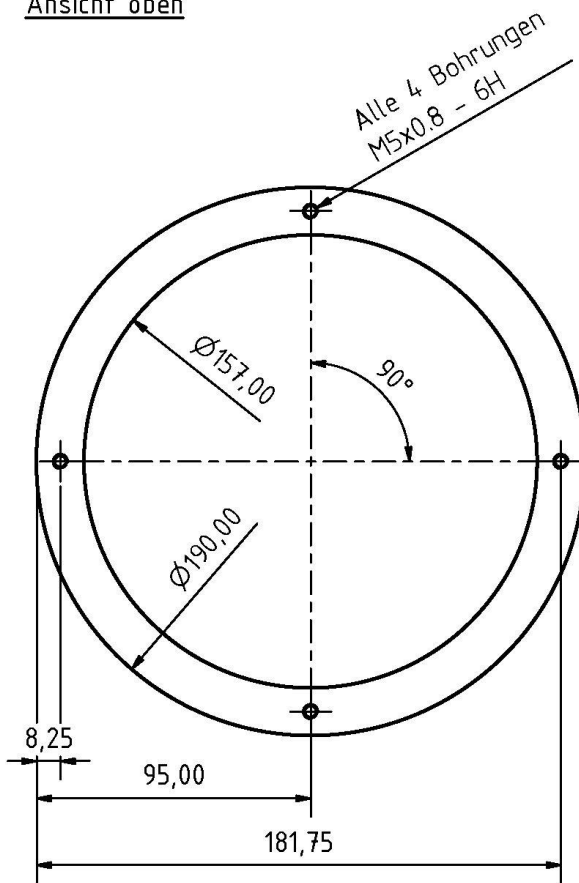


Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Dichtung Arbeitselekt. Grundpl.
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	7 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

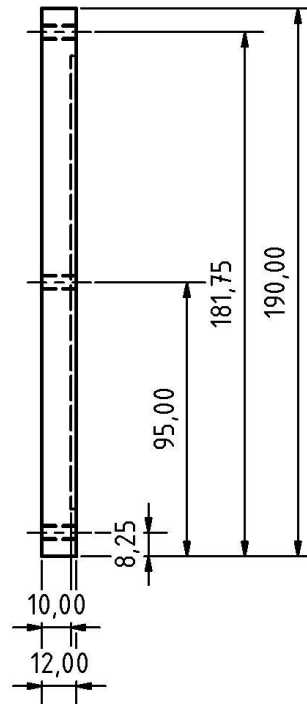
Ansicht obenAnsicht links

Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Arbeitselektrodenh. Halterung
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	8 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

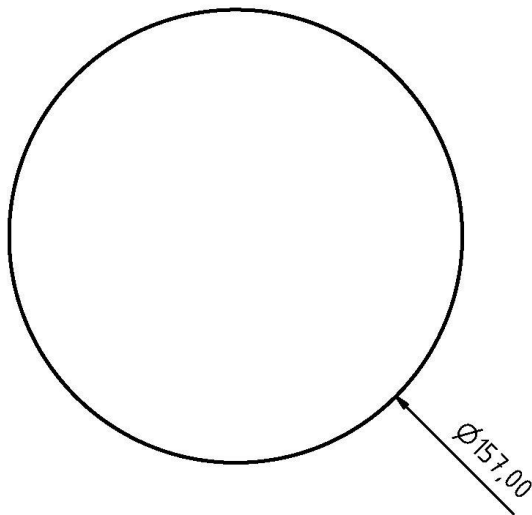
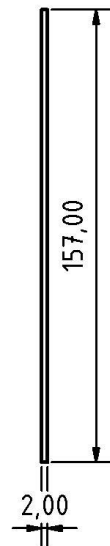
Ansicht oben



Ansicht links

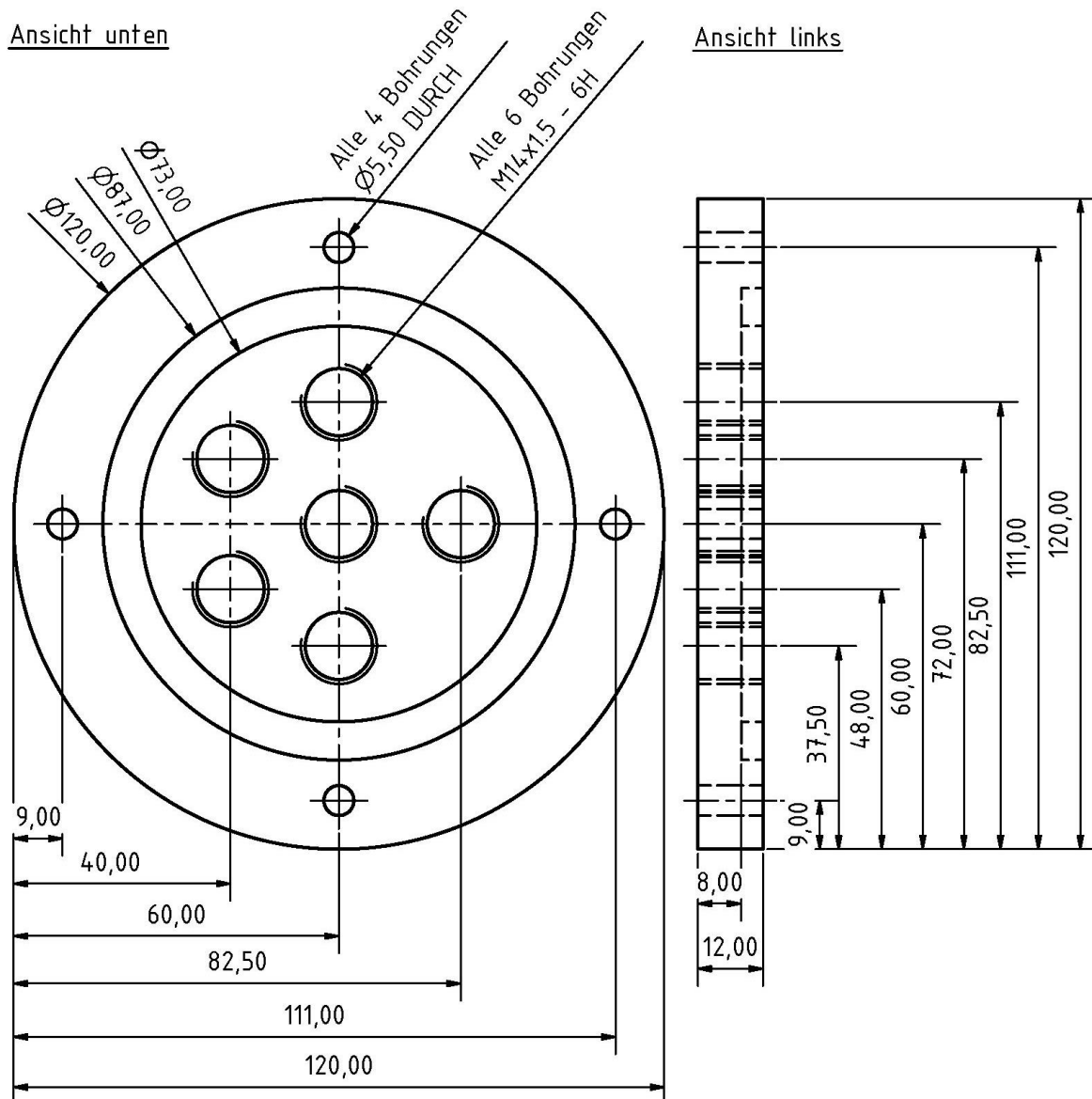


Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Bodenplatte
Material	Polycarbonat 12 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	9 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

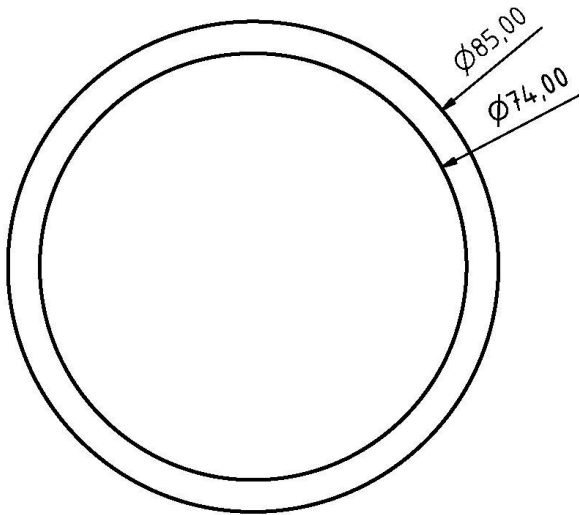
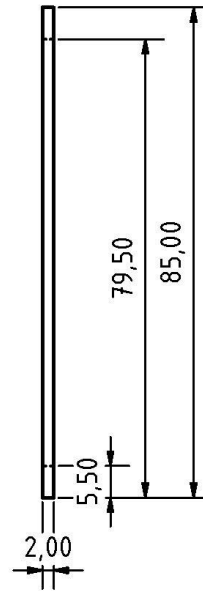
Ansicht obenAnsicht links

Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Bodenplatte
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	10 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

2.2 M3C mit 280 ml Arbeitsvolumen (Version B)

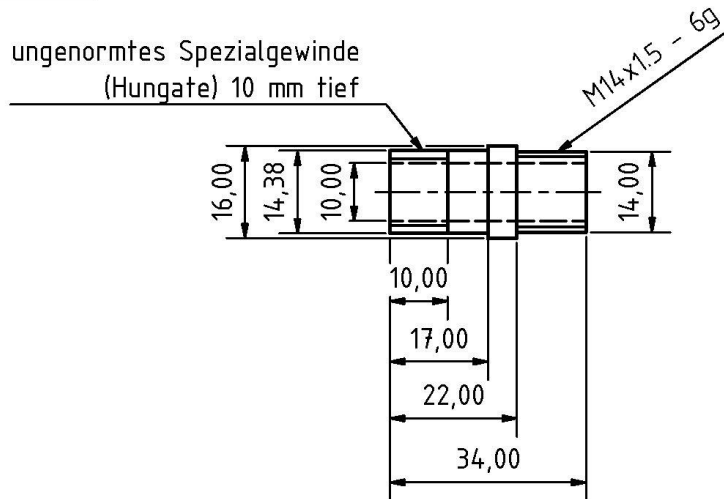


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Deckel
Material	Polycarbonat 12 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	1 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

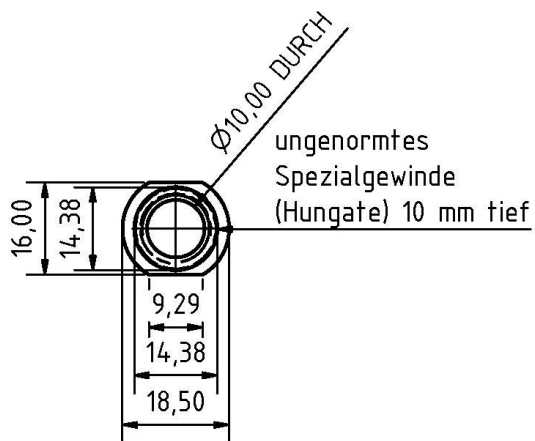
Ansicht obenAnsicht links

Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Deckeldichtung
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	2 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

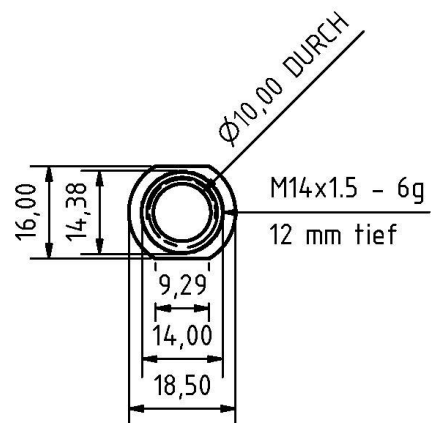
Ansicht vorne



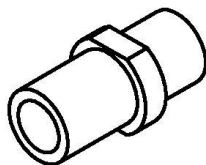
Ansicht links



Ansicht rechts



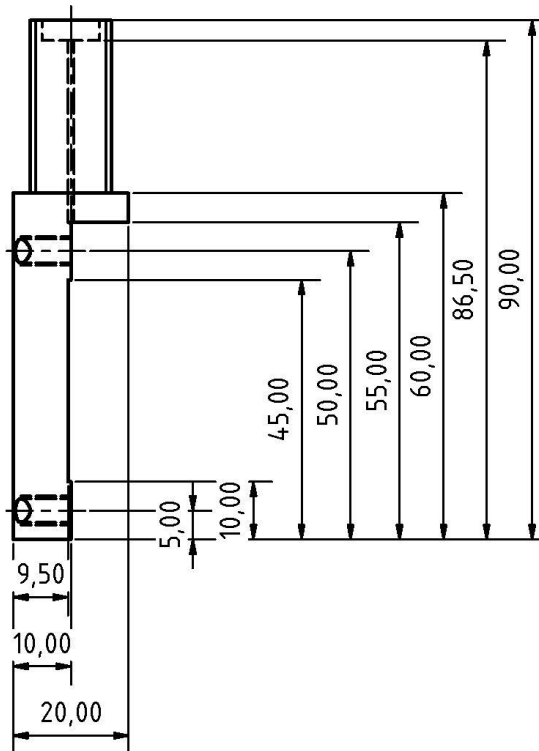
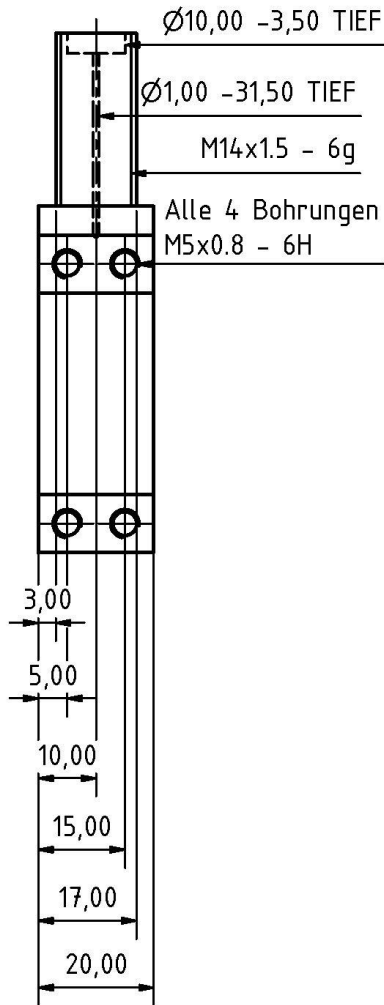
Ansicht ISO links



Bauteil	M3C 2000 ml Version A
Komponente	Schraubadapter
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	3 / 10
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

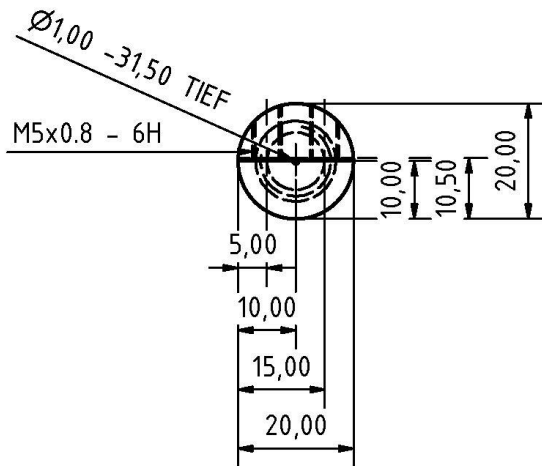
Ansicht oben

Ansicht links

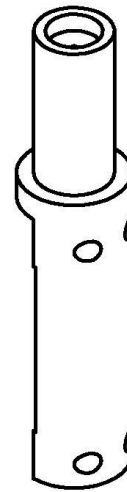


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Arbeitselektrodenhalter
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	4 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

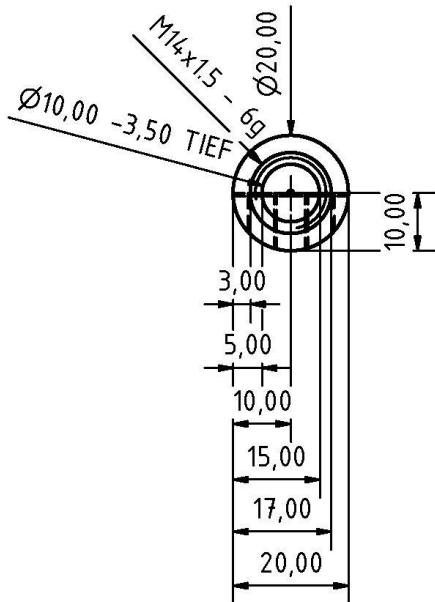
Ansicht unten



Ansicht ISO
oben rechts

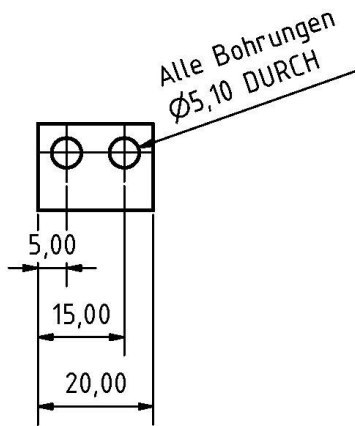


Ansicht oben

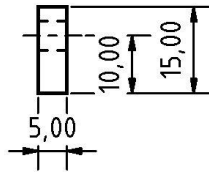


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Arbeitselektrodenhalter
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	4 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

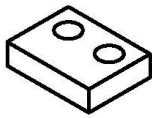
Ansicht oben



Ansicht links

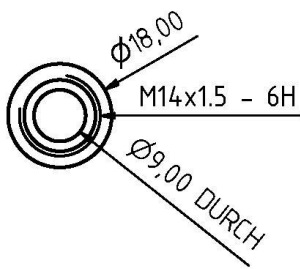


Ansicht ISO
oben rechts

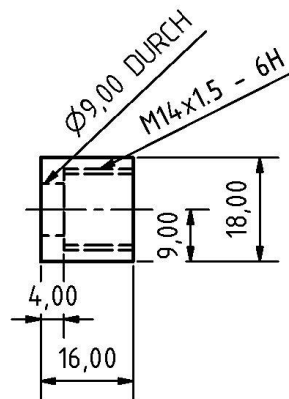


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Arbeitselektrodenh. Klemmplatte
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	5 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht unten



Ansicht links

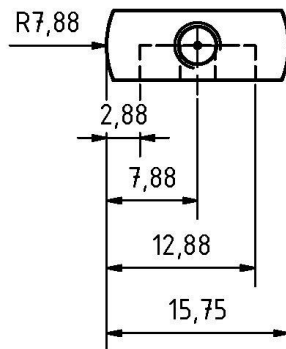


Ansicht ISO
oben rechts

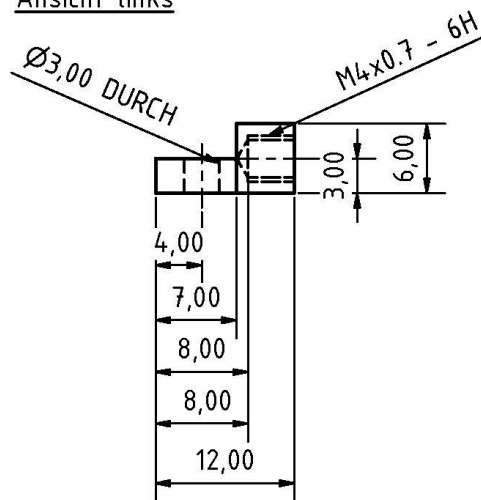


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Schraubdeckel M14 x 1,5
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	6 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

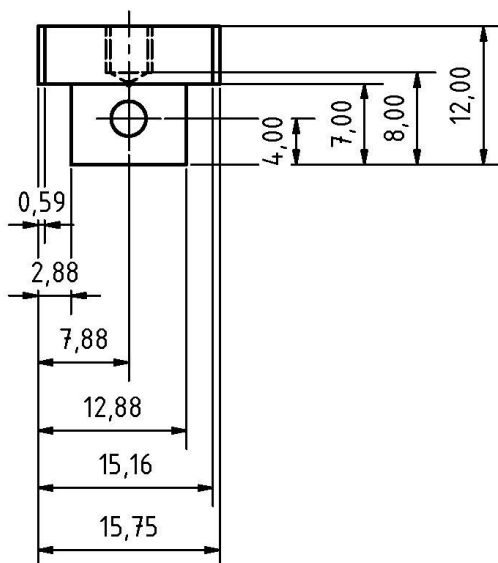
Ansicht oben



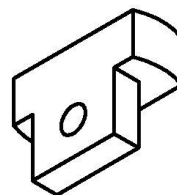
Ansicht links



Ansicht hinten

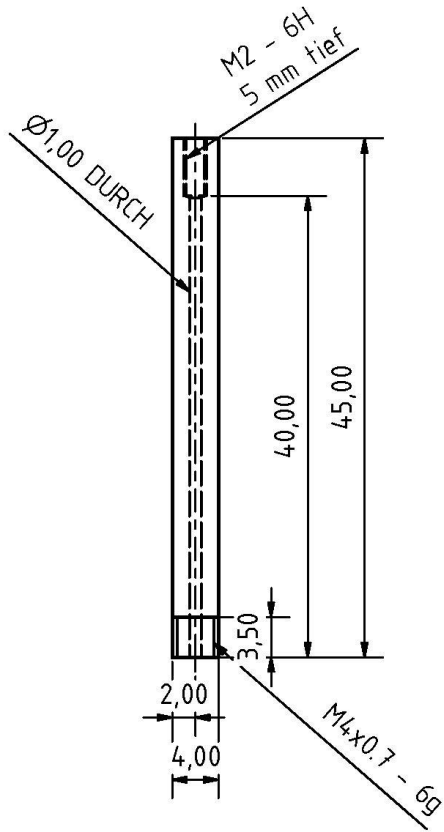


Ansicht ISO unten rechts

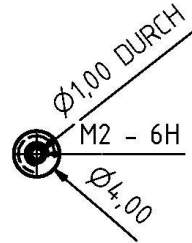


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Gegenelektrodenh. Grundkörper
Material	PTFE
Maßstab	2 : 1
Komponenten-Nr.	7 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht vorne



Ansicht oben

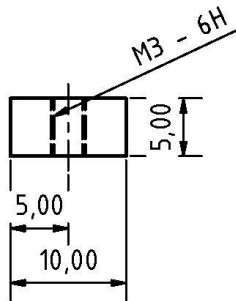


Ansicht ISO oben rechts

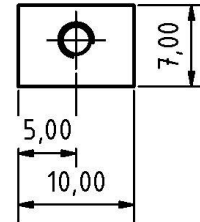


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Gegenelektrodenh. Stab
Material	PTFE
Maßstab	2 : 1
Komponenten-Nr.	8 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

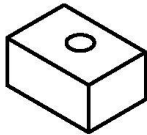
Ansicht vorne



Ansicht oben

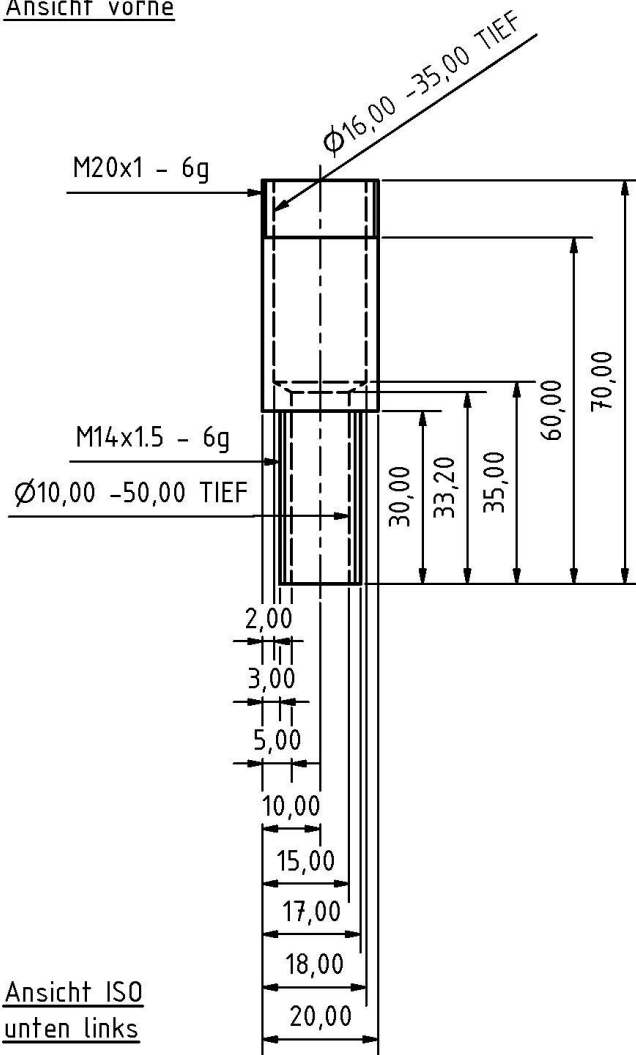


Ansicht ISO oben rechts

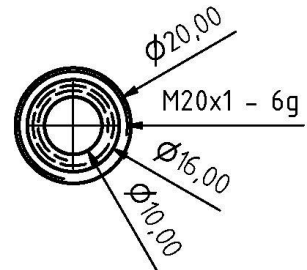


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Gegenelektrodenh. Klemmplatte
Material	PTFE
Maßstab	2 : 1
Komponenten-Nr.	9 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

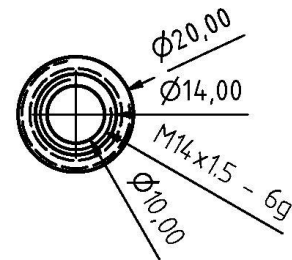
Ansicht vorne



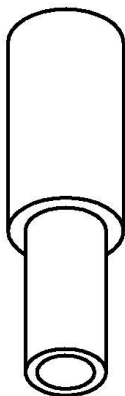
Ansicht oben



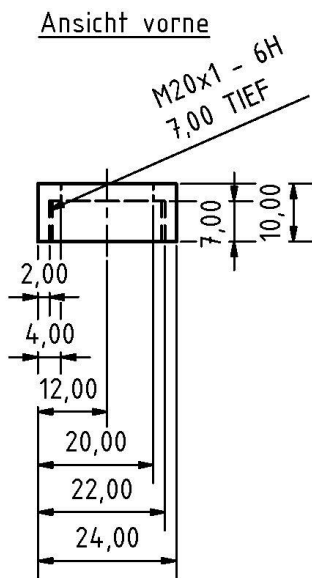
Ansicht unten



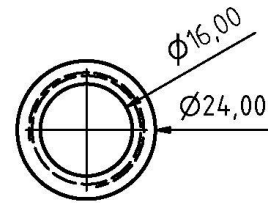
Ansicht ISO unten links



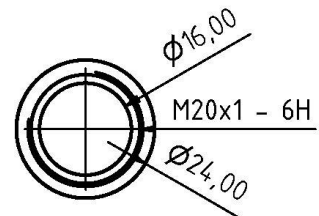
Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Gegenelektrodenkompartiment
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	10 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	



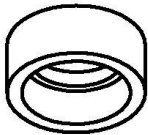
Ansicht oben



Ansicht unten

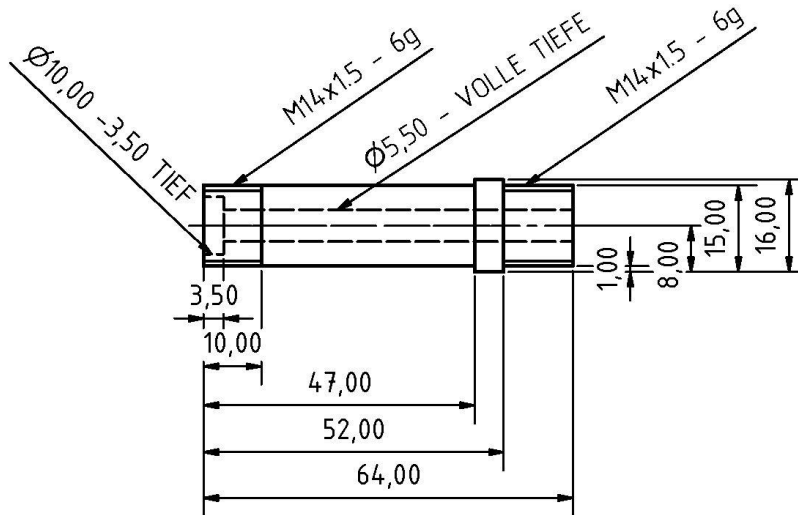


Ansicht ISO
unten links

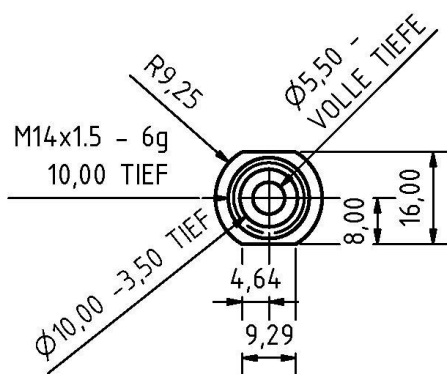


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Gegenelektr. Membranspanner
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	11 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

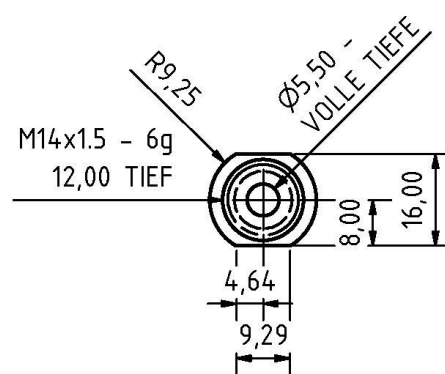
Ansicht vorne



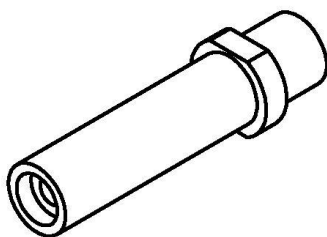
Ansicht links



Ansicht rechts

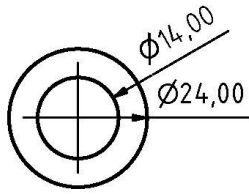


Ansicht ISO
unten links

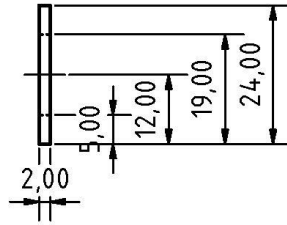


Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Bezugselektrodenhalter
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	12 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

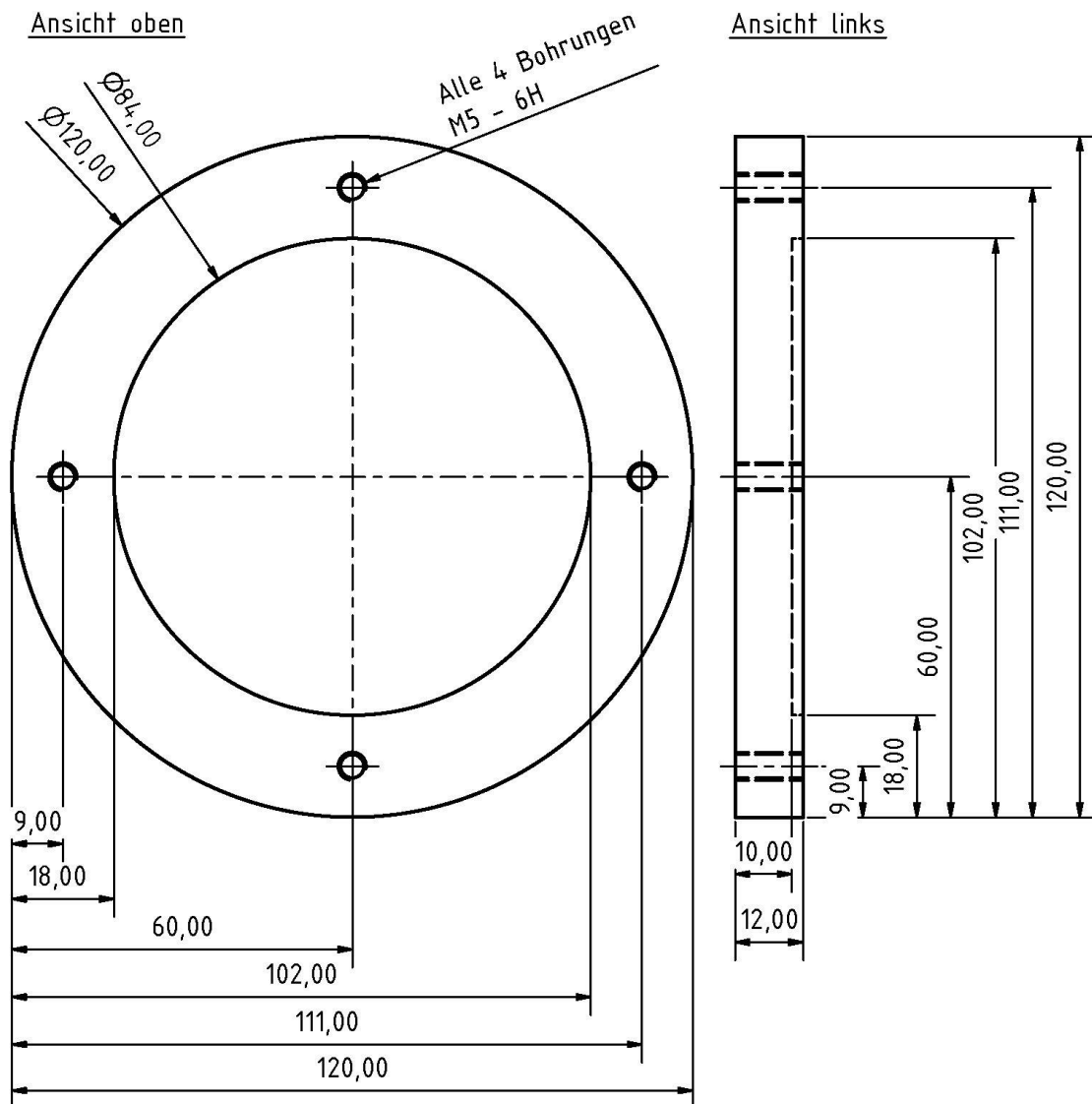
Ansicht oben



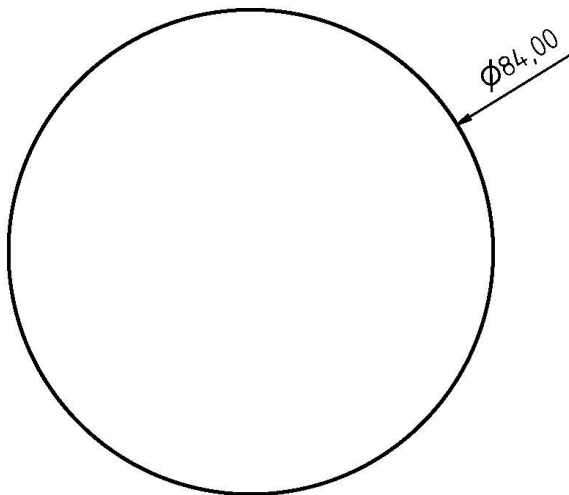
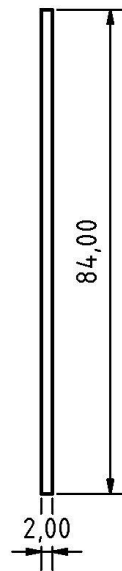
Ansicht links



Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Dichtung für Schraubelemente
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	13 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	



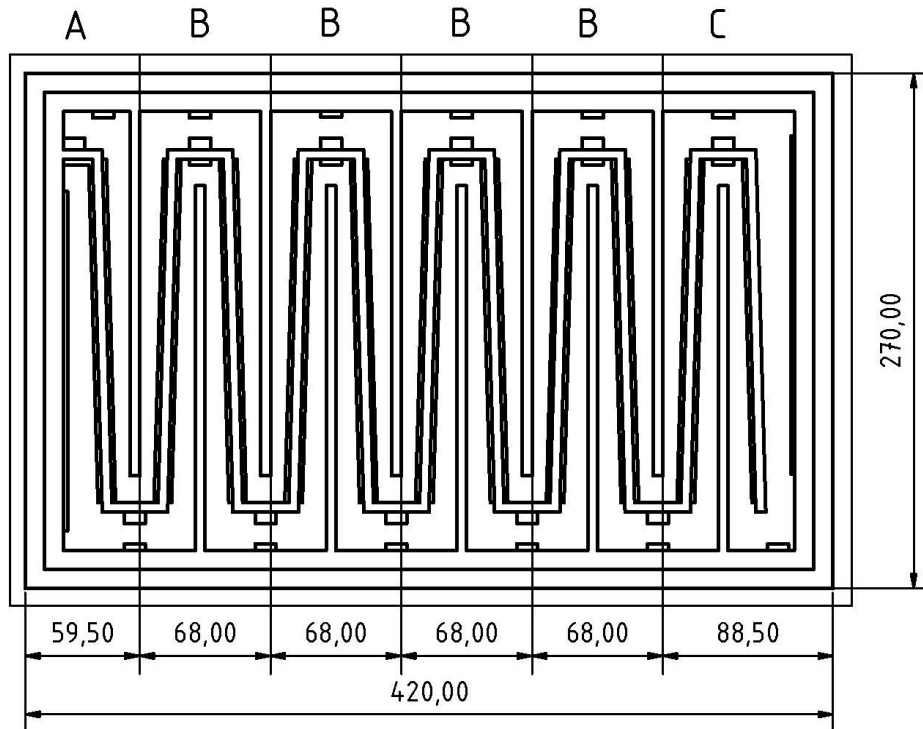
Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Bodenplatte
Material	Polycarbonat 12 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	14 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht obenAnsicht links

Bauteil	M3C 280 ml Version B
Komponente	Bodenplattendichtung
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	15 / 15
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

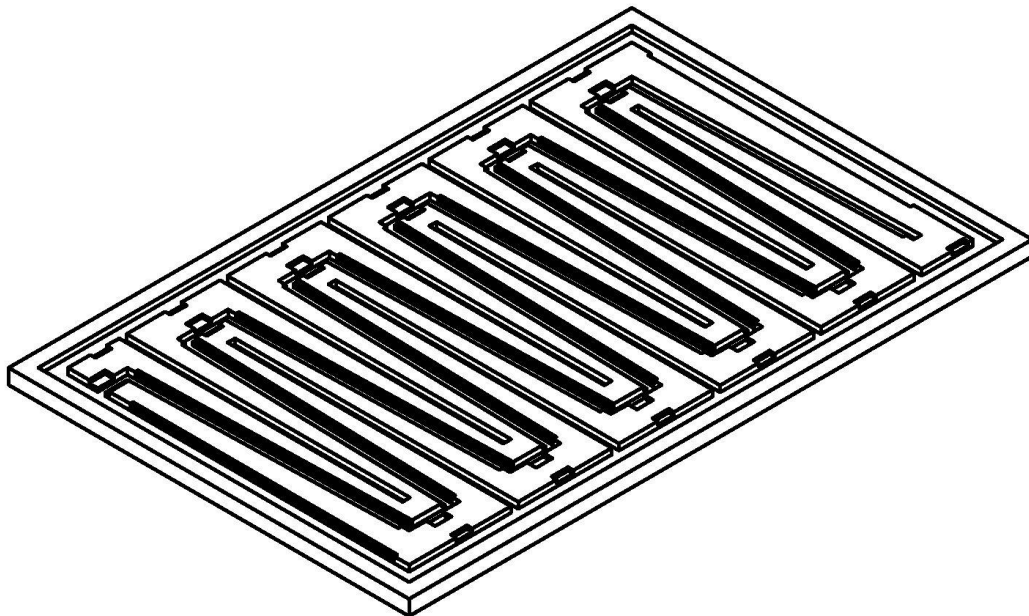
2.2 BES für die Abwasserbehandlung

Ansicht oben (mit Darstellungsabschnitten A-C)



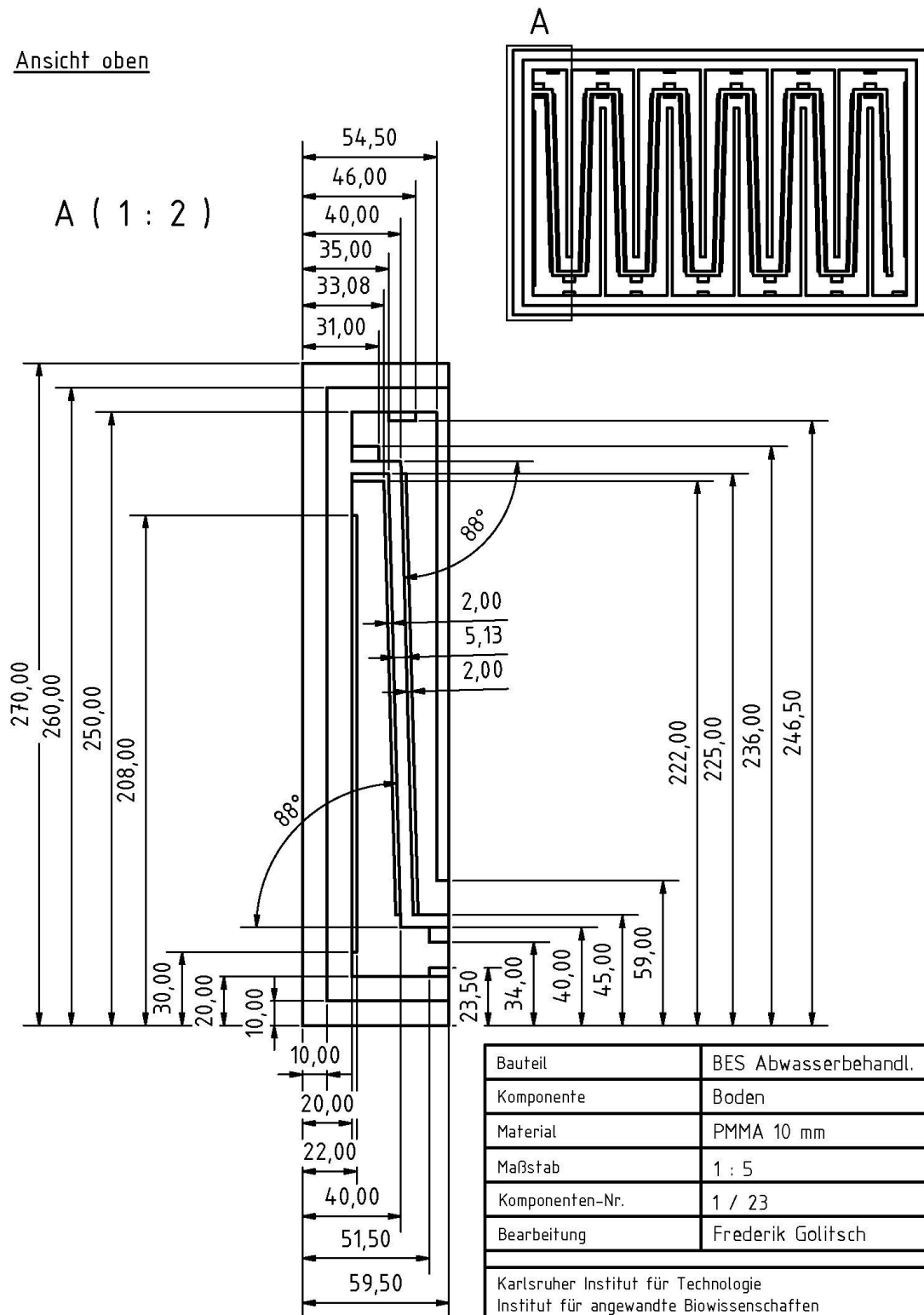
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Boden
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 3
Komponenten-Nr.	1 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht ISO oben links



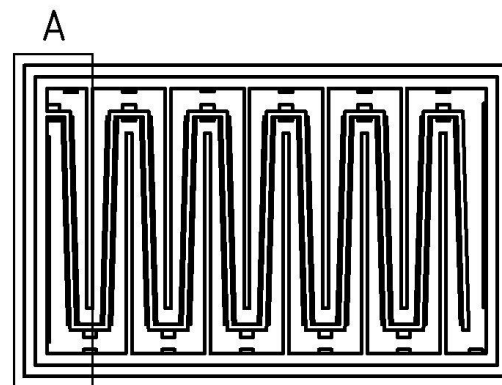
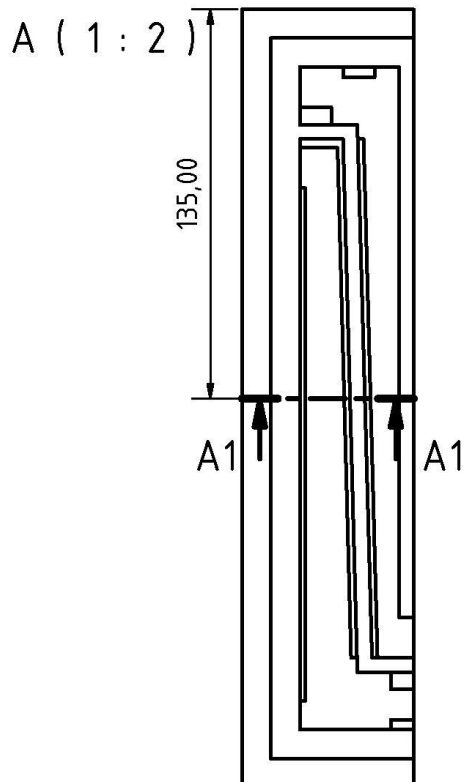
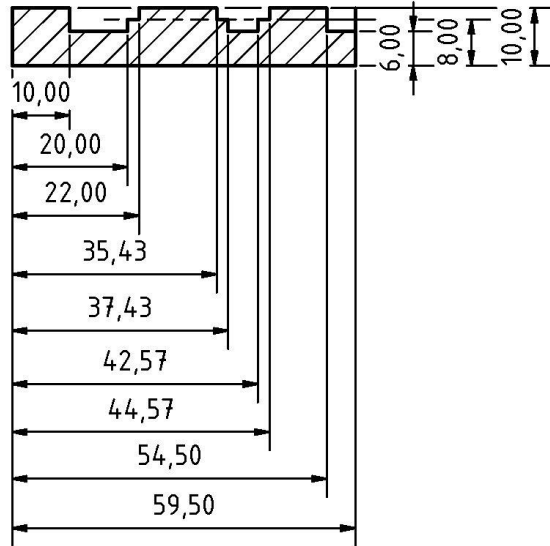
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Boden
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2,75
Komponenten-Nr.	1 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht oben



Ansicht Schnitt 1 von Ausschnitt A

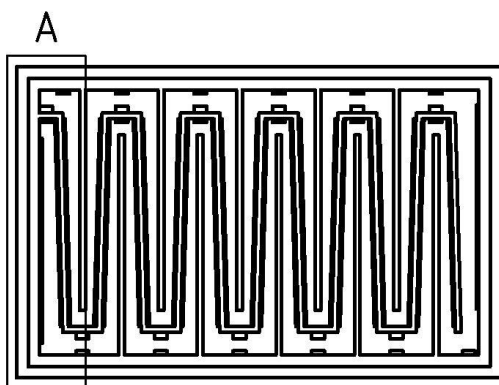
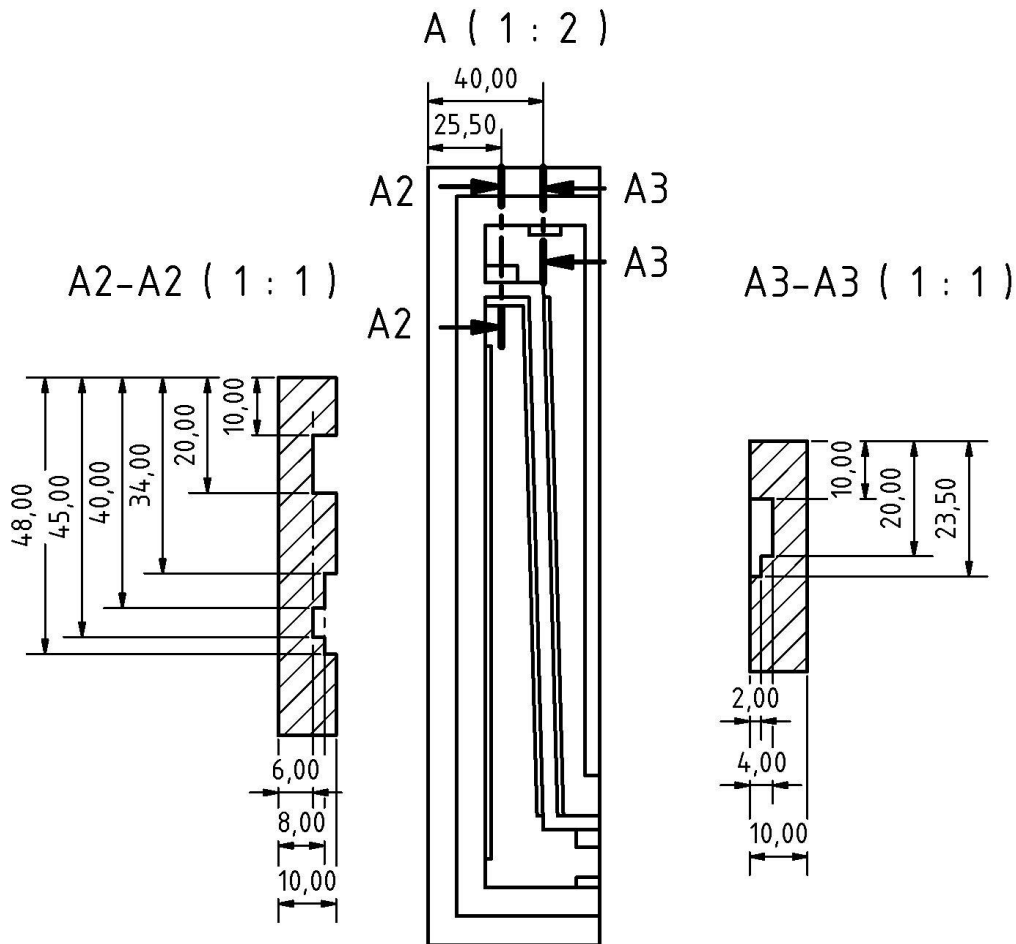
A1-A1 (1 : 1)



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Boden
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	1 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht Schnitt 2
von Ausschnitt A

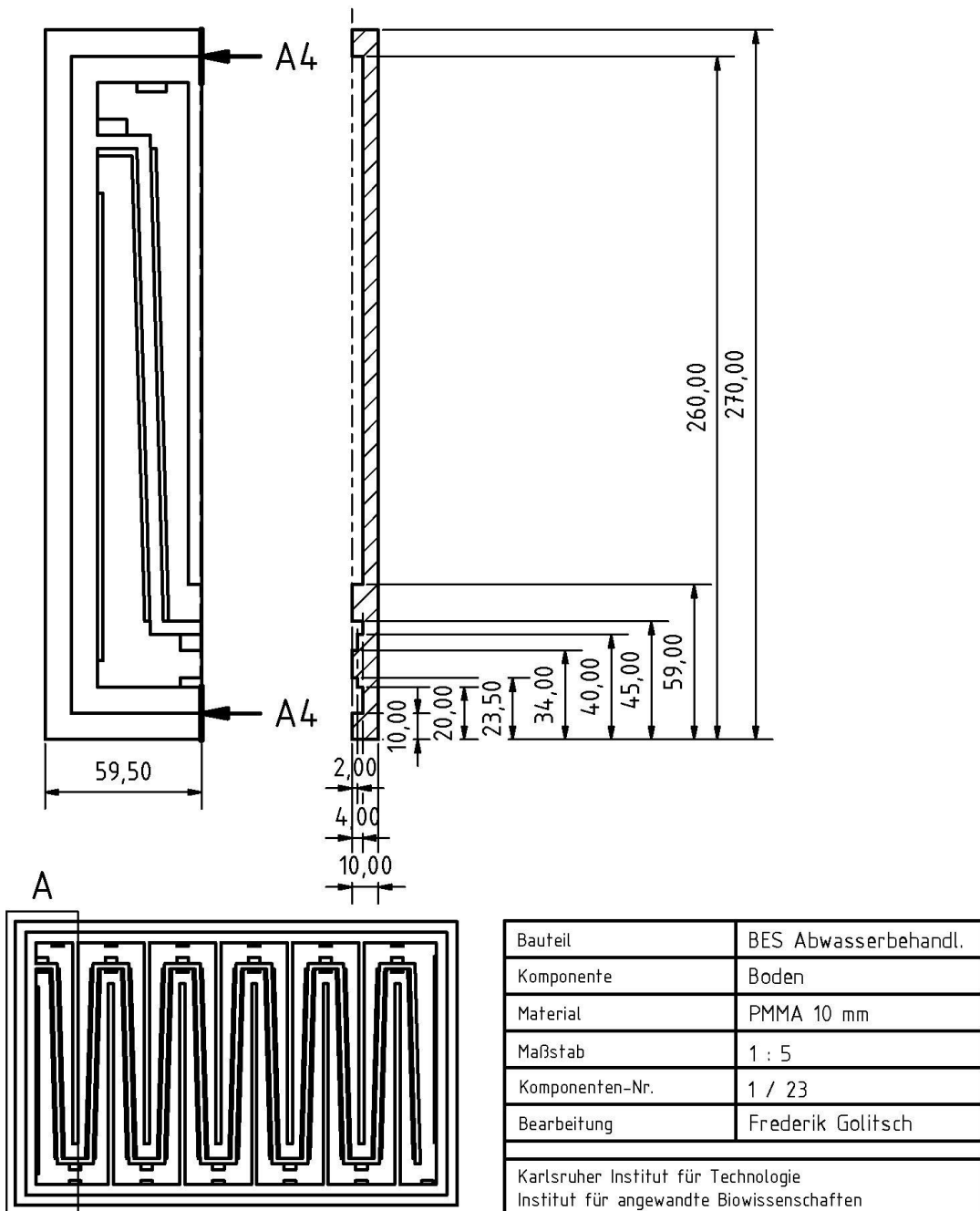
Ansicht Schnitt 3
von Ausschnitt A



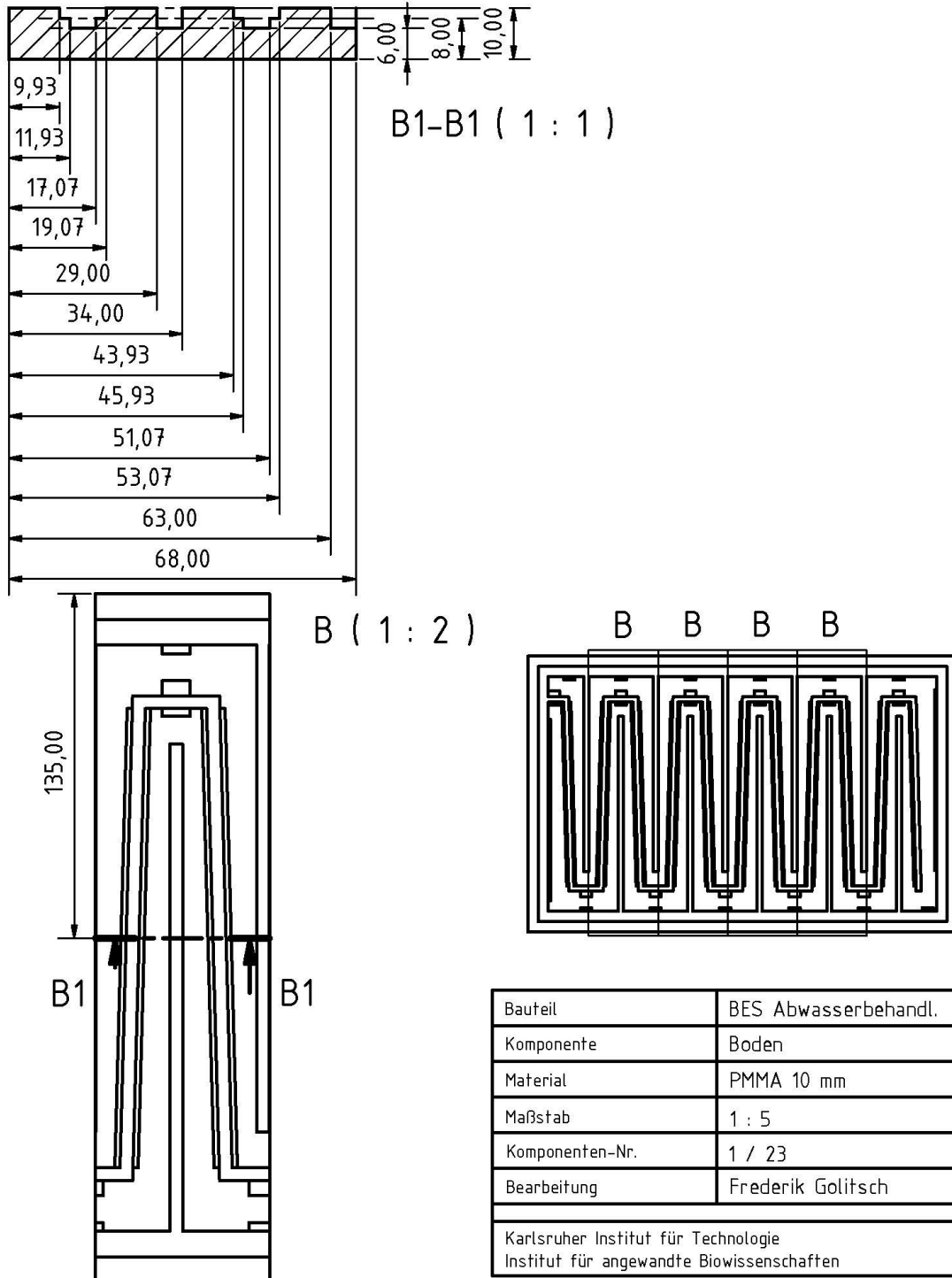
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Boden
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	1 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht Schnitt 4
von Ausschnitt A

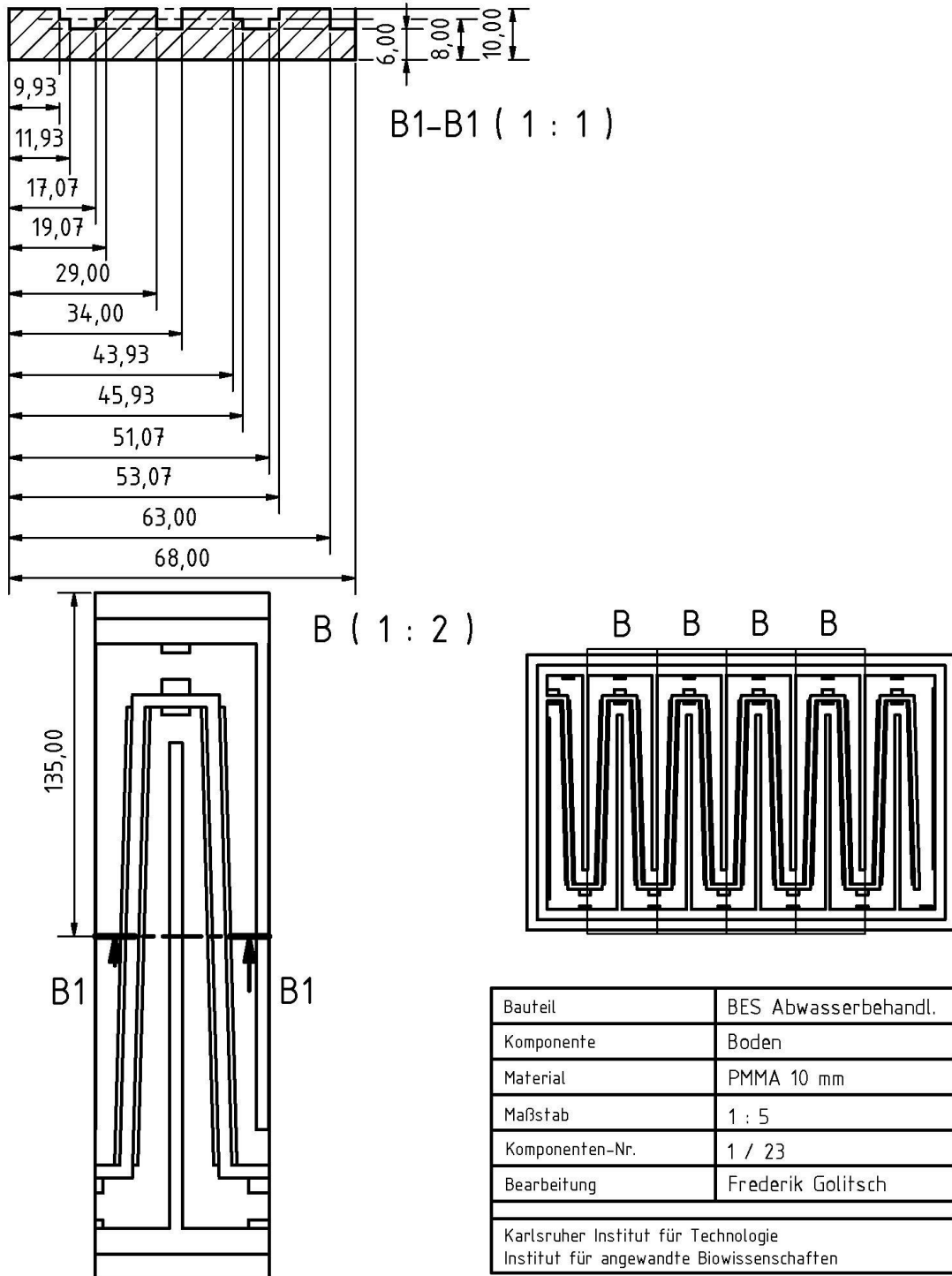
A (1 : 2) A4 (1 : 2)



Ansicht Schnitt 1 von Abschnitt B

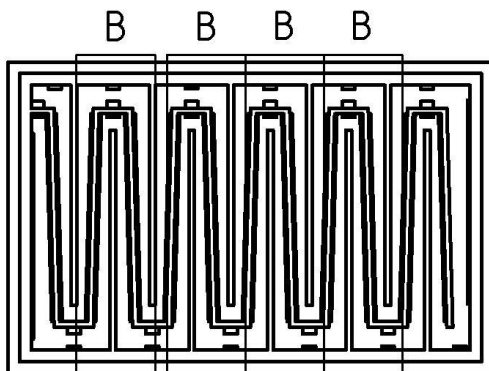
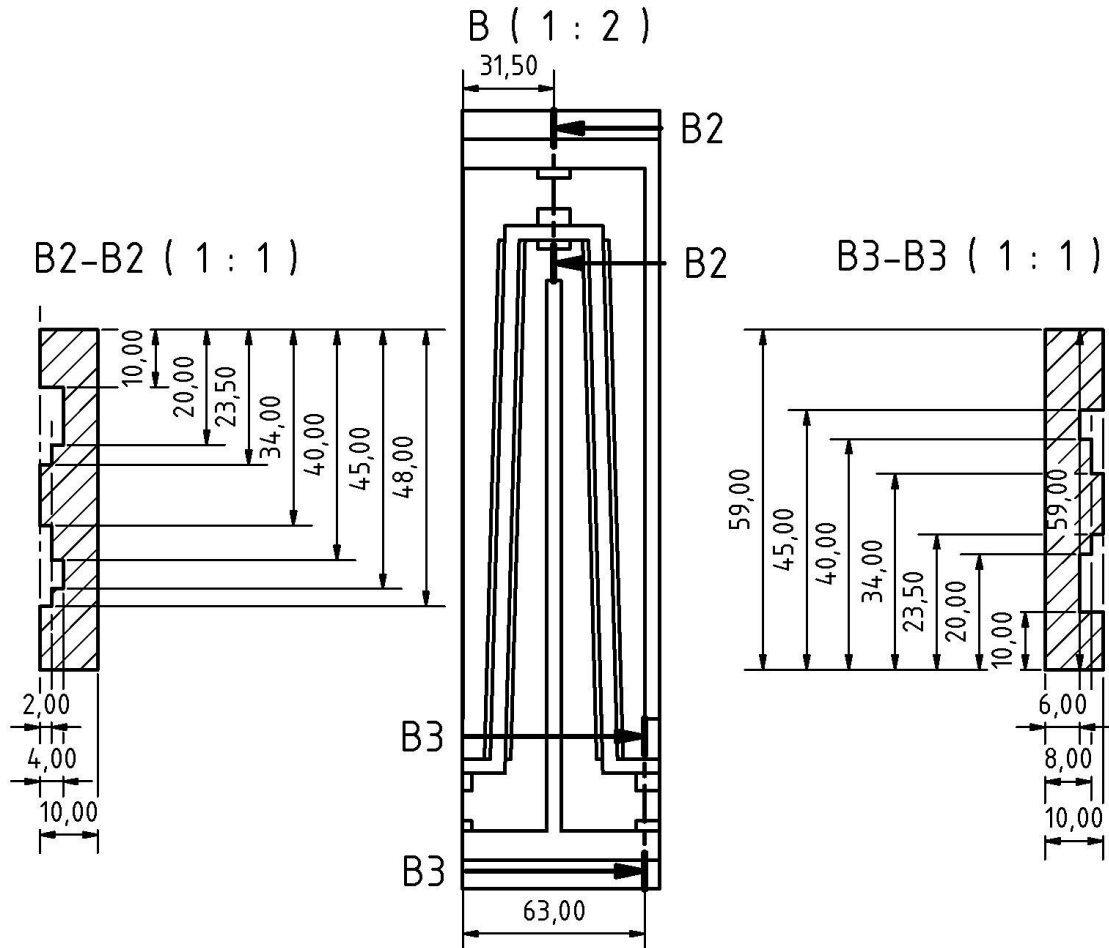


Ansicht Schnitt 1 von Abschnitt B

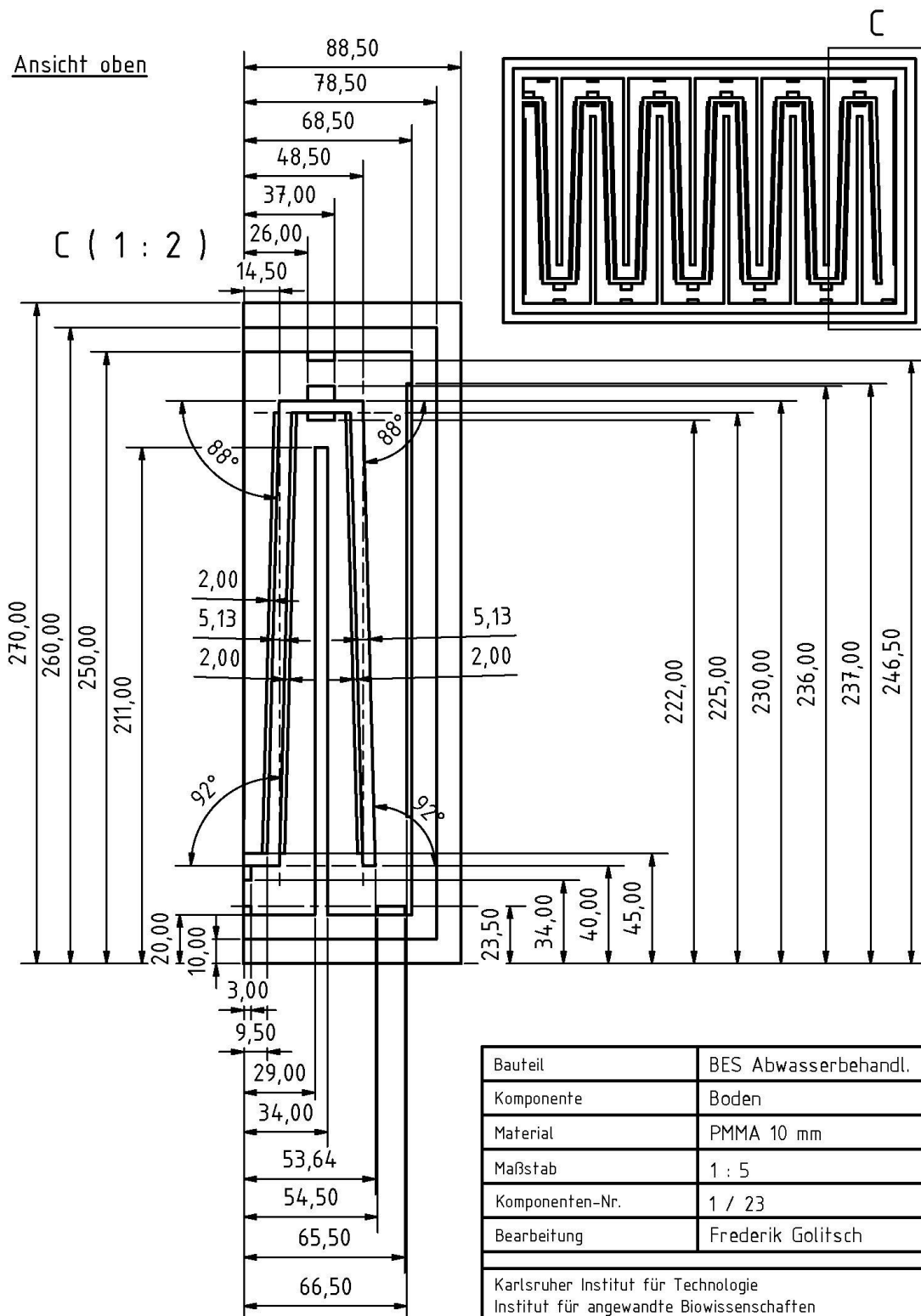


Ansicht Schnitt 2 von Abschnitt B

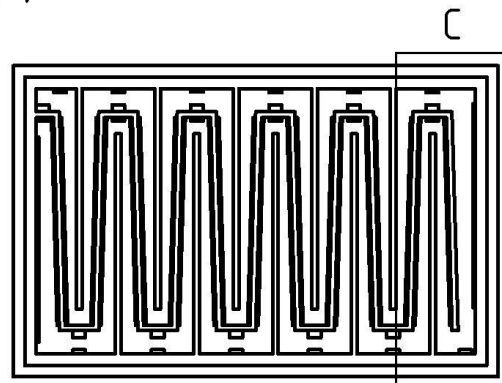
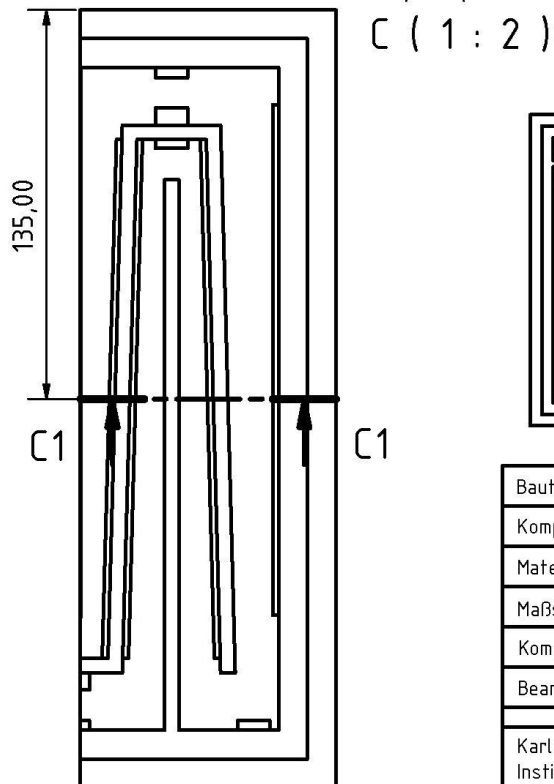
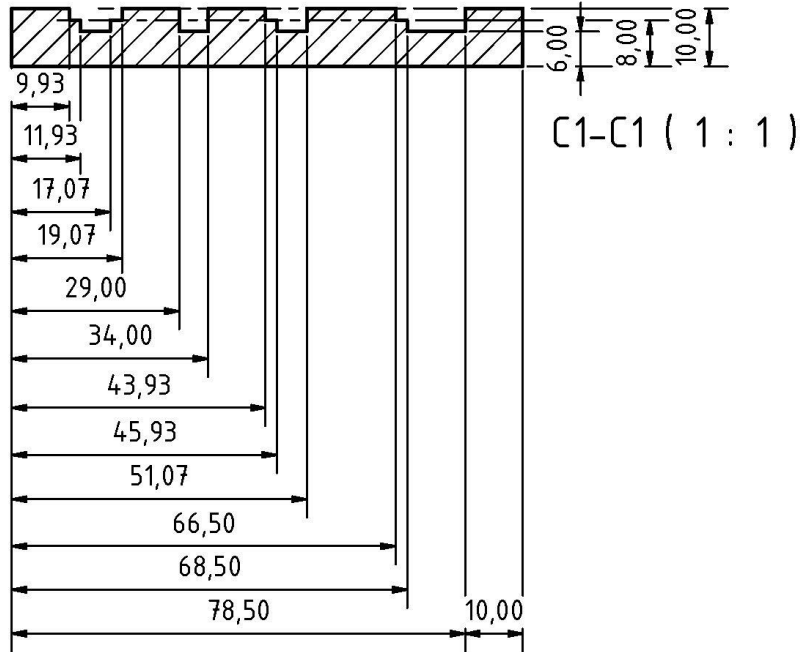
Ansicht Schnitt 3 von Abschnitt B



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Boden
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	1 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	



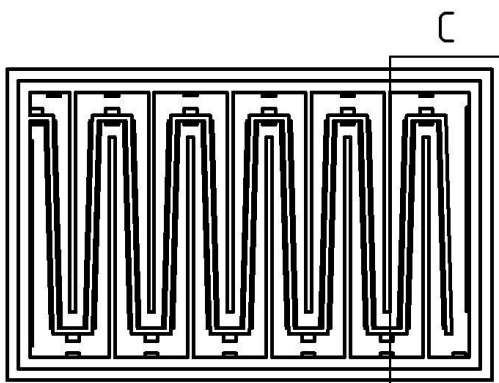
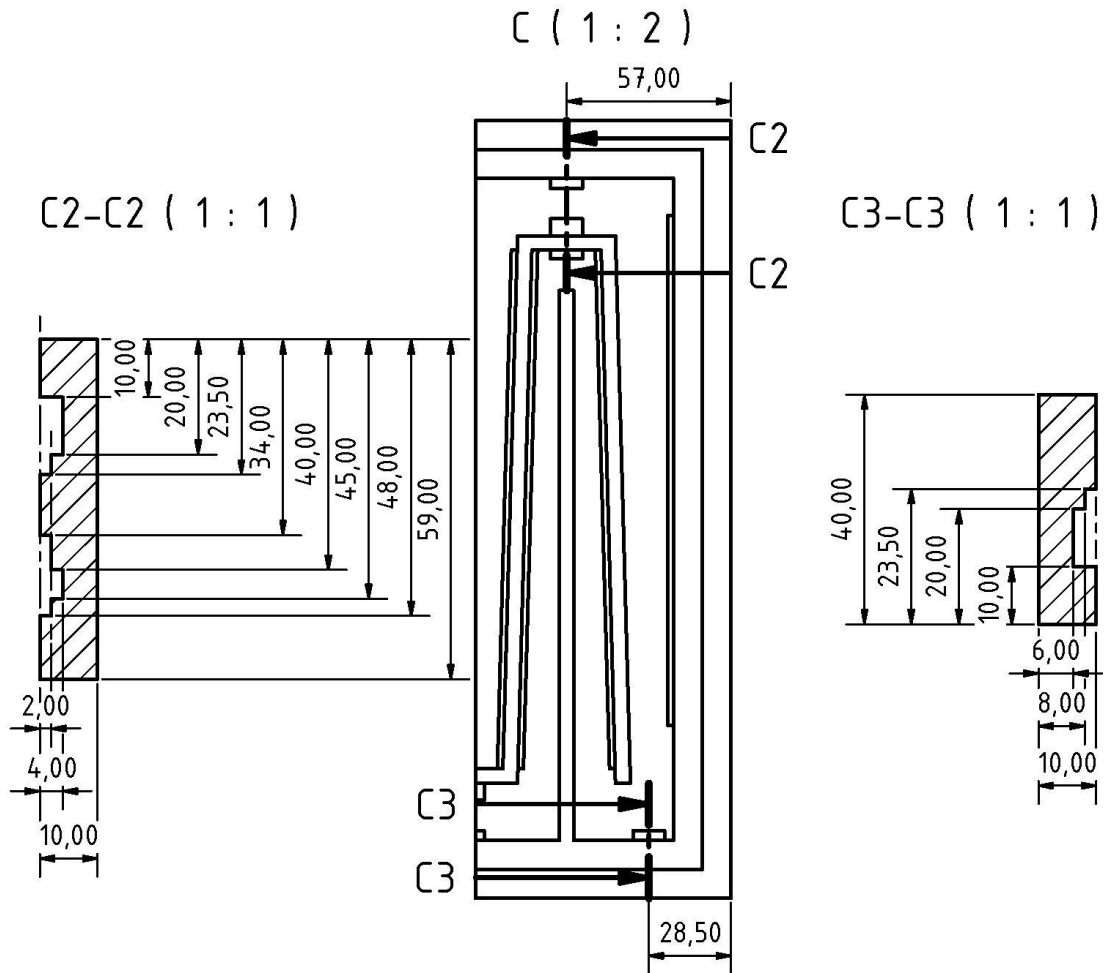
Ansicht Schnitt 1 von Ausschnitt C



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Boden
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	1 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

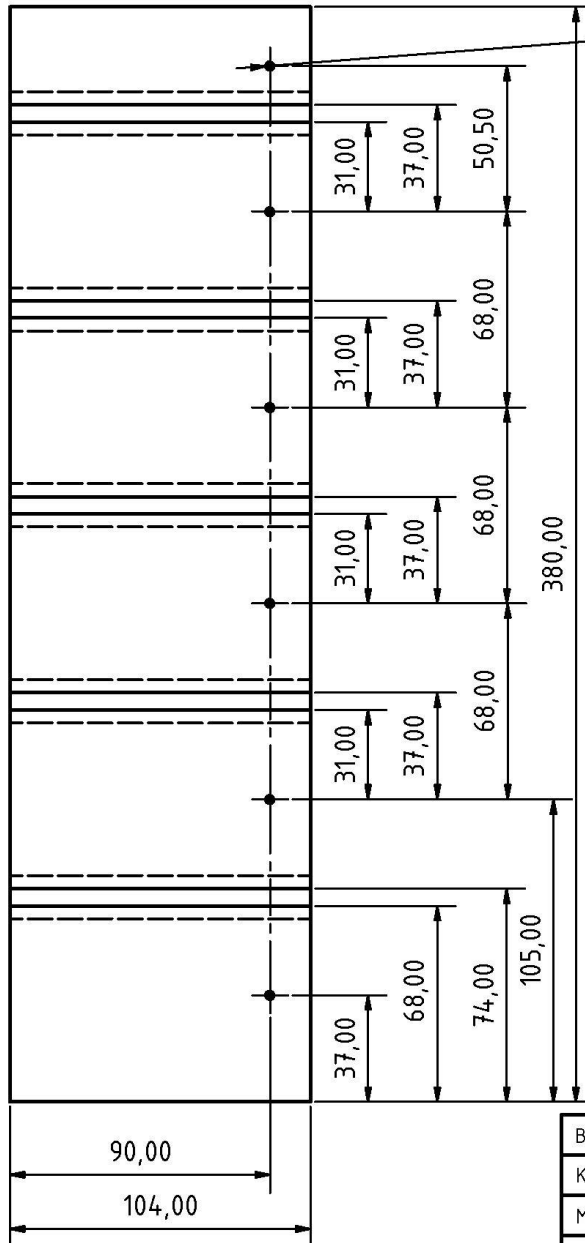
Ansicht Schnitt 2 von Ausschnitt C

Ansicht Schnitt 3 von Ausschnitt C



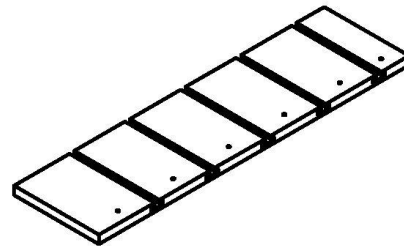
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Boden
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	1 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht vorne



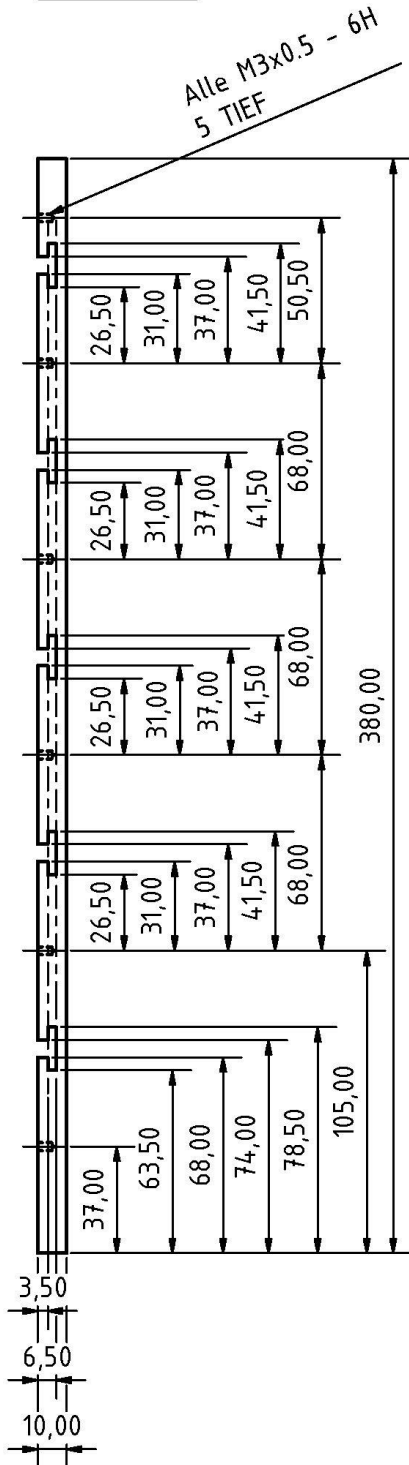
Alle M3x0.5 - 6H
5 TIEF

ISO Ansicht vorne rechts (1:5)

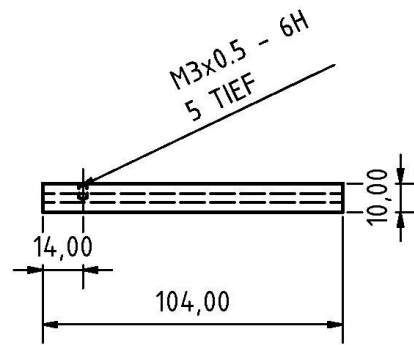


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand hinten
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	2 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht oben

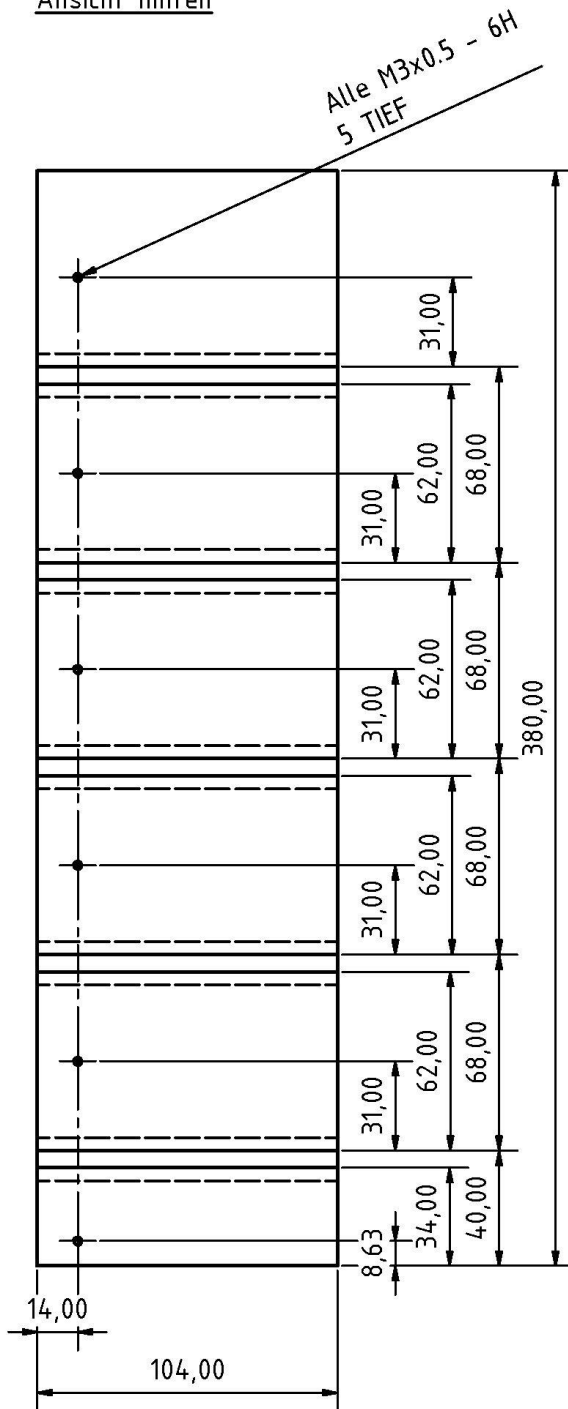


Ansicht links

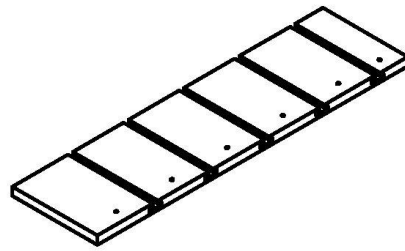


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand hinten
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	2 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht hinten

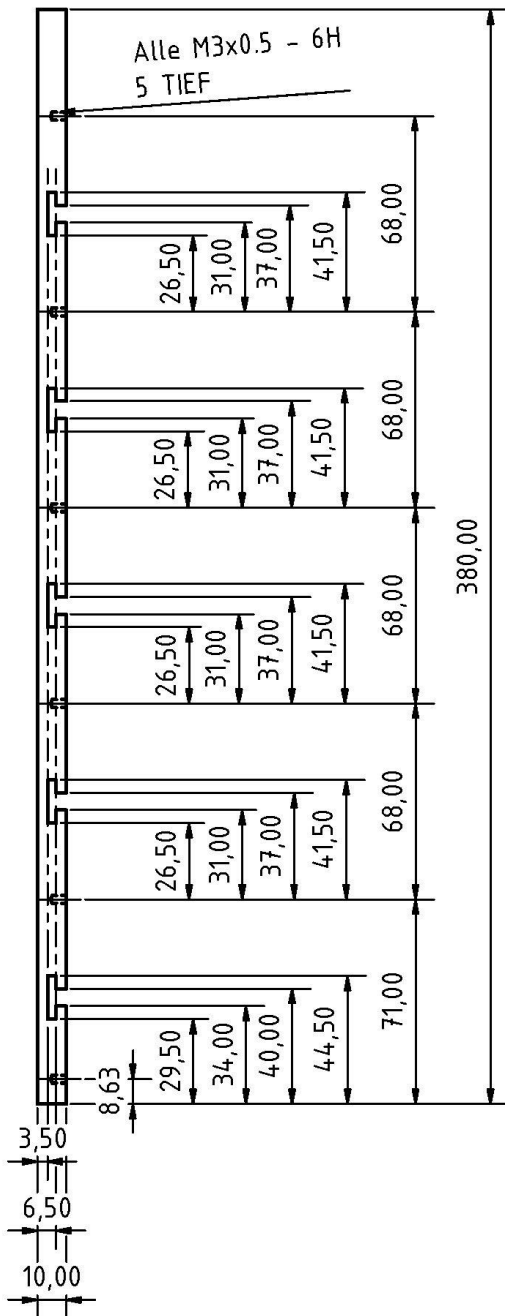


ISO Ansicht hinten links (1:5)

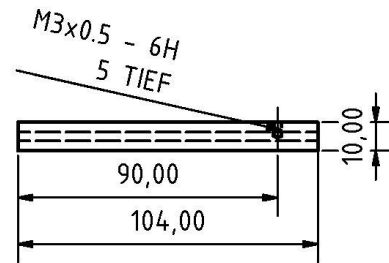


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand vorne
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	3 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht oben

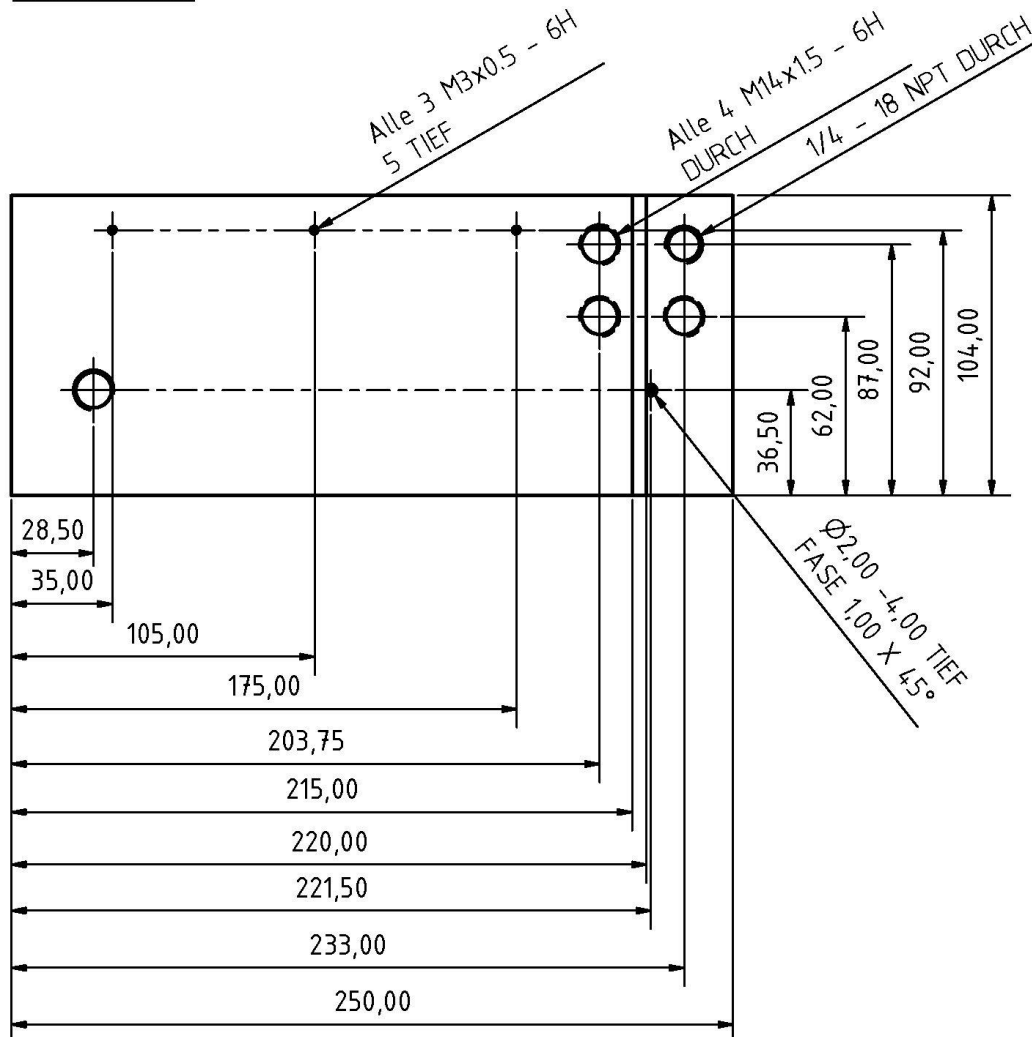


Ansicht links

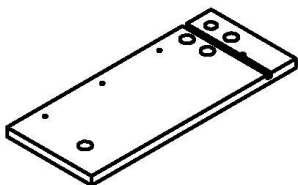


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand vorne
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	3 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

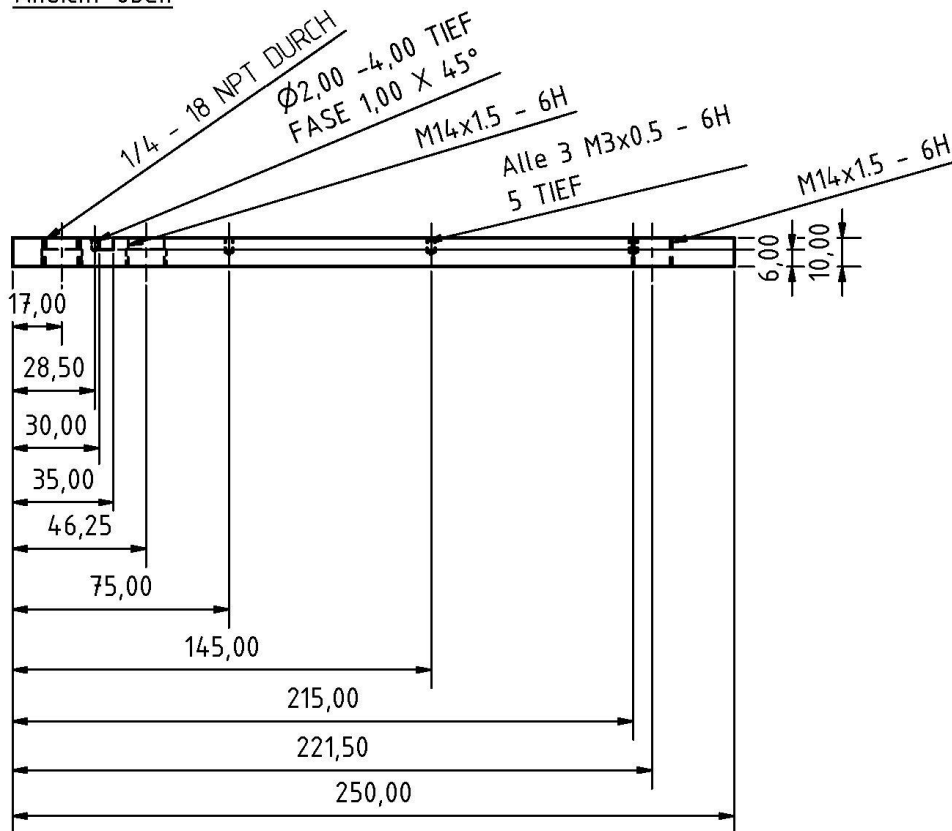
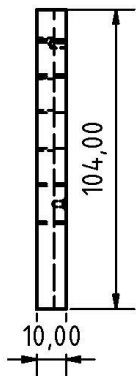
Ansicht rechts



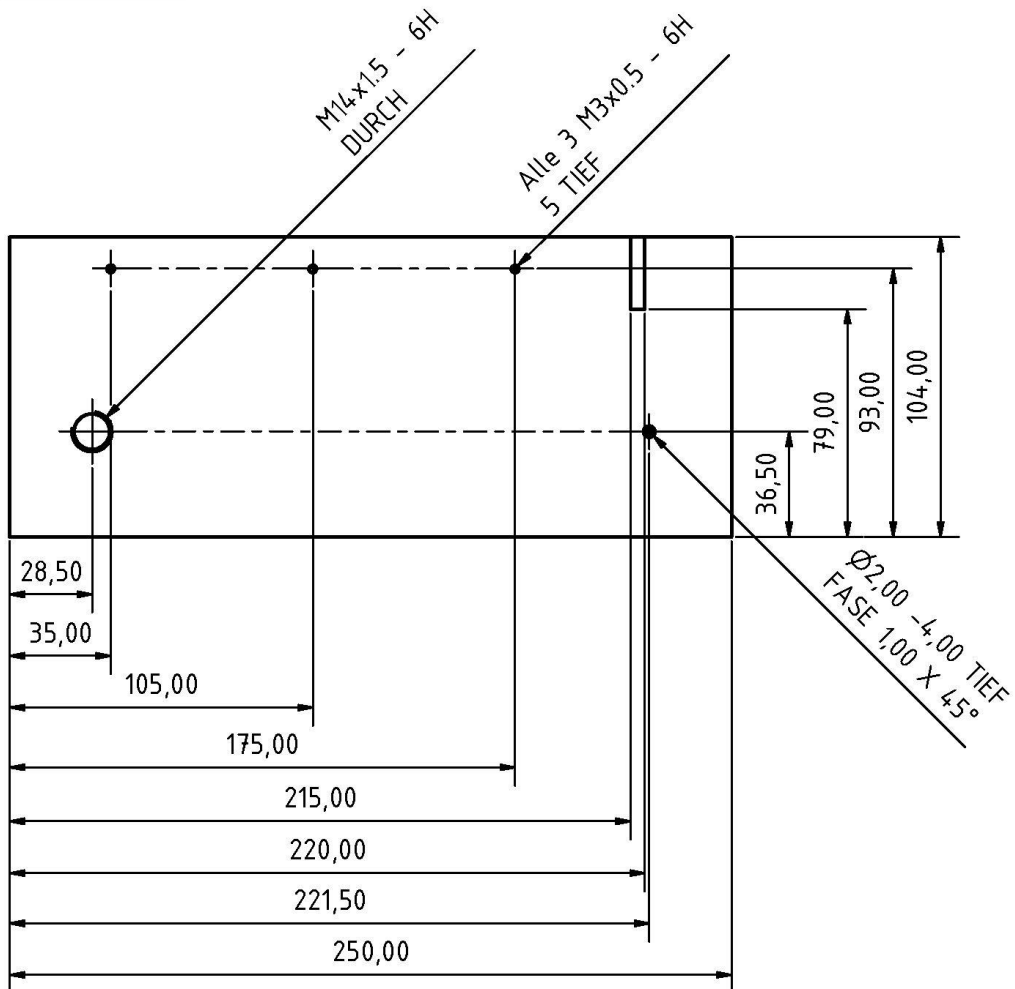
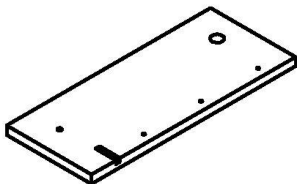
Ansicht ISO unten rechts (1:5)



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand links
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	4 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

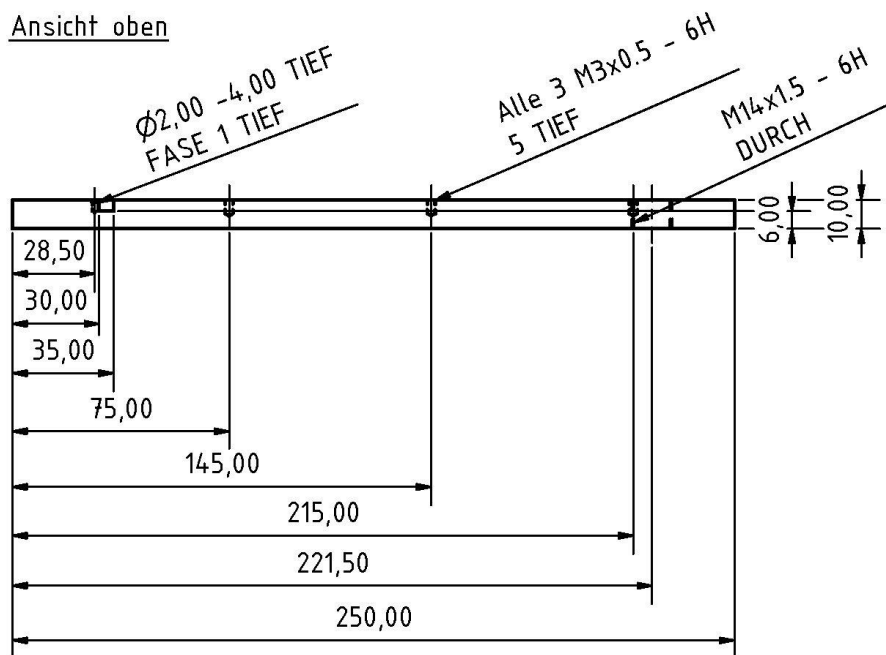
Ansicht obenAnsicht vorne

Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand links
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	4 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

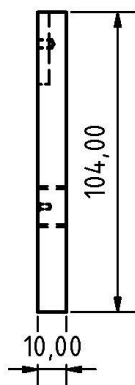
Ansicht rechtsAnsicht ISO oben links (1:5)

Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand rechts
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	5 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

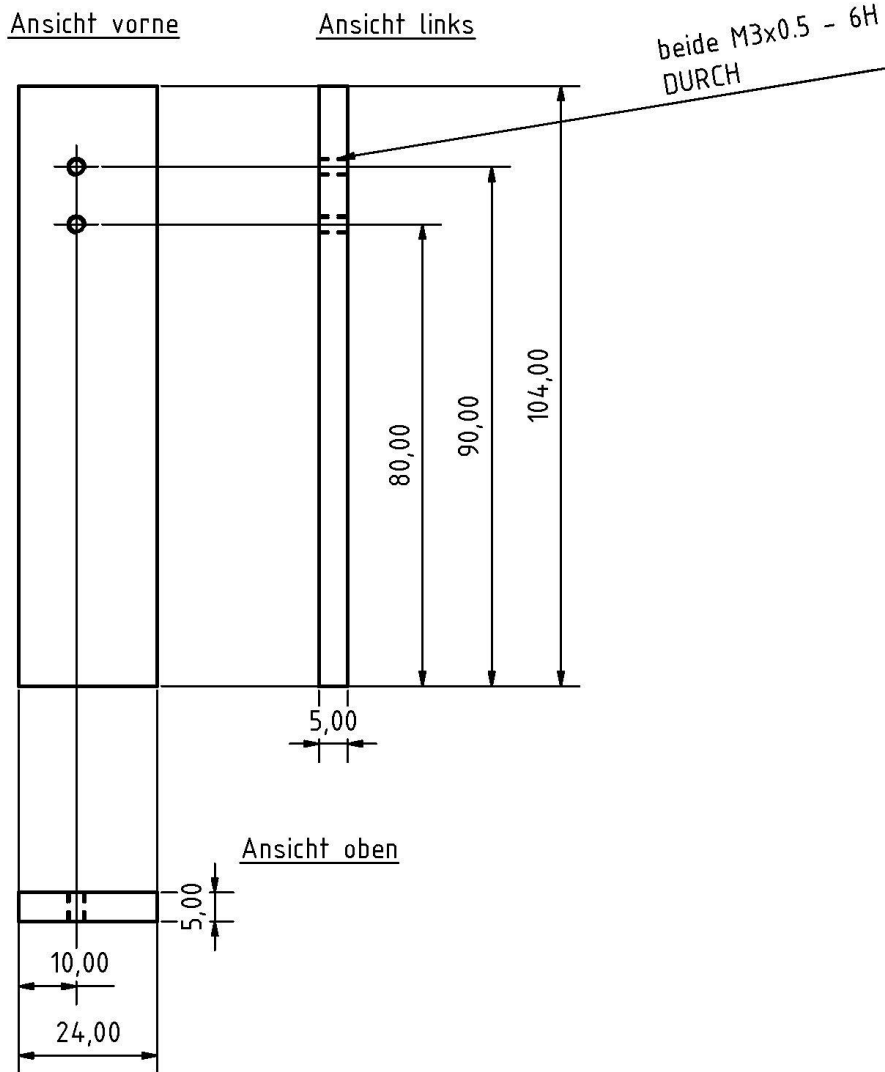
Ansicht oben



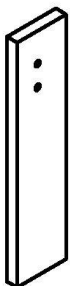
Ansicht vorne



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Seitenwand rechts
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	4 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	



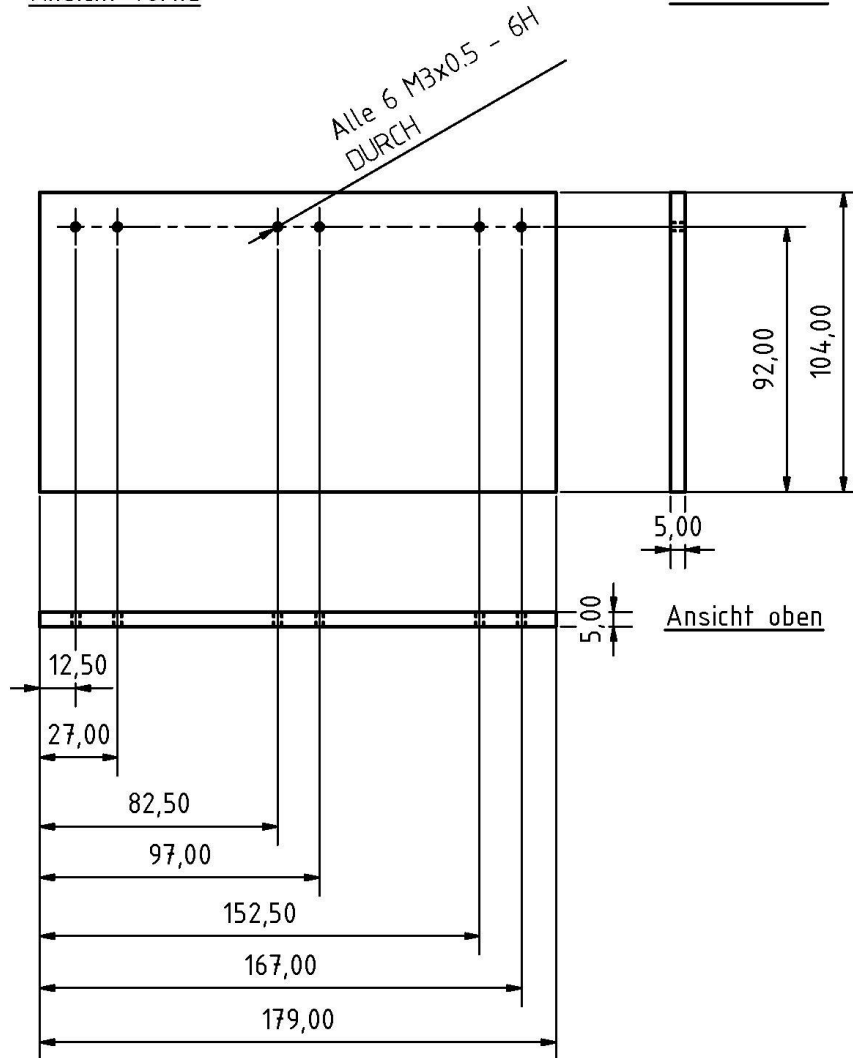
Ansicht ISO oben links (1:2)



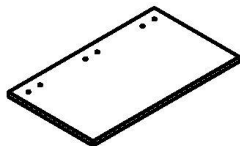
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Mäanderstruktur BT A
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	6 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht vorne

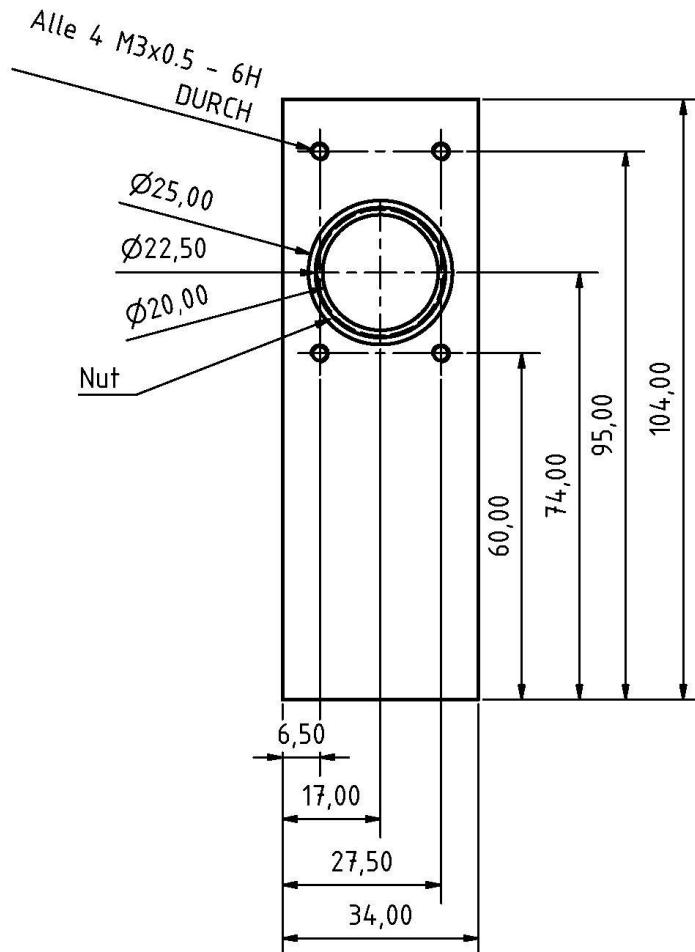
Ansicht links



Ansicht ISO vorne links (1:5)

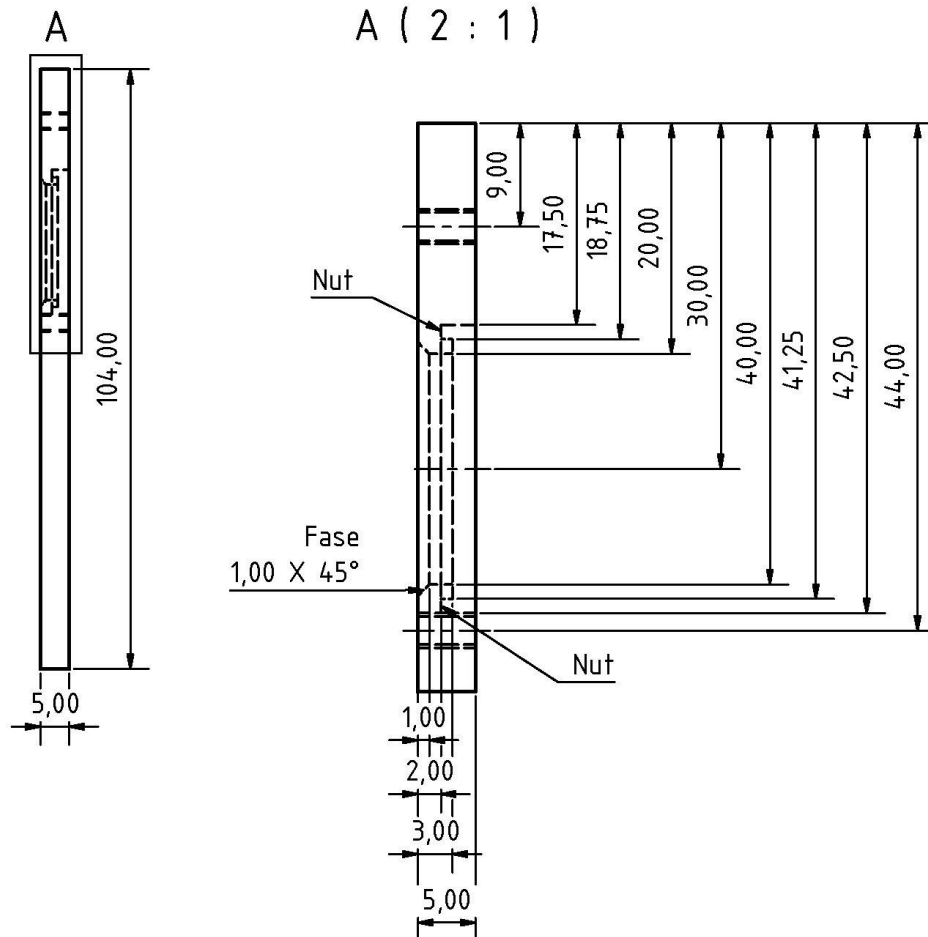


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Mäanderstruktur BT B
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	7 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

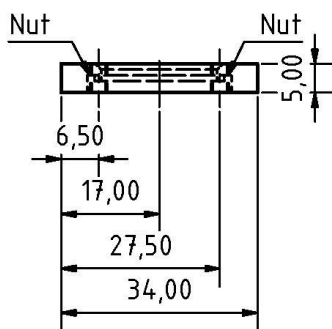
Ansicht vorneAnsicht ISO oben links (1:2)

Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Mäanderstruktur BT C
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	8 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht links



Ansicht oben

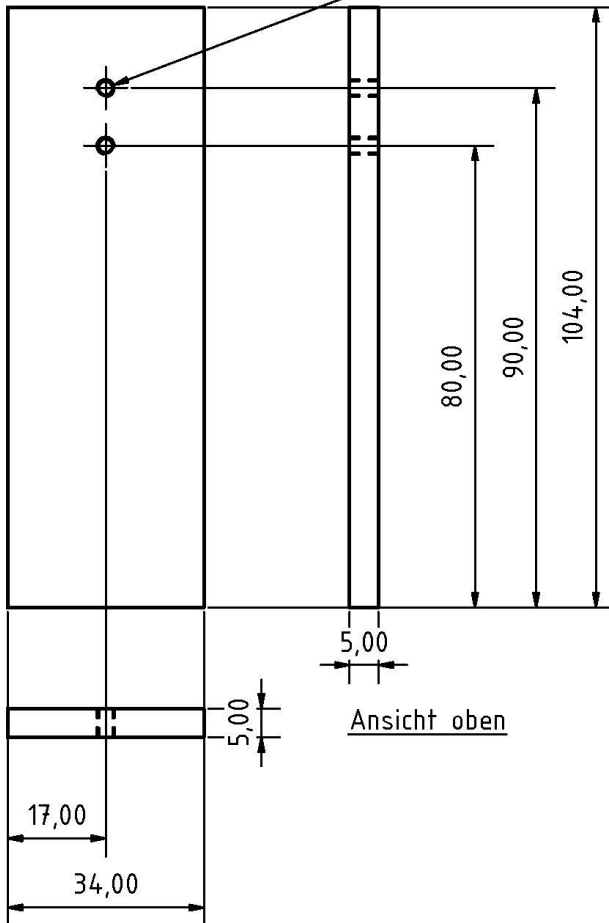


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Mäanderstruktur BT C
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	8 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

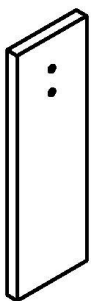
Ansicht vorne

Ansicht links

beide M3x0.5 - 6H
DURCH



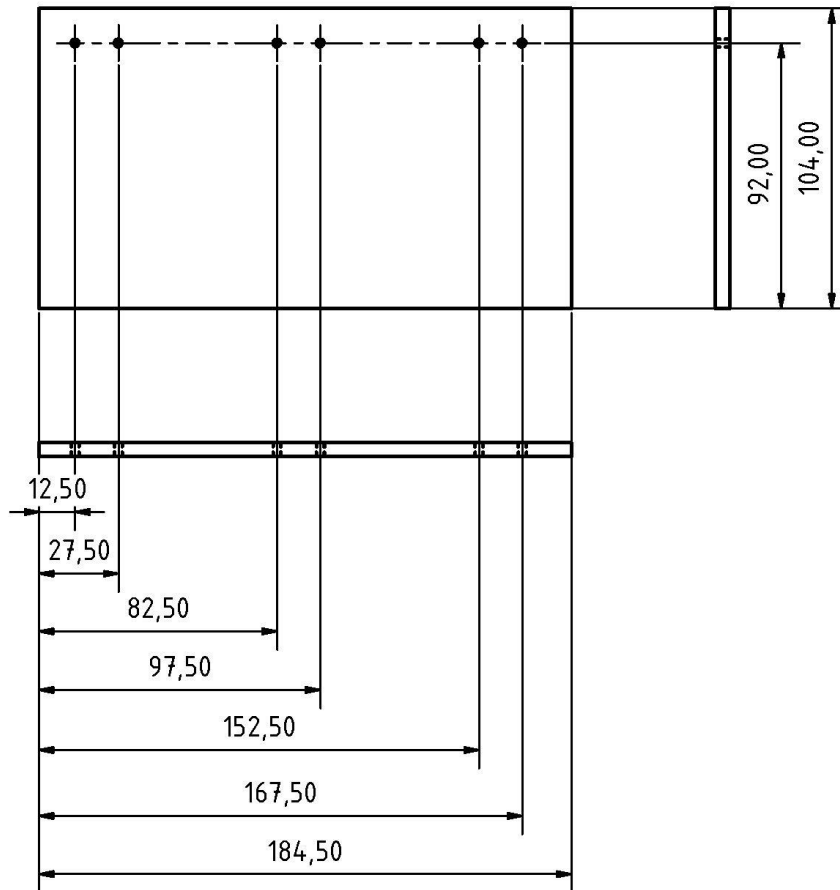
Ansicht ISO oben links (1:2)



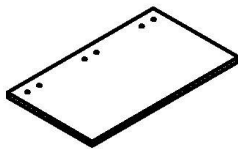
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Mäanderstruktur BT D
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	9 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht vorne

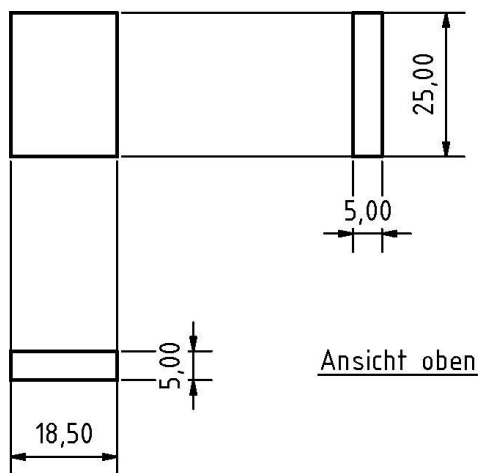
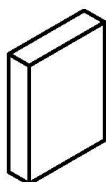
Ansicht links



Ansicht ISO vorne links (1:5)

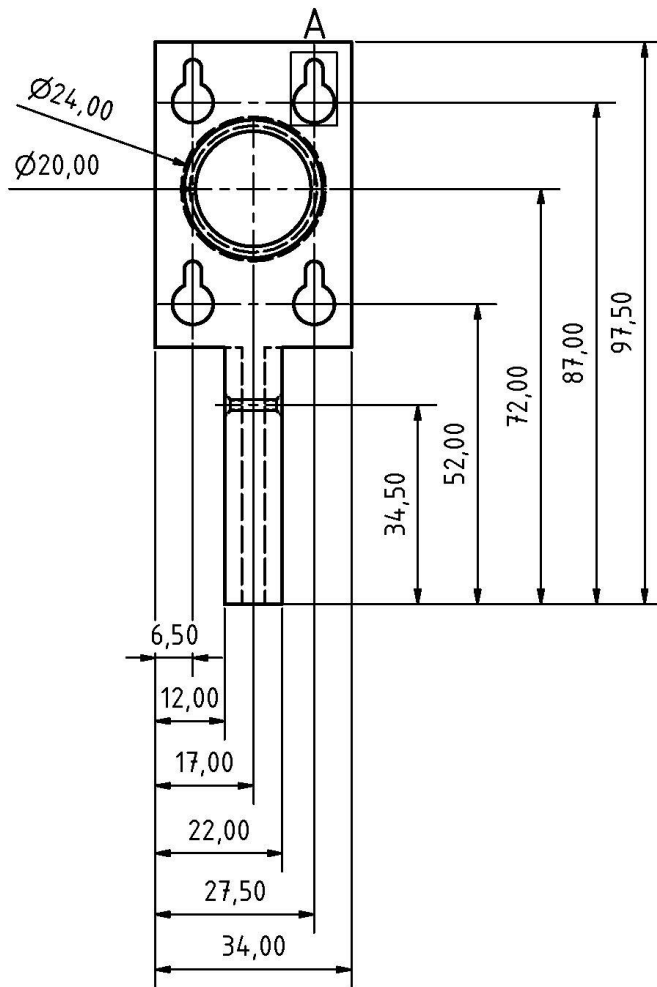


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Mäanderstruktur BT E
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	10 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

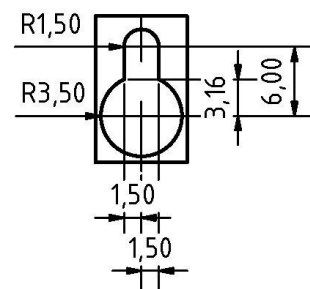
Ansicht vorneAnsicht linksAnsicht obenAnsicht ISO oben links

Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Mäanderstruktur BT F
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	11 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

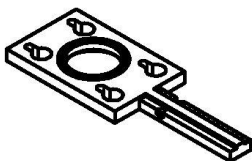
Ansicht vorne



Alle 4 wie
A (2 : 1)

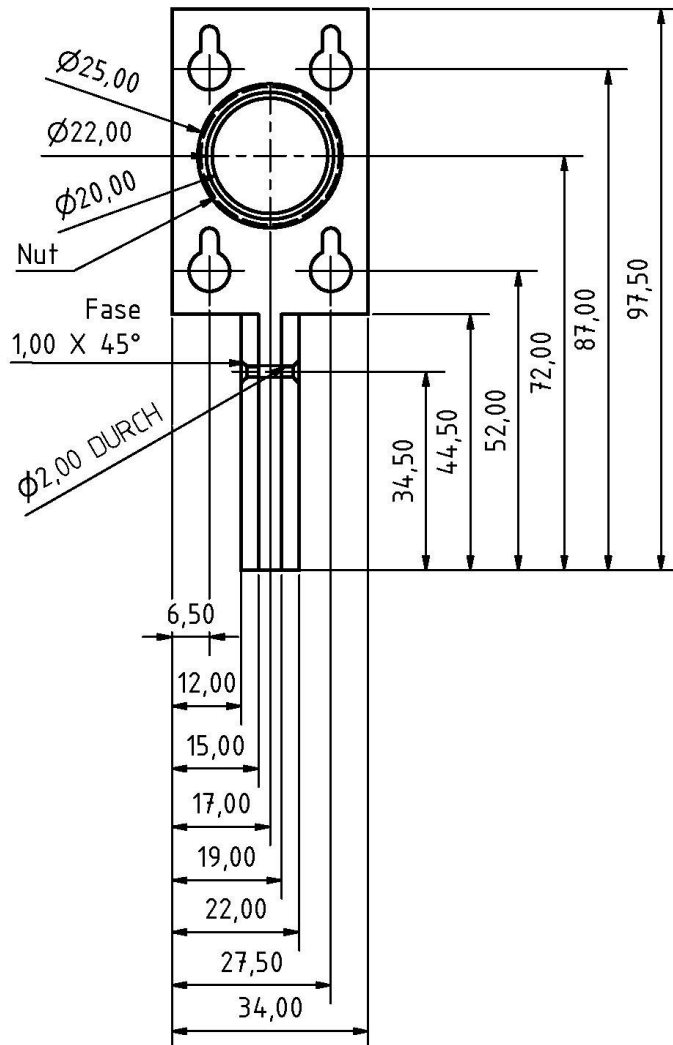


Ansicht ISO hinten rechts (1:2)



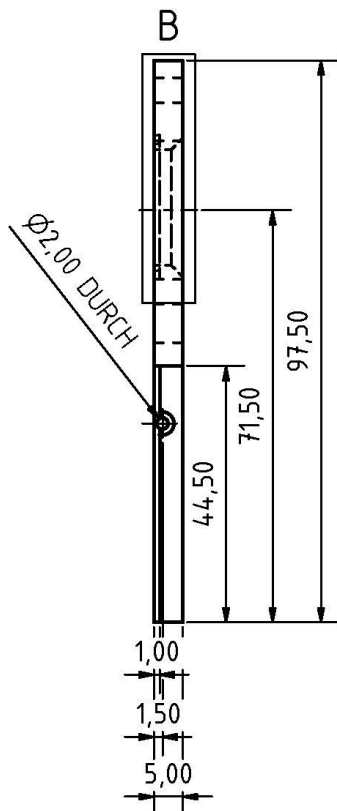
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Separatorhalter
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	12 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht hinten

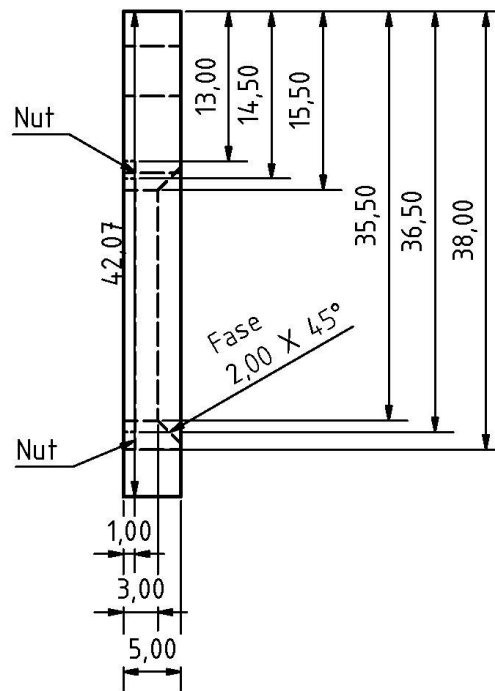


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Separatorhalter
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	12 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

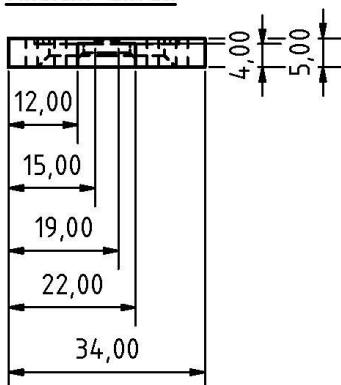
Ansicht links



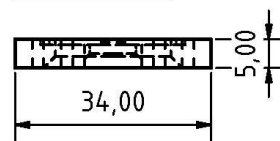
B (2 : 1)



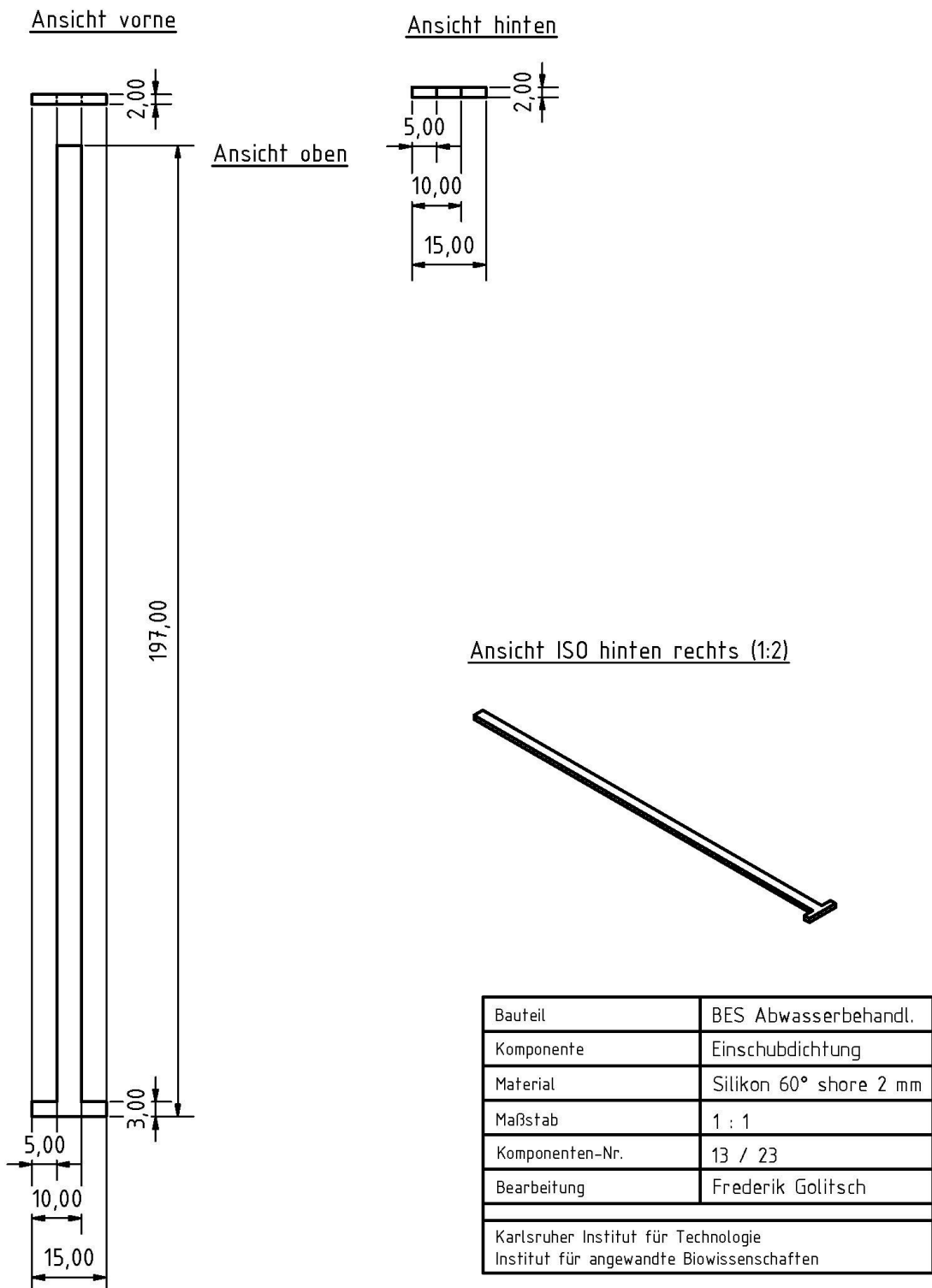
Ansicht unten

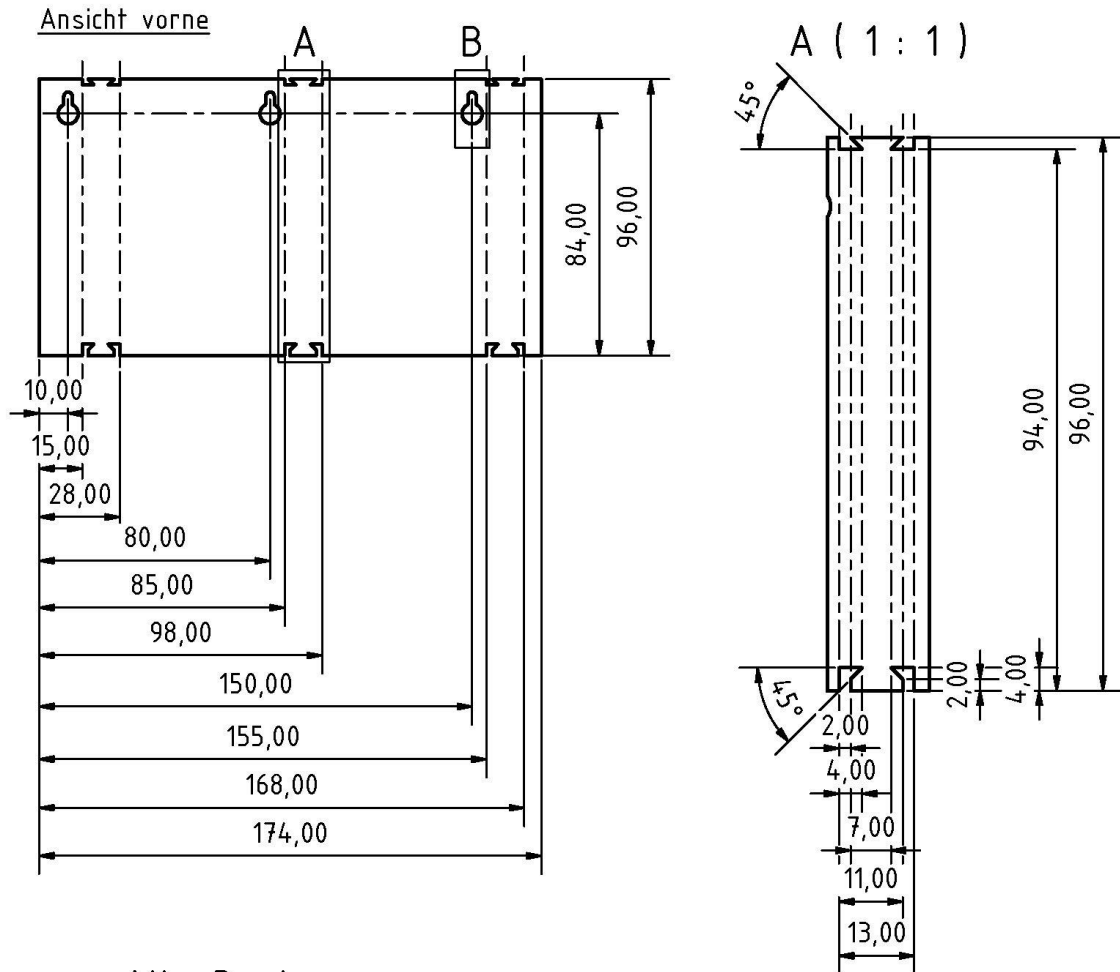


Ansicht oben

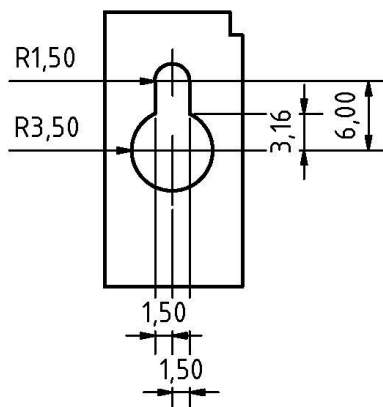


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Separatorhalter
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	12 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	



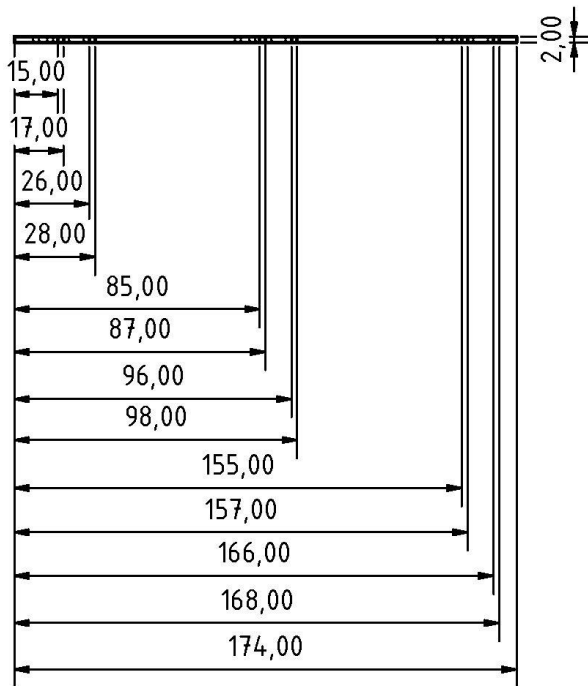


Alle 3 wie
B (2 : 1)

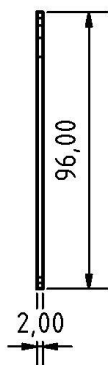


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Elektrodenhalter
Material	PMMA 2 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	14 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

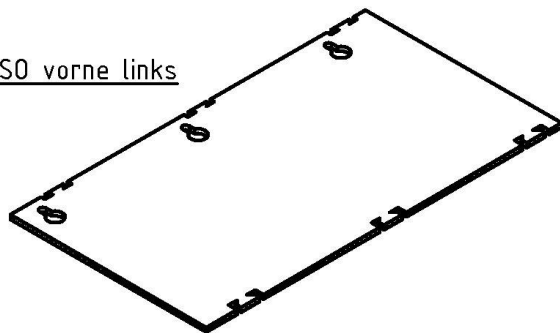
Ansicht oben



Ansicht links

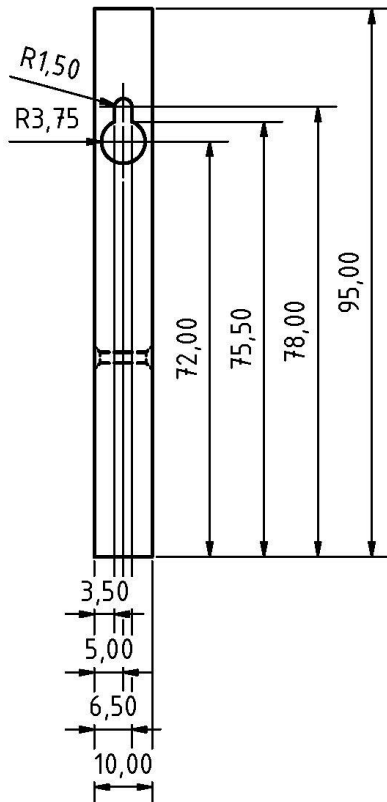


Ansicht ISO vorne links

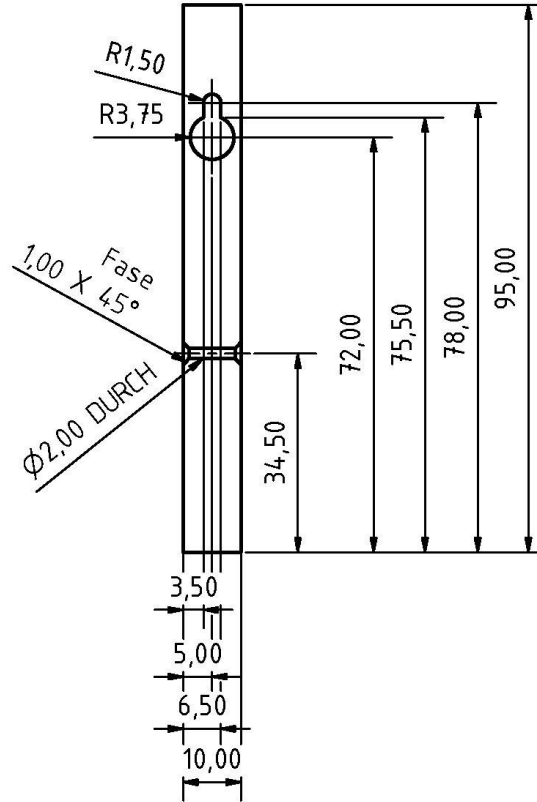


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Elektrodenhalter
Material	PMMA 2 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	14 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

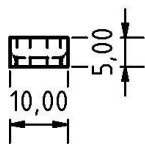
Ansicht vorne



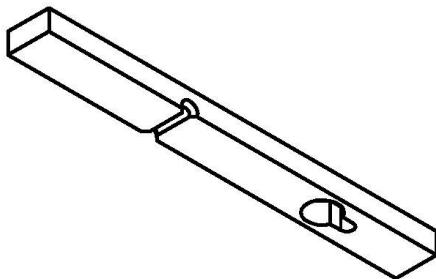
Ansicht hinten



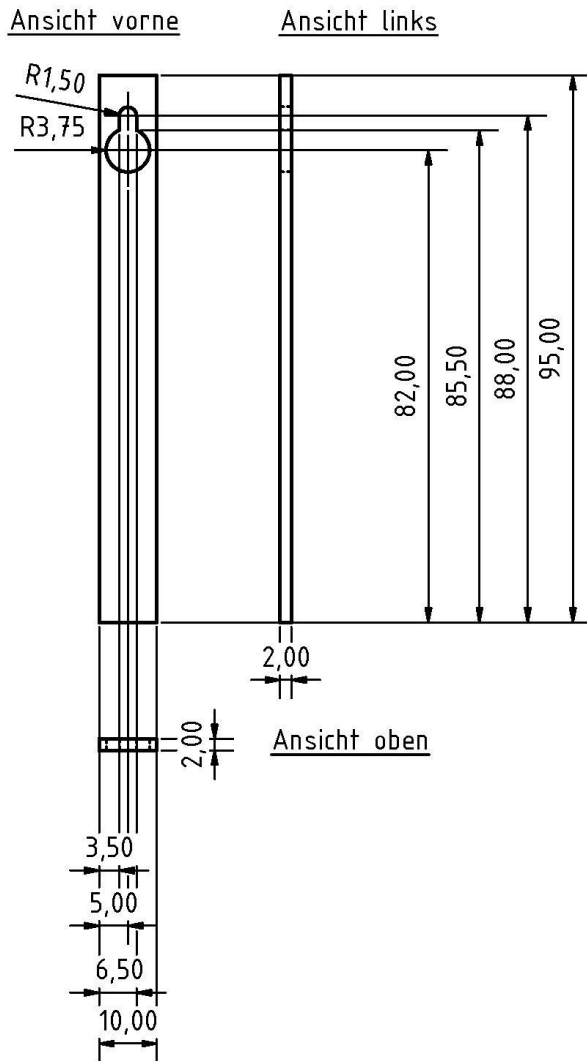
Ansicht oben



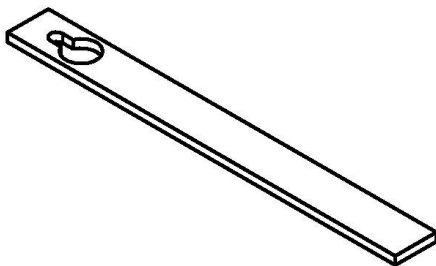
Ansicht ISO hinten links



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Elektrodenspanner A
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	15 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

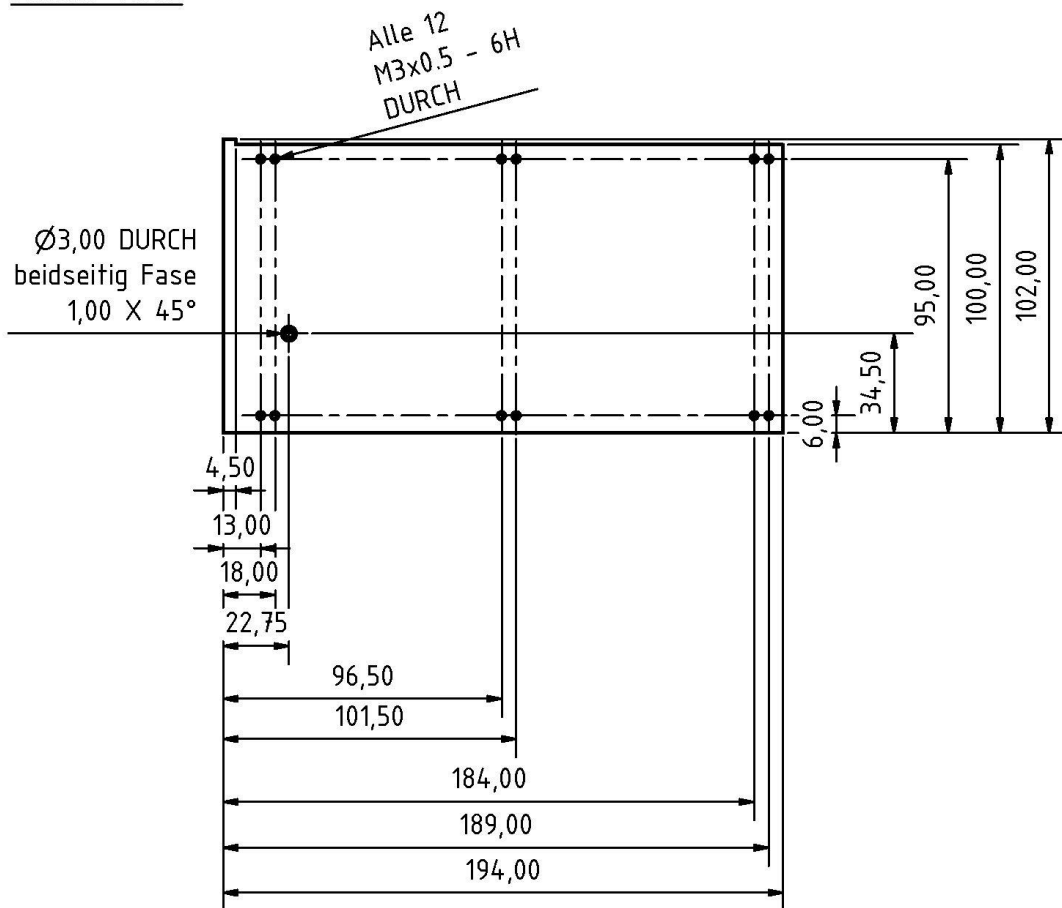


Ansicht ISO vorne links

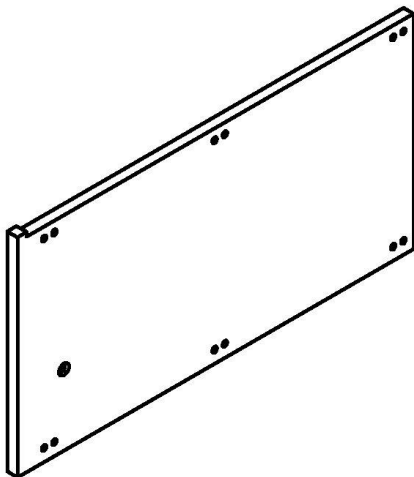


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Elektrodenspanner B
Material	PMMA 2 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	16 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht vorne

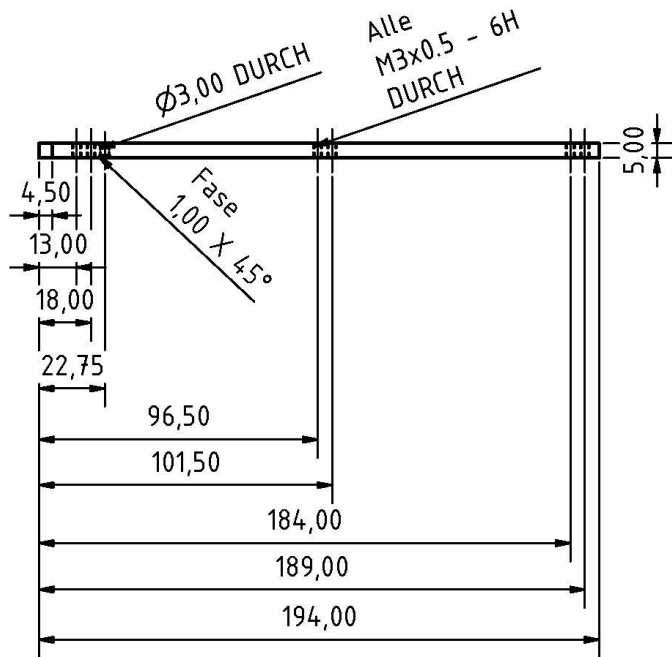


Ansicht ISO vorne links

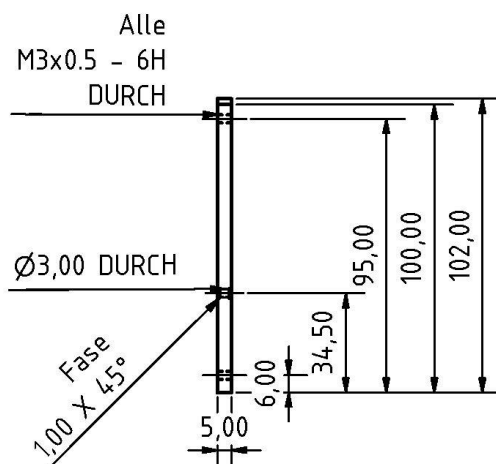


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Einschubelektrodenhalter BT A
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	17 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

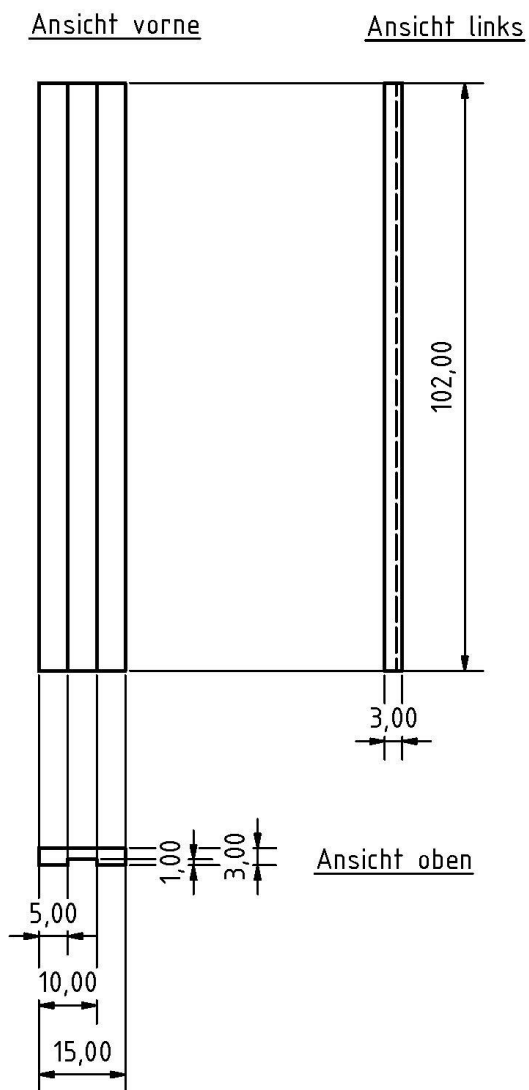
Ansicht oben



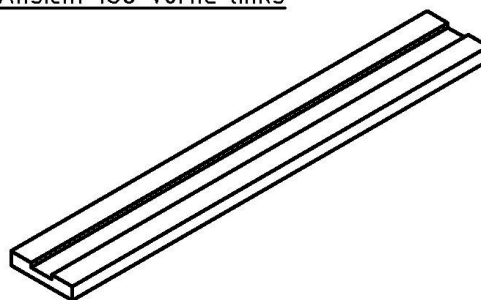
Ansicht rechts



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Einschubelektrodenhalter BT A
Material	PMMA 5 mm
Maßstab	1 : 2
Komponenten-Nr.	17 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	



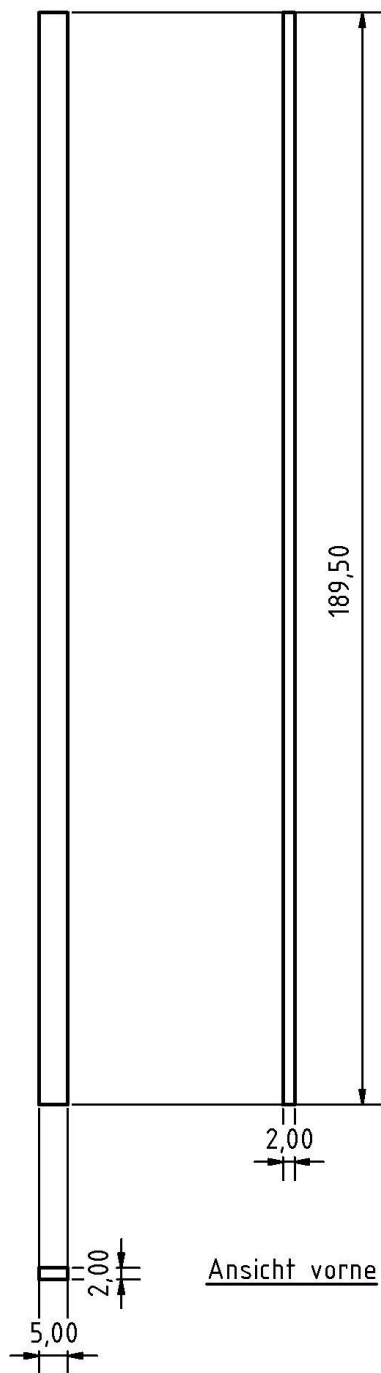
Ansicht ISO vorne links



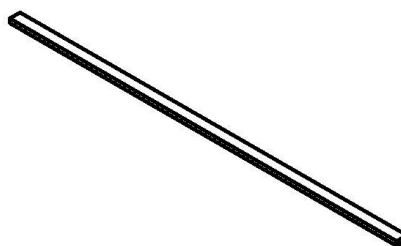
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Einschubelektrodenhalter BT B
Material	PMMA 3 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	18 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht oben

Ansicht links

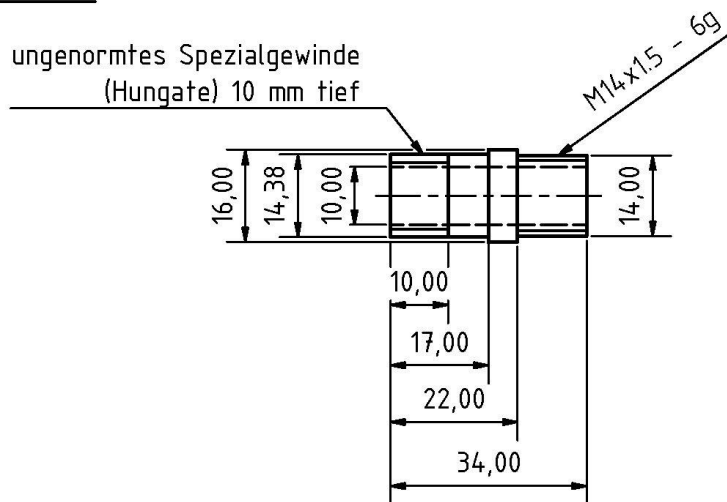


Ansicht ISO oben links (1:2)

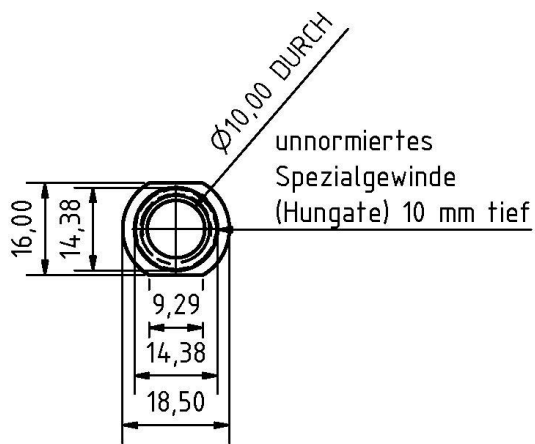


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Einschubelektrodenhalter Dichtung
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	19 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

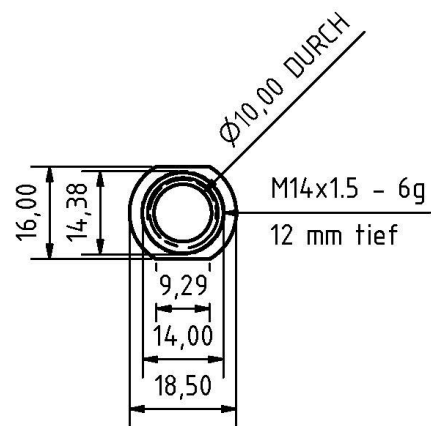
Ansicht vorne



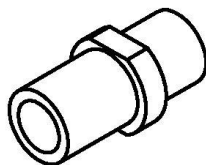
Ansicht links



Ansicht rechts

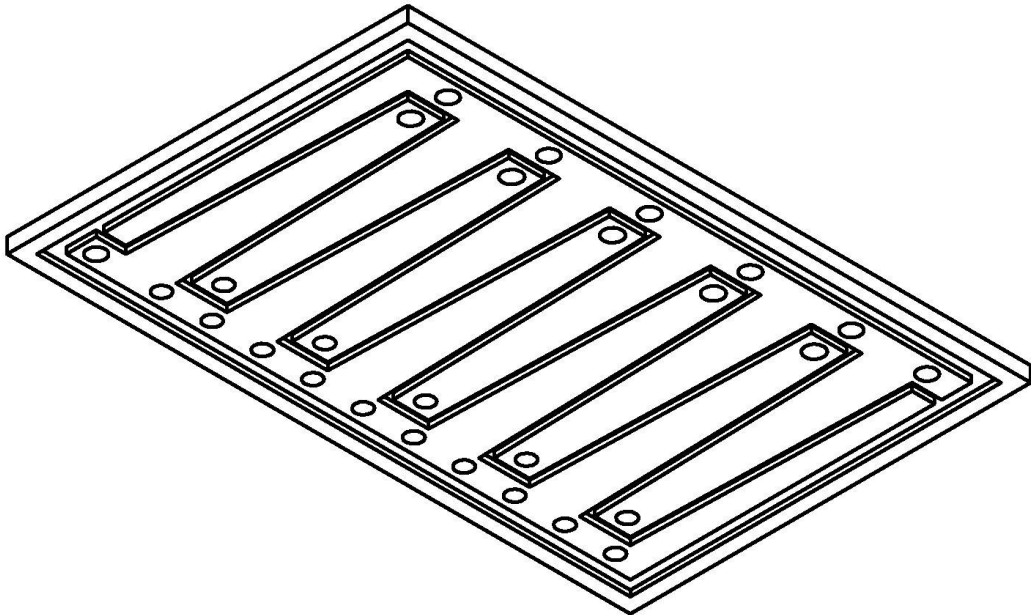


Ansicht ISO links



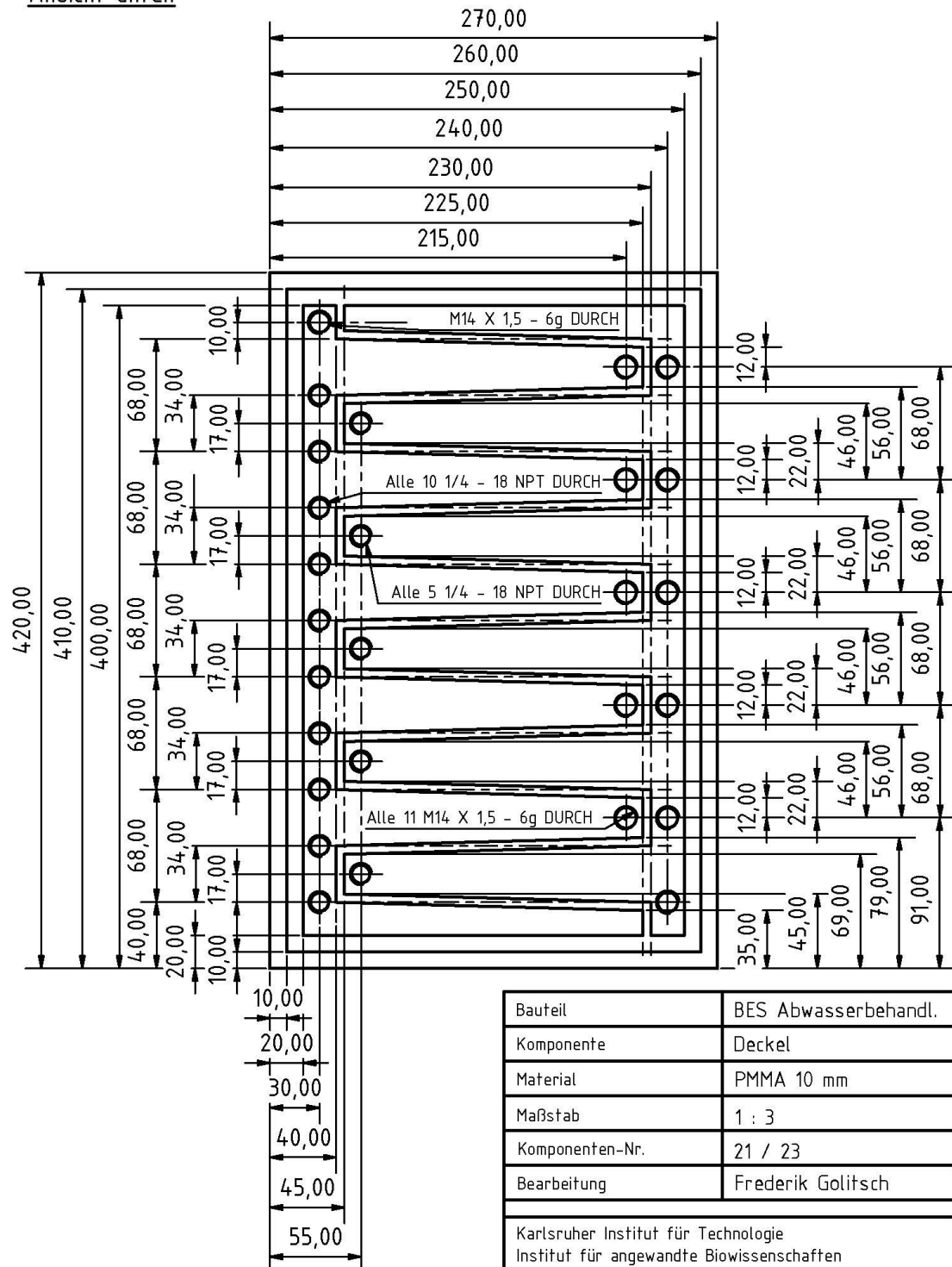
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Schraubadapter
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	20 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht ISO unten links



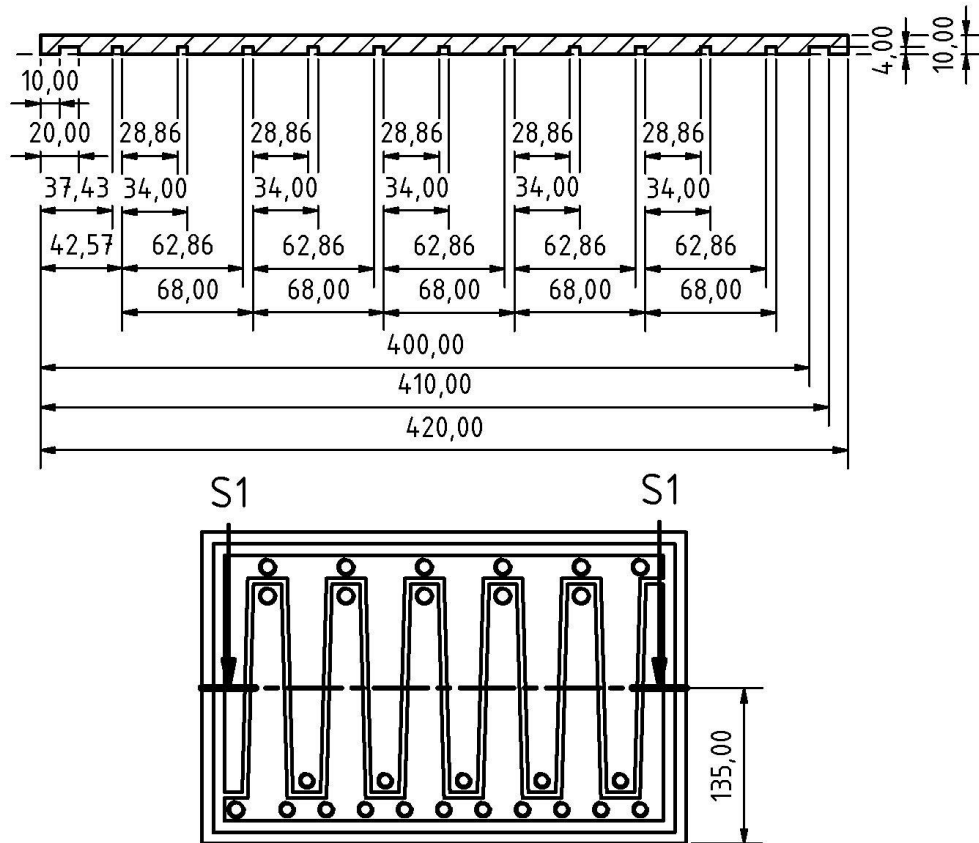
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Deckel
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 3
Komponenten-Nr.	21 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht unten

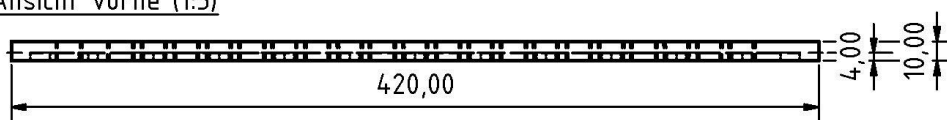


Ansicht Schnitt 1

S1-S1 (1 : 3)

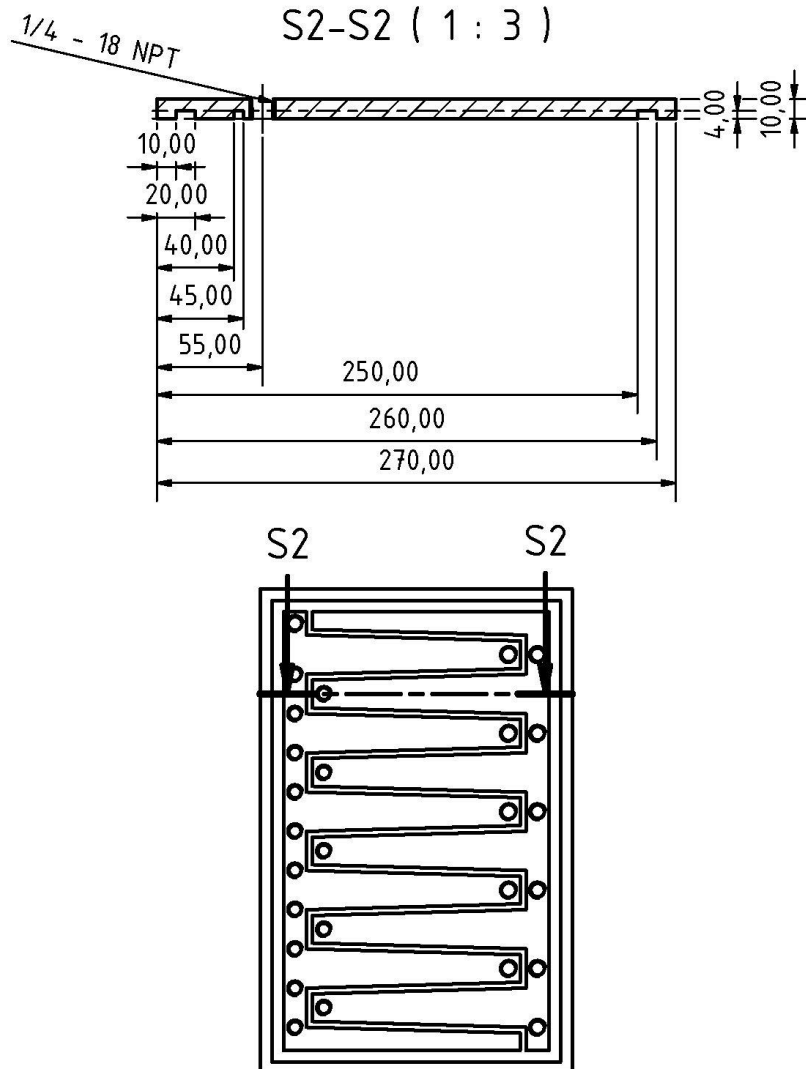


Ansicht vorne (1:3)



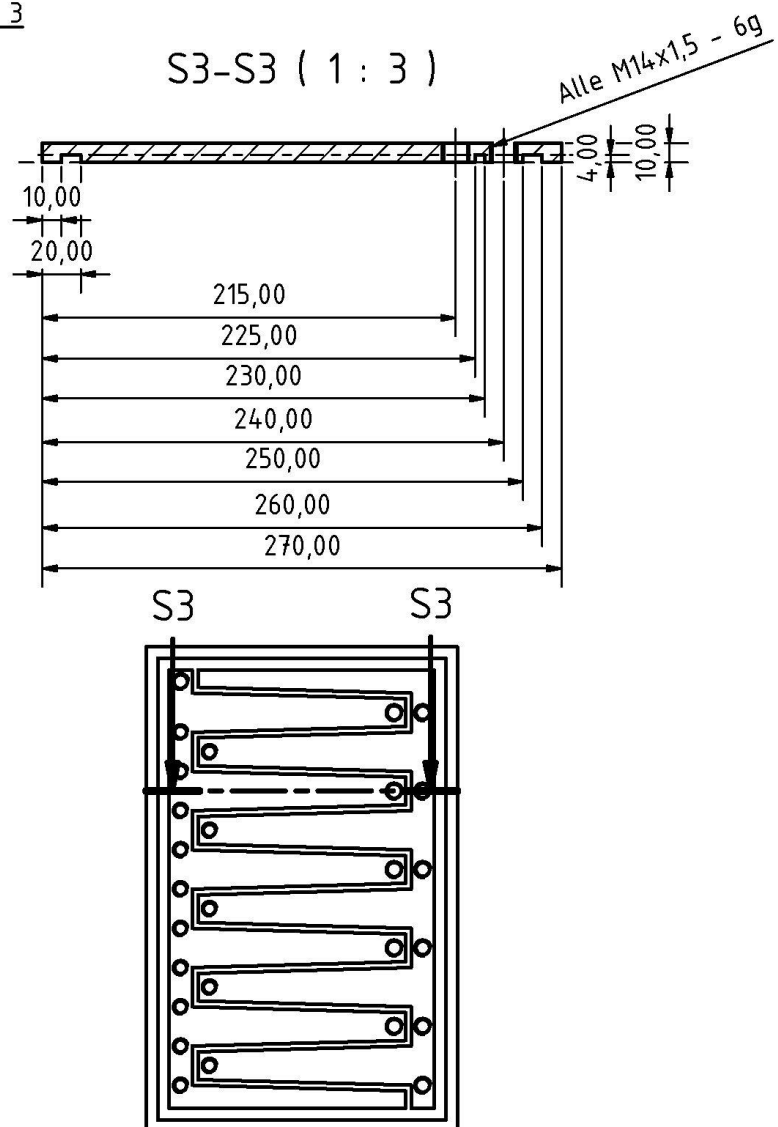
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Deckel
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	21 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht Schnitt 2

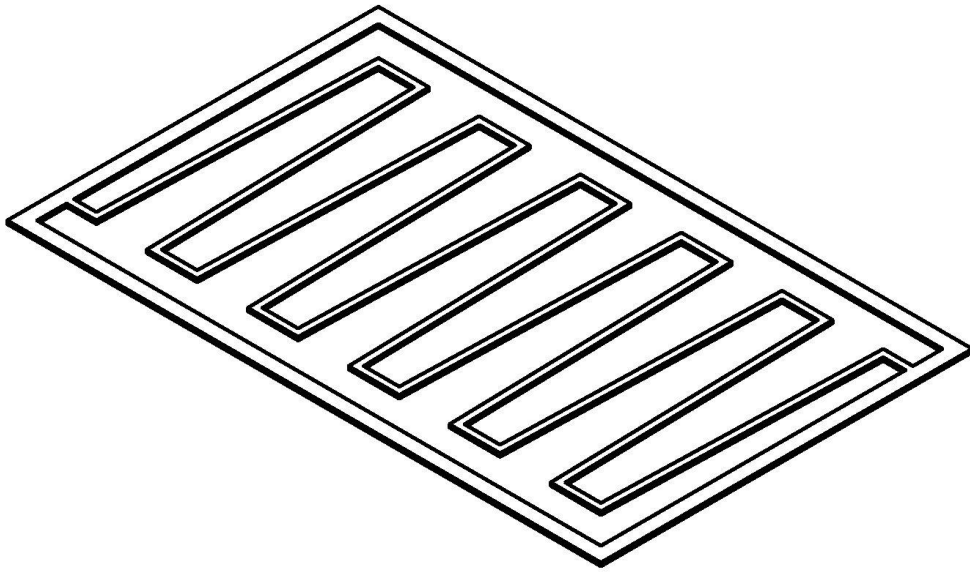
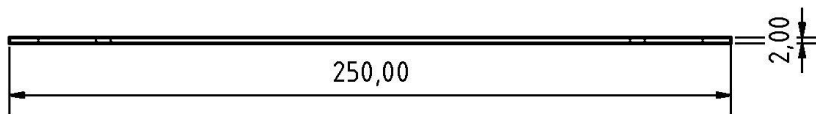


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Deckel
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	21 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht Schnitt 3

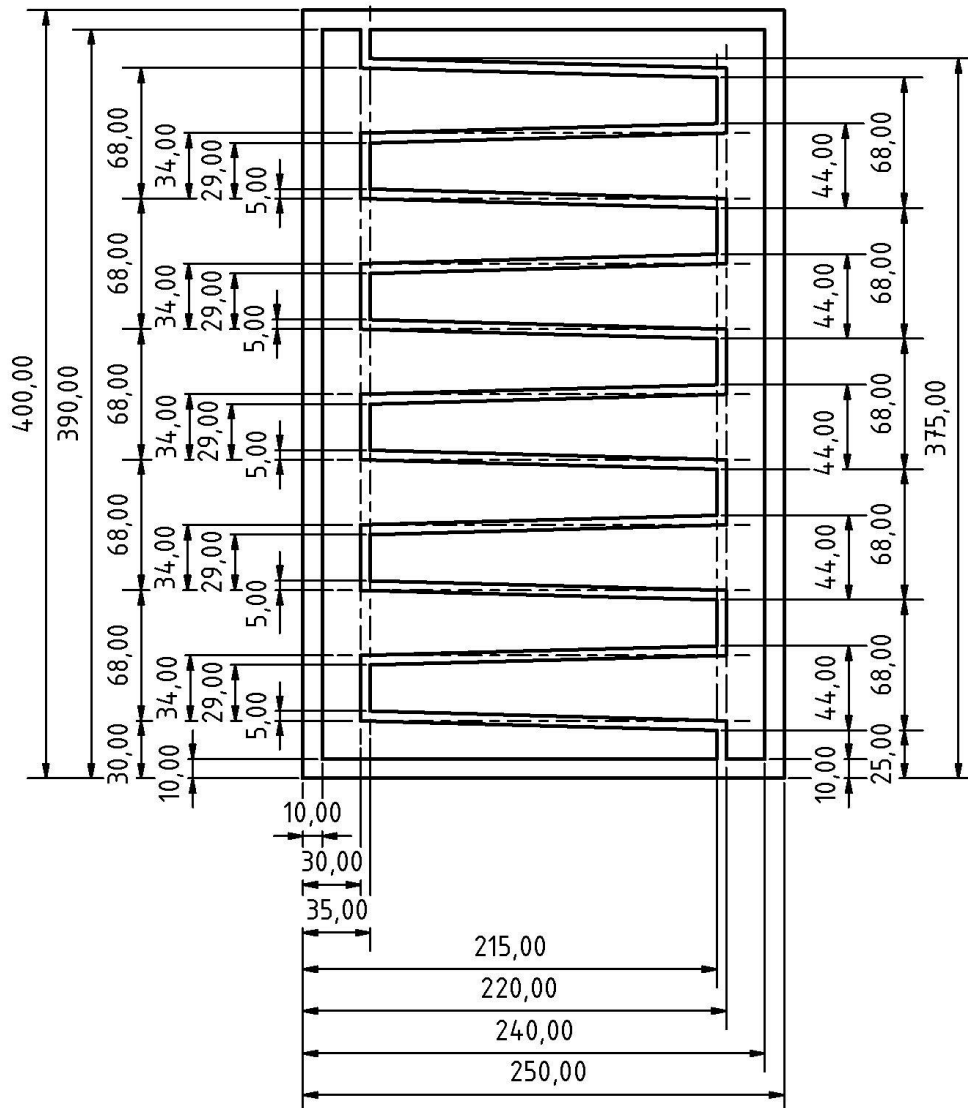


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Deckel
Material	PMMA 10 mm
Maßstab	1 : 5
Komponenten-Nr.	21 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht ISO oben linksAnsicht vorne (1:2)

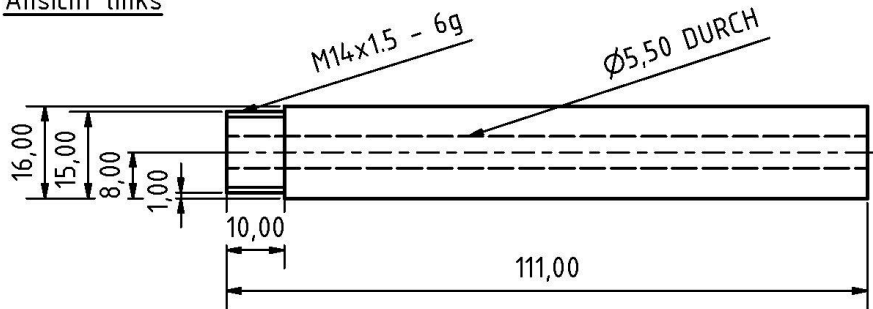
Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Deckeldichtung
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 2,75
Komponenten-Nr.	22 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

Ansicht oben

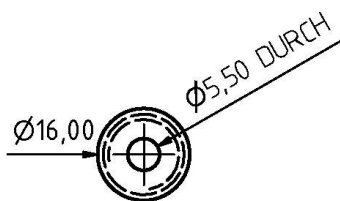


Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Deckeldichtung
Material	Silikon 60° shore 2 mm
Maßstab	1 : 3
Komponenten-Nr.	22 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

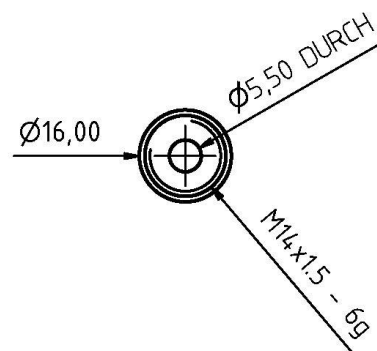
Ansicht links



Ansicht oben



Ansicht unten



Ansicht ISO links



Bauteil	BES Abwasserbehandl.
Komponente	Bezugselektrodenhalter
Material	PTFE
Maßstab	1 : 1
Komponenten-Nr.	23 / 23
Bearbeitung	Frederik Golitsch
Karlsruher Institut für Technologie Institut für angewandte Biowissenschaften	

3 Analysedaten des Vorklärungsablaufs (EMG)

EMSCHER LIPPE
GENOSSENSCHAFT EGLV. VERBAND

23-AW-10
Herr Phan

Auftragsnummer
E 14-00564

Aktenzeichen
3/4 D 20

Sachbearbeitung
Hr. Jakobs(KL-KE)

☎ 0201/178-
2733

Datum
01.04.2014

PRÜFBERICHT

Prüfgegenstand	Herkunft:	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	
Probenahmeort:	Vorklärun, Ablauf	Vorklärun, Ablauf	Vorklärun, Ablauf	Vorklärun, Ablauf	Vorklärun, Ablauf	
Probenart:	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	
Probenmatrix:	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	
Probenehmer:	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	
Probenahme von:	18.03.2014 08:00	18.03.2014 10:00	18.03.2014 12:00	18.03.2014 14:00	18.03.2014 16:00	
Probenahme bis:	18.03.2014 10:00	18.03.2014 12:00	18.03.2014 14:00	18.03.2014 16:00	18.03.2014 16:00	
1. Seite Probennummer:	W 1118588	W 1118589	W 1118590	W 1118591	W 1118591	
Parameter	DIN / DEV	Einheit	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis
pH-Wert	DIN 38404-C 5		7,90	8,19	8,02	7,71
Elektrische Leitfähigkeit	DIN EN 27888-C 8	µS/cm	1560	1592	1555	1564
Stickstoff, gesamter gebundener	DIN EN 12260-H 34	mg/l	92,3	100	92,9	73,6
Kohlenstoff, gesamter organisch gebundener	DIN EN 1484-H 3.3.3	mg/l	210	230	250	230
Abfiltrierbare Stoffe filtr.	DIN 38409-H 2-2	mg/l	127	158	133	116
Kohlenstoff, gelöster organisch gebundener filtr.	DIN EN 1484-H 3.3.4	mg/l	72	80	83	81
Chemischer Sauerstoffbedarf	DIN 38409-H 41-1	mg/l	619	524	722	733
Chemischer Sauerstoffbedarf filtr.	DIN 38409-H 41-1	mg/l	212	220	248	253
Nitrit-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Nitrat-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Orthophosphat-Phosphor	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	1,7	1,7	1,6	1,7
Ammonium-Stickstoff	DIN EN ISO 11732-E 23	mg/l	86	96	81	62
Phosphor	DIN EN ISO 6878-D 11,7	mg/l	12,4	13,5	13,2	11,6

Prüfberichte dürfen ohne schriftl. Genehmigung des Prüflaboratoriums nicht auszugsweise verwendet werden.
Die Angabe v. Summen, die durch Addition v. Einzelkomponenten gebildet werden, erfolgt nach einheitl. statistischer Methode.
**Summenbildung ohne Werte < Angabengrenze.
Diskrete Werte: n.u. = nicht untersucht, n.b. = nicht bestimmbar; ext. = Untersuchung durch externes Labor, Auskunft erteilt die Sachbearbeitung

1 von 3

Auftragsnummer
 E 14-00564

 Aktenzeichen
 3/4 D 20

 Sachbearbeitung
 Hr. Jakobs(KL-KE)

 ☎ 0201/178-
 2733

 Datum
 01.04.2014

Prüfgegenstand	Herkunft:	KA Dinsiaken	KA Dinsiaken	KA Dinsiaken	KA Dinsiaken	
Probenahmeort:	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	
Probenart:	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	
Probenmatrix:	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	
Probenehmer:	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	
Probenahme von:	18.03.2014 16:00	18.03.2014 18:00	18.03.2014 20:00	18.03.2014 22:00	18.03.2014 00:00	
Probenahme bis:	18.03.2014 18:00	18.03.2014 20:00	18.03.2014 22:00	18.03.2014 00:00	18.03.2014 00:00	
1. Seite Probennummer:	W 1118592	W 1118593	W 1118594	W 1118595	W 1118595	
Parameter	DIN / DEV	Einheit	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis
pH-Wert	DIN 38404-C 5		7,44	7,41	7,51	7,52
Elektrische Leitfähigkeit	DIN EN 27888-C 8	µS/cm	1548	1500	1459	1448
Stickstoff, gesamter gebundener	DIN EN 12260-H 34	mg/l	67,2	67,5	68,9	69,2
Kohlenstoff, gesamter organisch gebundener	DIN EN 1484-H 3.3.3	mg/l	250	240	240	220
Abfiltrierbare Stoffe filtr.	DIN 38409-H 2-2	mg/l	119	115	47	100
Kohlenstoff, gelöster organisch gebundener filtr.	DIN EN 1484-H 3.3.4	mg/l	86	120	85	82
Chemischer Sauerstoffbedarf	DIN 38409-H 41-1	mg/l	753	753	722	650
Chemischer Sauerstoffbedarf filtr.	DIN 38409-H 41-1	mg/l	268	273	263	237
Nitrit-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Nitrat-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Orthophosphat-Phosphor	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	1,3	1,7	1,2	1,5
Ammonium-Stickstoff	DIN EN ISO 11732-E 23	mg/l	55	54	54	58
Phosphor	DIN EN ISO 6878-D 11.7	mg/l	11,7	11,2	11,3	11,2

Prüfberichte dürfen ohne schriftl. Genehmigung des Prüflaboratoriums nicht auszugsweise verwendet werden.
 Die Angabe v. Summen, die durch Addition v. Einzelkomponenten gebildet werden, erfolgt nach einheitl. statistischer Methode.
 **Summenbildung ohne Werte < Angabengrenze.
 Diskrete Werte: n.u. = nicht untersucht, n.b. = nicht bestimmbar, ext. = Untersuchung durch externes Labor, Auskunft erteilt die Sachbearbeitung

2 von 3

Auftragsnummer
 E 14-00564

 Aktenzeichen
 3/4 D 20

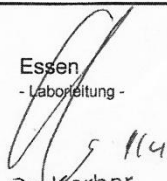
 Sachbearbeitung
 Hr. Jakobs(KL-KE)

 ☎ 0201/178-
 2733

 Datum
 01.04.2014

Prüfgegenstand	Herkunft:	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	
Probenahmeort:	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	
Probenart:	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	
Probenmatrix:	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	
Probenehmer:	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	
Probenahme von:	19.03.2014 00:00	19.03.2014 02:00	19.03.2014 04:00	19.03.2014 06:00	19.03.2014 08:00	
Probenahme bis:	19.03.2014 02:00	19.03.2014 04:00	19.03.2014 06:00	19.03.2014 08:00	19.03.2014 08:00	
1. Seite Probennummer:	W 1118596	W 1118597	W 1119243	W 1119244	W 1119244	
Parameter	DIN / DEV	Einheit	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis
pH-Wert	DIN 38404-C 5		7,56	7,62	7,65	7,65
Elektrische Leitfähigkeit	DIN EN 27888-C 8	µS/cm	1444	1422	1431	1445
Stickstoff, gesamter gebundener	DIN EN 12260-H 34	mg/l	70,2	70,3	70	72
Kohlenstoff, gesamter organisch gebundener	DIN EN 1484-H 3.3.3	mg/l	190	190	170	170
Abfiltrierbare Stoffe filtr.	DIN 38409-H 2-2	mg/l	62	33	<20	56
Kohlenstoff, gelöster organisch gebundener filtr.	DIN EN 1484-H 3.3.4	mg/l	71	68	70	64
Chemischer Sauerstoffbedarf	ESD DIN 38409-H 41-1	mg/l	589	537	495	495
Chemischer Sauerstoffbedarf filtr.	DIN 38409-H 41-1	mg/l	222	217	206	196
Nitrit-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Nitrat-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Orthophosphat-Phosphor	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	1,1	1,0	1,0	1,0
Ammonium-Stickstoff	DIN EN ISO 11732-E 23	mg/l	59	61	63	64
Phosphor	DIN EN ISO 6878-D 11.7	mg/l	11,4	10,9	10,5	10,5

 Essen
 - Laborleitung -


 Dr. Korber

Prüfberichte dürfen ohne schriftl. Genehmigung des Prüflaboratoriums nicht auszugsweise verwendet werden.
 Die Angabe v. Summen, die durch Addition v. Einzelkomponenten gebildet werden, erfolgt nach einheitl. statistischer Methode.
 **Summenbildung ohne Werte < Angabengrenze.
 Diskrete Werte: n.u. = nicht untersucht, n.b. = nicht bestimmbar; ext. = Untersuchung durch externes Labor, Auskunft erteilt die Sachbearbeitung

3 von 3



23-AW-10
Herr Phan

Auftragsnummer
E 14-00564

Aktenzeichen
3/4 D 20

Sachbearbeitung
Hr. Jakobs(KL-KE)

0201/178-
2733

Datum
23.05.2014

PRÜFBERICHT

Prüfgegenstand	Herkunft:	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	
Probenahmeort:		Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	
Probenart:		2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	
Probenmatrix:		gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	
Probenehmer:		Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	
Probenahme von:		12.05.2014 08:00	12.05.2014 10:00	12.05.2014 12:00	12.05.2014 14:00	
Probenahme bis:		12.05.2014 10:00	12.05.2014 12:00	12.05.2014 14:00	12.05.2014 16:00	
1. Seite Probennummer:		W 1122358	W 1122359	W 1122360	W 1122361	
Parameter	DIN / DEV	Einheit	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis
pH-Wert	DIN 38404-C 5		8,00	7,91	7,45	7,83
Elektrische Leitfähigkeit	DIN EN 27888-C 8	µS/cm	1527	1510	1338	1465
Stickstoff, gesamter gebundener	DIN EN 12260-H 34	mg/l	102	95,8	95,8	98,7
Kohlenstoff, gesamter organisch gebundener	DIN EN 1484-H 3.3.3	mg/l	310	280	350	360
Abfiltrierbare Stoffe filtr.	DIN 38409-H 2-2	mg/l	390	313	376	420
Kohlenstoff, gelöster organisch gebundener filtr.	DIN EN 1484-H 3.3.4	mg/l	71	65	82	85
Chemischer Sauerstoffbedarf	DIN 38409-H 41-1	mg/l	736	803	983	1040
Chemischer Sauerstoffbedarf filtr.	DIN 38409-H 41-1	mg/l	188	173	223	229
Nitrit-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Nitrat-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Orthophosphat-Phosphor	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	6,5	7,4	5,8	6,9
Ammonium-Stickstoff	DIN EN ISO 11732-E 23	mg/l	92	83	53	78
Phosphor	DIN EN ISO 6878-D 11.7	mg/l	14,2	13,2	12,3	14,6

Prüfberichte dürfen ohne schriftl. Genehmigung des Prüflaboratoriums nicht auszugsweise verwendet werden.
Die Angabe v. Summen, die durch Addition v. Einzelkomponenten gebildet werden, erfolgt nach einheitl. statistischer Methode.

**Summenbildung ohne Werte < Angabengrenze.

Diskrete Werte: n.u. = nicht untersucht, n.b. = nicht bestimmbar; ext. = Untersuchung durch externes Labor, Auskunft erteilt die Sachbearbeitung

1 von 3



Auftragsnummer
E 14-00564

Aktenzeichen
3/4 D 20

Sachbearbeitung
Hr. Jakobs(KL-KE)

☎ 0201/178-
2733

Datum
23.05.2014

Prüfgegenstand	Herkunft:	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	
Probenahmeort:	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	
Probenart:	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	2 Std.- Mischprobe	
Probenmatrix:	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	
Probenehmer:	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	
Probenahme von:	12.05.2014 16:00	12.05.2014 18:00	12.05.2014 20:00	12.05.2014 22:00	12.05.2014 00:00	
Probenahme bis:	12.05.2014 18:00	12.05.2014 20:00	12.05.2014 22:00	12.05.2014 00:00	12.05.2014 00:00	
1. Seite Probennummer:	W 1122362	W 1122363	W 1122364	W 1122365	W 1122365	
Parameter	DIN / DEV	Einheit	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis
pH-Wert	DIN 38404-C 5		7,32	7,14	7,33	7,40
Elektrische Leitfähigkeit	DIN EN 27888-C 8	µS/cm	641	641	866	1055
Stickstoff, gesamter gebundener	DIN EN 12260-H 34	mg/l	32,7	36,7	45,6	56,8
Kohlenstoff, gesamter organisch gebundener	DIN EN 1484-H 3.3.3	mg/l	140	220	190	230
Abfiltrierbare Stoffe filtr.	DIN 38409-H 2-2	mg/l	137	265	154	174
Kohlenstoff, gelöster organisch gebundener filtr.	DIN EN 1484-H 3.3.4	mg/l	31	36	44	57
Chemischer Sauerstoffbedarf	DIN 38409-H 41-1	mg/l	385	584	528	610
Chemischer Sauerstoffbedarf filtr.	DIN 38409-H 41-1	mg/l	107	112	132	158
Nitrit-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Nitrat-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Orthophosphat-Phosphor	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	3,0	3,3	4,2	4,9
Ammonium-Stickstoff	DIN EN ISO 11732-E 23	mg/l	22	20	33	41
Phosphor	DIN EN ISO 6878-D 11.7	mg/l	5,60	7,16	7,81	9,17

Prüfberichte dürfen ohne schriftl. Genehmigung des Prüflaboratoriums nicht auszugsweise verwendet werden.
Die Angabe v. Summen, die durch Addition v. Einzelkomponenten gebildet werden, erfolgt nach einheitl. statistischer Methode.

*Summenbildung ohne Werte < Angabengrenze.

Diskrete Werte: n.u. = nicht untersucht, n.b. = nicht bestimmbar; ext. = Untersuchung durch externes Labor, Auskunft erteilt die Sachbearbeitung

2 von 3

Auftragsnummer
 E 14-00564

 Aktenzeichen
 3/4 D 20

 Sachbearbeitung
 Hr. Jakobs(KL-KE)

 ☎ 0201/178-
 2733

 Datum
 23.05.2014

Prüfgegenstand	Herkunft:	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	KA Dinslaken	
Probenahmeort:	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	Vorklä rung, Ablauf	
Probenart:	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	2 Std. - Mischprobe	
Probenmatrix:	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	gewerblich - kommunales Mischabwasser	
Probenehmer:	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	Anlagenpersonal	
Probenahme von:	13.05.2014 00:00	13.05.2014 02:00	13.05.2014 04:00	13.05.2014 06:00	13.05.2014 08:00	
Probenahme bis:	13.05.2014 02:00	13.05.2014 04:00	13.05.2014 06:00	13.05.2014 08:00	13.05.2014 08:00	
1. Seite Probennummer:	W 1122366	W 1122367	W 1122368	W 1122369		
Parameter	DIN / DEV	Einheit	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis
pH-Wert	DIN 38404-C 5		7,52	7,52	7,54	7,59
Elektrische Leitfähigkeit	DIN EN 27888-C 8	µS/cm	968	1111	955	1082
Stickstoff, gesamter gebundener	DIN EN 12260-H 34	mg/l	53,6	58,4	48,8	48,0
Kohlenstoff, gesamter organisch gebundener	DIN EN 1484-H 3.3.3	mg/l	170	200	140	92
Abfiltrierbare Stoffe filtr.	DIN 38409-H 2-2	mg/l	110	159	98	124
Kohlenstoff, gelöster organisch gebundener filtr.	DIN EN 1484-H 3.3.4	mg/l	40	53	36	29
Chemischer Sauerstoffbedarf	DIN 38409-H 41-1	mg/l	437	1420	356	356
Chemischer Sauerstoffbedarf filtr.	DIN 38409-H 41-1	mg/l	112	152	97	76
Nitrit-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Nitrat-Stickstoff	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Orthophosphat-Phosphor	DIN EN ISO 10304-D 19/20	mg/l	4,5	5,4	4,1	4,3
Ammonium-Stickstoff	DIN EN ISO 11732-E 23	mg/l	40	44	35	36
Phosphor	DIN EN ISO 6878-D 11.7	mg/l	8,00	9,04	7,02	7,09

 Essen
 - Laborleitung -

Prüfberichte dürfen ohne schriftl. Genehmigung des Prüflaboratoriums nicht auszugsweise verwendet werden.
 Die Angabe v. Summen, die durch Addition v. Einzelkomponenten gebildet werden, erfolgt nach einheitl. statistischer Methode.
 **Summenbildung ohne Werte < Angabengrenze.

Diskrete Werte: n.u. = nicht untersucht, n.b. = nicht bestimmbar; ext. = Untersuchung durch externes Labor, Auskunft erteilt die Sachbearbeitung

3 von 3

Danksagung

Lieber Johannes,

vor ungefähr 9 Jahren hörte ich das erste Mal von diesem jungen Kerl aus Stanford, der dabei war an der Uni Freiburg eine Nachwuchsgruppe aufzubauen. Ich war gerade am Anfang meines Hauptstudiums, fand Mikrobiologie super und Herrn Fuchs furchteinflößend. Die Zeit verging, die ersten Großpraktika kamen und plötzlich erzählte mir dieser junge Kerl etwas von mikrobiellen Brennstoffzellen... ab da war es um mich geschehen.

Johannes, ich möchte dir dafür danken, dass ich in unserer gemeinsamen Zeit so viel lernen und vor allem so viel ausprobieren durfte. Deine Inspiration und dein Enthusiasmus haben mir geholfen viele, neue Dinge anzupacken. Du hast mir immer großes Vertrauen entgegengebracht und mich in vielen, gelegentlich auch schwierigen, Situationen gefördert und unterstützt. Das ist nicht selbstverständlich. Danke für diese großartige, lehrreiche Zeit.

Weiterhin möchte ich auch der Emscher Genossenschaft danken. Ohne die Unterstützung beim Betrieb des „REAKTORS“ im Technikum Dinslaken (danke Herr Breidenbach, danke Frank) und die Anregungen durch fachliche Diskussionen mit den Kollegen von den technischen Services (danke Linh-Con, danke Daniel) wäre vieles nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank geht an die Kellerkinder im Gebäude 30.44. Dieter, du und dein Team seid einfach unfassbar gut und wahrscheinlich die beste feinmechanische Werkstatt der Welt. Egal wie groß, schwierig oder bescheuert mein Anliegen war, ihr habt mir immer weitergeholfen. Abgesehen davon seid ihr dabei auch noch wahnsinnig sympathisch. Vielen Dank dafür!

Liebes Labor,

danke für eure Unterstützung, die tolle Arbeitsatmosphäre und das Ertragen meines „gelegentlichen“ Lamentierens: Kadda, danke für einfach alles. Du warst der beste wissenschaftliche „Wingman“ den man sich hätte wünschen können. Azoren, VAAM, KORREKTUREN (so viel danke!), Schnapsproben... wie schön, dass wir uns dann auch noch abseits der Arbeit so gut verstehen.

Tutut, terima kasih atas bantuan Anda. Anda hanya besar! (ich hoffe das stimmt so...). Sebastian, danke für die vielen, vielen fachlichen, wie gesellschaftspolitischen und gelegentlich sinnbefreiten Diskussionen! Sibylle als meinen Sitznachbarn zu ersetzen war

sicher kein leichter Job, but you did so well! Susi, danke für das Ertragen dieser Diskussionen, deine Hilfe in vielen Notlagen (Hungate?) und dein Handyladegerät, deine Schere, dein Lineal...

Lieber Club der Freiburger Veteranen: Schnubbi, danke, dass ich dich am dritten Tag unseres Studiums kennenlernen durfte. Wirklich ein Traum von einem Kommilitonen! Sibylle, es ist einfach schön eine Freundin und Kollegin wie dich zu haben. Und danke, dass du Jonas geheiratet hast. Gunnar und Mimi, ich wusste von euch schon lange, bevor ihr es wusstet... Danke für die vielen schönen Erinnerungen (#vodkaparty, #weist du wie man paper findet?, #charlytheunicorn, #tischkicker, #...) und fruchtbaren Diskussionen.

Liebes Büro 1: Thea, auch wenn du es nie wolltest, du bist ne super Labormutti. Danke dafür und so vieles anderes. Go science!. Steffi, danke für deine Fröhlichkeit und die „pälzische Momende“ (Hahnebambel forever). Tina, danke für deinen Humor, „den Tanz“ und das mit dem Bradford kriegen wir schon auch noch hin... Tobi, danke für Brendan...und natürlich so vieles mehr. Francesca, grazie per la bevanda di caffè, le uova di cioccolato, l'olio d'oliva, il karaoke e tanto divertimento. Solo grande!

Lieber Rest von Büro 3: Анна Спасибо за вашу поддержку и российские конфеты. Lukas, danke für die Rugbykomponente im Labor, deine Kaffeeweisheiten, lecker Honig! und deine Ernährungstipps...

Liebes Büro 4: Ebi, you'll always be my Bachelor No. 1. Danke dafür und für so viele Momente am Rande des Totlachs. Und danke für Aris... Vicky, danke für den Schmäh, den Schmarrn und die Kultur. Dös woar öcht leiwand! Anne, danke für deine Einblicke in das Leben eines Turnierjudokas (感謝) und natürlich noch vieles mehr. Verò, gracias para „Veò Veò“.

Esther, danke für deine Unterstützung bei der Bewältigung jeglichen Papierkrieges und deine immer wieder ermunternden Worte.

Ein großer Dank geht auch an alle meine ehemaligen Bachelorstudenten. Ihr habt entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke Johannes (a.k.a. Ebi), Ferdi, Marius und Laura.

Vielen Dank auch an meine Freunde. Christian, als mein allerliebster Ex-Mitbewohner und guter Freund möchte ich mich für die allabendliche Zerstreuung bedanken. Der nicht-über-die-Arbeit-reden-Kodex war Gold wert. Andi, als mein Ex-Kollege möchte ich mich noch für unsere immer fruchtbare Zusammenarbeit bedanken. Abgesehen davon habe ich einen guten

Freund dazugewonnen. Danke für leidenschaftliche politische Diskurse (sorry Nane), für endlose Autofahrten und Wii-Sports-Golf-Partien. Liebe Fußballjungs, inzwischen ist zwar nur noch der harte Kern von uns übrig, aber unsere Abende sind nach wie das Highlight der Arbeitswoche. Danke für die zahlreichen Diss.-Tipps, die Emotionen und eine unvergessliche Nacht im Juli 2014.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke Mama und Papa für eure Unterstützung über all die Jahre hinweg und dass ihr immer an mich geglaubt habt. Ich bin froh solche Eltern wie euch zu haben. Danke Lieblingsbruder für deine Hilfe, deine Ideen und deine Ehrlichkeit in so vielen Lebenslagen. Ein Großer, mein Kleiner!

Liebe Anna, lieber Lukas, danke für all die Kraft, Freude und Liebe die ihr mir schenkt. Danke für eure Geduld, für eure Zuversicht und die vielen schönen Momente mit euch. Ohne euch hätte ich das alles sicher niemals geschafft. Ihr seid mein Fels in der Brandung. Ich bin so froh, dass es euch gibt!